



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**BUSQUEDA DE MECANISMOS ALTERNOS DE REPARACION DE DAÑO AL DNA EN
CÉLULAS DEFICIENTES EN LA VIA FA/BRCA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MEJÍA BARRERA MARCO ANTONIO

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO.
CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ.
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.**

CD. MX.,

NOVIEMBRE, 2019.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1148/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **12 de agosto de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **MEJÍA BARRERA MARCO ANTONIO** con número de cuenta **305084714** con la tesis titulada **"BÚSQUEDA DE MECANISMOS ALTERNOS DE REPARACIÓN DE DAÑO AL DNA EN CÉLULAS DEFICIENTES EN LA VÍA FA/BRCA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Vocal: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
Secretario: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
Suplente: DR. VÍCTOR MANUEL DÁVILA BORJA
Suplente: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 28 de octubre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE POSGRADO

Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX
Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México programa en el que se realizó el presente proyecto.

Al CONACYT por la beca de maestría otorgada con el número de beca 243102.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría, financiamiento de recursos fiscales del INP 043/2012 y 040/2014.

Al comité tutor integrado por la Dra. Leda Carolina Torres Maldonado, Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo y la Dra. Ana María Salazar Martínez.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi familia a quienes va dedicada esta tesis por todo su amor y comprensión a lo largo de la vida cuyo amor perdurará a pesar del tiempo las distancias o la muerte, muchas gracias por todo a Julio César, a mi madre Araceli Barrera y a mi padre Alfonso Mejía que desde donde estés sé que estarás al pendiente de nosotros los amo a los tres.

A todo el personal del Laboratorio de Citogenética por toda la ayuda y consejos dados en la realización de este proyecto en especial a la Dra. Sara Frías Vázquez.

A la Dra. Leda Torres por todo su apoyo a nivel académico y personal muchas gracias por toda la amistad.

Al Dr. Alfredo Rodríguez por su colaboración y amistad ofrecida en estos años muchas gracias Alf.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Migue, Benjas, Mirna gracias por todo chicos los quiero.

A los miembros del jurado:

Presidente: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte.

Vocal: Dra. Sara Frías Vázquez.

Secretario: Dra. Ana María Salazar Martínez.

Suplente: Dr. Victor Manuel Dávila Borja.

Suplente: Dr. Juan José Rodríguez Mercado.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría bajo la tutoría de la Dra. Leda Carolina Torres Maldonado, con la asesoría del Dr. Alfredo Rodríguez Gómez y la Dra. Sara Frías Vázquez.

A la M. en C. Bertha Molina Álvarez por el apoyo brindado en la obtención del cariotipo de las líneas celulares empleadas.

A la M. en C. Sandra Elena Ramos Ángeles por su apoyo para la obtención de imágenes de los ensayos de inmunolocalización.

Al BQD. Miguel Ángel Martínez Martínez por su apoyo en los ensayos de inmunolocalización.

“Cuando mi voz calle con la muerte, mi corazón te seguirá hablando”.

Rabindranath Tagore.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.	
ÍNDICE DE FIGURAS.	
ÍNDICE DE GRÁFICAS.	
ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO.	
RESUMEN.	1
ABSTRACT.	3
I. INTRODUCCIÓN.	5
I.I El daño en el DNA y mecanismos de respuesta celular.	5
I.II. Enlaces covalentes cruzados y rupturas de doble cadena en el DNA.	6
I.III. Agentes endógenos inductores de ICL o DSB.	7
I.IV. Agentes exógenos inductores de ICL o DSB.	9
I.V. La Anemia de Fanconi (AF) y otros síndromes de inestabilidad genómica.	12
I.V.I. Aspectos clínicos.	17
I.V.II. Aspectos celulares.	18
I.VI. La vía FA/BRCA participa en la reparación de los ICL.	19
I.VII. Mecanismos de reparación de DSB alternos a la vía FA/BRCA.	24
I.VIII. Inhibidores químicos en el estudio de la reparación del DNA.	29
II. OBJETIVOS.	30
III. ANTECEDENTES.	31
III.I. Antecedentes directos.	31
III.II. Antecedentes no directos.	33
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	35
V. METODOLOGÍA.	36
V.I. Diseño experimental.	36
V.II. Cultivos y líneas celulares.	37
V.III. Bloqueo de vías de reparación.	38
V.IV. Análisis de viabilidad.	39
V.V. Análisis de aberraciones cromosómicas.	39
V.VI. Análisis de ciclo celular y muerte.	40
V.VII. Inmunolocalización.	40
V.VIII. Análisis estadístico.	42
VI. RESULTADOS.	43

VI.I. Viabilidad y densidad celular.	43
VI.II. Aberraciones cromosómicas.	47
VI.III. Dinámica del ciclo celular.	60
VI.IV. Células γ H2AX positivas.	62
VI.V. Inmunolocalización.	64
VII. DISCUSIÓN.	86
VII.I. La inhibición de PARP1 no afecta la viabilidad y proliferación celular.	90
VII.II. La inhibición de RAD51 disminuye la viabilidad y proliferación celular.	91
VII.III. La inhibición de PARP1 no altera la reparación de los DSB en células normales o AF.	91
VII.IV. La inhibición de RAD51 afecta la reparación de los DSB en células silvestres y AF.	92
VII.V. La inhibición de PARP1 no altera la dinámica del ciclo celular.	96
VII.VI. La inhibición de RAD51 induce arresto en las fases G ₂ /M y S en las células AF.	96
VII.VII. la inhibición de RAD51 incrementa ligeramente el reclutamiento de PARP1 a los sitios de DSB.	97
VII.VIII. La inhibición de RAD51 disminuye su reclutamiento a los sitios de DSB.	98
VII.IX. La inhibición de RAD51 facilita la unión de KU80 en los sitios de DSB.	99
VIII. CONCLUSIONES.	101
IX. PERSPECTIVAS.	101
X. LITERATURA CITADA.	102

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla I. Características genotípicas y fenotípicas de los síndromes de inestabilidad genómica	13
Tabla II. Genes de la vía FA/BRCA.....	15
Tabla III. Porcentaje de variantes patogénicas reportadas en los genes <i>FANC</i>	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posibles respuestas celulares ante el daño al DNA	5
Figura 2. Los aldehídos se producen de manera endógena durante el metabolismo de lípidos.....	8
Figura 3. Estructura de diferentes agentes inductores de ICL junto con la estructura del ICL que forman	11
Figura 4. Heterogeneidad genética en la anemia de Fanconi	17
Figura 5. Prueba de rupturas cromosómicas con MMC (40 ng/ml) en linfocitos normales (a) y linfocitos de un paciente con AF (b).....	19
Figura 6. Esquema representativo de la vía FA/BRCA.....	24
Figura 7. Esquema representativo de la cNHEJ durante la reparación de DSB.....	26
Figura 8. Esquema de la aNHEJ	28
Figura 9. Esquema de tratamientos utilizados en todos los experimentos	38
Figura 10. Imágenes representativas de inmunolocalización para el control sin tratamiento con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y RAD51 (rojo).....	74
Figura 11. Imágenes representativas de inmunolocalización para tratamiento con MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y RAD51 (rojo).....	75
Figura 12. Imágenes representativas de Inmunolocalización para tratamiento con el inhibidor de RAD51 B02 con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y RAD51 (rojo).....	76
Figura 13. Imágenes representativas de Inmunolocalización para tratamiento con el inhibidor de RAD51 B02 y MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y RAD51 (rojo).	77
Figura 14. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el control sin tratamiento con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y Ku80 (rojo).....	78
Figura 15. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento de MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y Ku80 (rojo).....	79
Figura 16. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento con el inhibidor de RAD51 B02 con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y Ku80 (rojo).	80

Figura 17. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento con el inhibidor de RAD51 B02 y MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y Ku80 (rojo).....	81
Figura 18. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el control sin tratamiento con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y PARP1 (rojo).	82
Figura 19. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento de MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y PARP1 (rojo).	83
Figura 20. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento del inhibidor de RAD51 B02 con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y PARP1 (rojo).	84
Figura 21. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento del inhibidor de RAD51 B02 y MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y PARP1 (rojo).	85
Figura 22. Activación de las vías de reparación de DSB en células normales y AF en cuatro diferentes condiciones experimentales.....	87
Figura 23. Árbol de decisiones para la reparación de un DSB.....	90

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. El inhibidor de PARP1 4AN no reduce la supervivencia en las células NL53 y VU817 mientras que el inhibidor de RAD51 B02 reduce la supervivencia en ninguna de las líneas celulares.....	44
Gráfica 2. El inhibidor de PARP1 4AN no reduce el número de células vivas en ninguna de las líneas celulares mientras que el inhibidor de RAD51 B02 reduce el número de células vivas en las células NL53 y VU817	46
Gráfica 3. El inhibidor de PARP1 4AN no aumenta la frecuencia de AC por célula en las células NL53 ni VU817 mientras que el inhibidor B02 si aumenta la frecuencia de AC por célula en ambas líneas celulares	49
Gráfica 4. El inhibidor de PARP1 4AN aumenta la frecuencia de aberraciones reunidas por célula en la línea VU817 mientras que el inhibidor B02 aumenta la frecuencia de aberraciones reunidas por célula en la línea VU817 en concentraciones altas	51
Gráfica 5. El inhibidor de PARP1 4AN aumenta la frecuencia de aberraciones cromosómicas no reunidas por célula en la línea VU817 mientras que el inhibidor de RAD51 B02 aumenta la frecuencia de aberraciones cromosómicas reunidas por célula en ambas líneas celulares.....	53
Gráfica 6. El tratamiento con el inhibidor de PARP1 4AN aumenta la frecuencia de figuras radiales por en la línea VU817 mientras que el inhibidor B02 disminuye la frecuencia de figuras radiales por célula en la línea celular VU817.....	55
Gráfica 7. El inhibidor de PARP1 4AN aumenta el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas en la línea VU817 mientras que el inhibidor de RAD51 B02 aumenta el porcentaje de células aberrantes en ambas líneas celulares	57
Gráfica 8. El inhibidor de PARP1 4AN aumenta el porcentaje de células multiaberrantes en ambas líneas celulares mientras que el inhibidor B02 aumenta el porcentaje de células multiaberrantes en la línea NL53.....	59
Gráfica 9. La MMC incrementa el porcentaje de células en G ₂ /M en las células VU817. El inhibidor de RAD51 B02 aumenta el porcentaje de células muertas en sub G ₁ en ambas líneas celulares en todas las concentraciones mientras que en la concentración de 100 µM aumentó el porcentaje de células en fase S en las células VU817	61
Gráfica 10. La MMC incrementa el porcentaje de células en G ₂ /M en las células VU817. El inhibidor de RAD51 B02 aumenta el porcentaje de células muertas en Sub G ₁ en ambas líneas celulares en todas las concentraciones mientras que en la concentración de 100 µM aumentó el porcentaje de células en fase S en las células VU817	63
Gráfica 11. Número de <i>foci</i> de γH2AX en células con marcaje simultáneo para PARP1.....	65
Gráfica 12. Número de <i>foci</i> de PARP1.....	66
Gráfica 13. Colocalización de PARP1 con la γH2AX.....	67
Gráfica 14. Número de <i>foci</i> γH2AX en células con marcaje simultáneo para RAD51	68
Gráfica 15. Número de <i>foci</i> de RAD51.....	69

Gráfica 16. Colocalización de RAD51 con la γ H2AX.....	70
Gráfica 17. Número de <i>foci</i> de γ H2AX en células con marcaje simultáneo para Ku80	71
Gráfica 18. Número de <i>Foci</i> de Ku80.....	72
Gráfica 19. Colocalización de Ku80 con la γ H2AX	73

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

6-4PPS	(6-4) foto productos
8-oxoG	8-oxoguanina
AC	Aberraciones cromosómicas
ADH5	Alcohol deshidrogenasa 5
AF	Anemia de Fanconi
aHR	Alternative Homologous Recombination (Recombinación homóloga alternativa)
aNHEJ	Alternative Non-Homologous End Joining (Unión de extremos no homólogos alternativa)
ANOVA	Análisis de varianza
AT	Ataxia telangiectasia
B02	3-(fenilmetil)-2-[(1E)-2-(3-piridinil)etenil]-4(3H)- quinazolinona
BCNU	(1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea
cHR	Classic homologous recombination (Recombinación homóloga clásica)
cNHEJ	Classic no-homologous end joining (Unión de extremos no homólogos clásica)
CPDs	Dímeros de pirimidina ciclobutano
DsDNA	Double strand DNA (DNA de doble cadena)
DB	1,3-butadieno
DDR	DNA damage response (Respuesta al daño al DNA)
DEB	1,2,3,4-diepoxibutano
DNA	Ácido desoxirribonucleico

dNTPs	Deoxirribonucleótidos trifosfato
DSB	Double strand break (Ruptura de doble cadena)
EEE	Endonucleasas específicas de estructura
ERO	Especies reactivas de oxígeno
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HU	Hidroxiurea
ICL	Interstrand crosslink (Enlace covalente cruzado)
IP	Yoduro de propidio
LMA	Leucemia mieloide aguda
MMC	Mitomicina C
MO	Médula ósea
NER	Nucleotide excision repair (Reparación por escisión de nucleótidos)
NU7026	2-(morpholin-4-yl)-benzo[h]chomen-4-one
O ₂ ⁻	Superóxido
OH•	Radical hidroxilo
REF	Figuras de intercambio radial
RI	Radiación ionizante
ERO	Especies reactivas del oxígeno
q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa.
SCE	Sister chromatid exchange (Intercambio de cromátides hermanas)
siRNA	Small interference RNA (RNA pequeño de interferencia)
SSB	Single strand break (Ruptura de cadena sencilla)

ssDNA	Single strand DNA (DNA de cadena sencilla)
UVA	Luz ultravioleta
XP	Xeroderma Pigmentosum

RESUMEN

La anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad genética, caracterizada por inestabilidad genómica, predisposición a cáncer y falla medular. La AF presenta herencia autosómica recesiva de manera predominante aunque en unos pocos genes el patrón de herencia es ligado al X o autosómico dominante, esta enfermedad es causada por mutaciones bialélicas en alguno de los 22 genes cuyos productos transcripcionales participan en la vía FA/BRCA y es responsable de la reparación de los enlaces covalentes cruzados (ICL, por sus siglas en inglés) en el DNA, un tipo de lesión que une de manera covalente las hebras Watson y Crick del DNA; durante el procesamiento de los ICL se generan productos intermedios y uno de ellos son las rupturas de doble cadena (DSB). Si la vía FA/BRCA funciona de manera adecuada los DSB se reparan por medio de la reparación por recombinación homóloga clásica (cHR), una vía libre de error mientras que cuando hay deficiencias en ella los DSB se reparan por medio de la unión de extremos no homólogos clásica (cNHEJ) que es una vía propensa a error, esto conduce a la aparición de estructuras aberrantes de cromosomas mal apareados llamadas figuras de intercambio radial (REF). En estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo muestran que en una línea celular linfoblastoide deficiente en *FANCA* (componente del *core* de la vía FA/BRCA) (línea celular VU817) cuando se inhibe a la proteína DNA-PKcs, constituyente de la cNHEJ y se someten a daño con MMC aumenta la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) pero no hay cambios en la frecuencia de figuras radiales al comparar contra las células VU817 tratadas solamente con MMC. Estos hallazgos sugieren que adicionalmente a los mecanismos canónicos se encuentran involucrados otros alternos en la reparación de los DSB, además un modelo de lógica booleana de la vía FA/BRCA realizado por nuestro grupo arrojó diferentes predicciones respecto al comportamiento de las células AF cuando se enfrentan a daño por ICL, una de ellas propone que cuando los mecanismos canónicos de cHR y cNHEJ no se encuentran disponibles la célula puede responder al daño por ICL por medio de una vía que utiliza al complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) para reseccionar los extremos 5' dirigiendo la reparación de los DSB a una vía de recombinación homóloga independiente de la vía FA/BRCA. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación y relevancia de mecanismos alternos de reparación de DSB como son la unión de extremos no homólogos alterna (aNHEJ) y la reparación por recombinación homóloga alterna (aHR) para lo cual se utilizaron dos líneas celulares linfoblastoides una silvestre (NL53) y otra con una mutación en *FANCA* (VU817) las cuales se sometieron a cuatro distintos tratamientos: control, MMC, tratado con inhibidor y un tratamiento conjunto

de MMC y el inhibidor químico, los inhibidores químicos utilizados fueron B02 [5, 12.5, 24, 50 y 100 μ M] un inhibidor de RAD51 utilizado para bloquear la cHR o la aHR así como 4AN (0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 5 y 10 μ M) un inhibidor de PARP1 empleado para inhibir a la aNHEJ se evaluó la viabilidad y crecimiento celular así como la frecuencia y tipo de AC por medio del ensayo AC, además se estudió la dinámica del ciclo celular y la presencia de γ H2AX por medio de citometría de flujo, un marcador de DSB, finalmente se realizaron ensayos de inmunocitoquímica para observar la cantidad de tres proteínas de unión a DSB de diferentes mecanismos de reparación de DSB (RAD51 de la cHR y la aHR, Ku80 de la cNHEJ y PARP1 de la aNHEJ) así como su colocalización con la γ H2AX. El inhibidor de PARP1 indujo cambios en la frecuencia de AC o en la viabilidad celular en ninguna de las líneas celulares, tampoco se observó diferencia en la dinámica del ciclo celular así como en la presencia de la γ H2AX causados por este inhibidor. Por otra parte el tratamiento con el inhibidor de RAD51 causó muerte celular en ambas líneas celulares observada como reducción del porcentaje de viabilidad, además se observó que el tratamiento con este inhibidor indujo aumento en la frecuencia de las AC no reunidas en ambas líneas así como reducción en la frecuencia de figuras radiales en la línea VU817, en la línea NL53 causó aumento de la frecuencia de REF. El inhibidor de RAD51 en tratamiento combinado con MMC causó en la línea celular NL53 arresto en G_2/M además de incremento en sub G_1 (células muertas por apoptosis), mientras que, en las células VU817 se observó incremento en la fracción de Sub G_1 y aumento en fase S en la concentración de 100 μ M. En los ensayos de inmunolocalización se observó que al inhibir a RAD51 hubo aumento de la colocalización de Ku80, componente de la cNHEJ con la γ H2AX en ambas líneas celulares (siendo más marcado en la línea NL53), lo cual concuerda con diversos reportes en los que se encuentra sobreexpresión de esta vía en las células AF, además se observó aumento en la colocalización de la γ H2AX con PARP1 en ambas líneas celulares después del tratamiento con el inhibidor de RAD51. Nuestros resultados sugieren que es esencial el mantener al menos una vía de recombinación homóloga para la viabilidad celular por lo que en las células AF al no poder activar la cHR la aHR juega un papel importante a pesar de que la cNHEJ funciona como la principal vía de reparación de los DSB. Finalmente, nuestros resultados sugieren que la aNHEJ es un mecanismo de reparación de DSB poco relevante en el entorno de las células AF.

ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) is a rare genetic disease, characterized by genomic instability, predisposition to cancer, and spinal failure. FA presents predominantly autosomal recessive inheritance although in a few genes the inheritance pattern is linked to the X or autosomal dominant. This disease presents genetic and allelic heterogeneity; the failure could be done in one of the 22 genes whose transcriptional products participate in the FA/BRCA pathway. FA/BRCA is responsible for repairing the genomic damage caused by the ICL, a type of lesion that covalently joins the Watson and Crick strands of the DNA. During the processing of the ICLs, intermediate products were generated, and one of them is the double chain ruptures (DSB). If the FA / BRCA pathway is functioning properly, the DSBs are repaired by means of classic homologous recombination repair (cHR), an error-free path while when there are deficiencies in it, the DSBs are repaired through the classic non-homologous end-joining (cNHEJ) which is an error-prone pathway, this leads to the appearance of aberrant structures of poorly matched chromosomes called radial (RAD) or radial exchange figures. Previous studies carried out by our group show that in a FANCA-deficient lymphoblast cell line (*core* component of the FA / BRCA pathway) when DNA-PKcs protein, a constituent of cNHEJ, is inhibited and subjected to MMC damage increases the frequency of chromosomal aberrations but there is no change in the frequency of radial figures when compared against VU817 cells treated only with MMC. These findings suggest that in addition to the canonical mechanisms other alternates are involved in the repair of the DSB, in addition a model of Boolean logic of the FA / BRCA pathway made by our group yielded different predictions regarding the behavior of the AF cells when facing To damage due to ICL, one of them proposes that when the canonical mechanisms of cHR and cNHEJ are prevented, the cell can respond to damage due to ICL by means of a route that uses the MRN complex to resect the 5' ends by directing the repair of DSB to a homologous recombination pathway independent of the FA / BRCA pathway. The objective of this work was to study the participation and relevance of alternative DSB repair mechanisms such as the alternative non-homologous end-joining (aNHEJ) and the alternative homologous recombination (aHR) for which two lymphoblast cell lines were used, wild (NL53) and another with a mutation in FANCA (VU817) which underwent four different treatments: a control, MMC, an inhibitor and a joint treatment of MMC and a chemical inhibitor, the chemical inhibitors used were B02 [5, 12.5, 24, 50 and 100 μ M] a RAD51 inhibitor used to block cHR or aHR as well as 4AN (0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 5 and 10 μ M) a PARP1 inhibitor used to inhibit aNHEJ

evaluated the viability and cell growth as well as the frequency and type of chromosomal aberrations by means of the chromosomal aberrations test, in addition the dynamics of the cell cycle and the presence of γ H2AX were studied through Flow cytometry, a DSB marker, was finally performed immunocytochemical assays to observe the amount of three DSB binding proteins of different DSB repair mechanisms (RAD51 of the cHR and the aHR, Ku80 of the cNHEJ and PARP1 of the aNHEJ) as well as its colocalization with the γ H2AX. The PARP1 inhibitor-induced changes in the frequency of chromosomal aberrations or cell viability in any of the cell lines, no difference was observed in cell cycle dynamics as well as in the presence of γ H2AX caused by this inhibitor. On the other hand, the treatment with the RAD51 inhibitor caused cell death in both cell lines observed as a reduction of the viability percentage; it was also observed that the treatment with this inhibitor induced an increase in the frequency of the non-combined chromosomal aberrations in both lines. as well as a reduction in the frequency of radial figures on the VU817 line, on the NL53 line, it caused an increase in the frequency of radial figures. The RAD51 inhibitor in combination treatment with MMC caused in the NL53 cell line arrest in G2 / M in addition to an increase in Sub G1 that is to say cells killed by apoptosis while in the VU817 cells an increase in the fraction of Sub G1 was observed and an increase in S phase in the concentration of 100 μ M. In immunolocalization tests it was observed that when inhibiting RAD51 there was an increase in the colocalization of Ku80, a component of cNHEJ with γ H2AX in both cell lines (being more marked in the NL53 line) which agrees with various reports in which overexpression of this pathway is found in AF cells, in addition, if an increase in colocalization of deH2AX with PARP1 was observed in both cell lines after treatment with the RAD51 inhibitor. Our results suggest that it is essential to maintain at least one homologous recombination pathway for cell viability, so in the case of AF cells not being able to activate the cHR, the aHR plays an important role even though the cNHEJ functions as the main route of DSB repair. Furthermore, our results suggest that aNHEJ is a mechanism of repair of DSB that is not very relevant in the environment of AF cells.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 El daño en el DNA y mecanismos de respuesta celular

El ácido desoxirribonucleico (DNA) es una biomolécula de gran importancia para los seres vivos ya que es donde se almacena la información genética de las células, además de ser un molde para la síntesis de diferentes RNAs durante la transcripción, por lo cual resulta vital el mantenimiento de su integridad de secuencia y estructura.

La integridad del genoma se encuentra amenazada constantemente por agentes endógenos y exógenos que pueden provocar daño, cuando esto ocurre la célula responde de diferentes maneras y utiliza diversos mecanismos los cuales en conjunto se conocen como respuesta al daño del DNA (DDR, por sus siglas en inglés), entre los que se encuentran el arresto en el ciclo celular por los puntos de monitoreo o “checkpoints”, la activación de rutas de reparación del daño al DNA o finalmente muerte celular cuando el daño es masivo y no se puede reparar (Figura 1) (Zhou y Elledge, 2000).

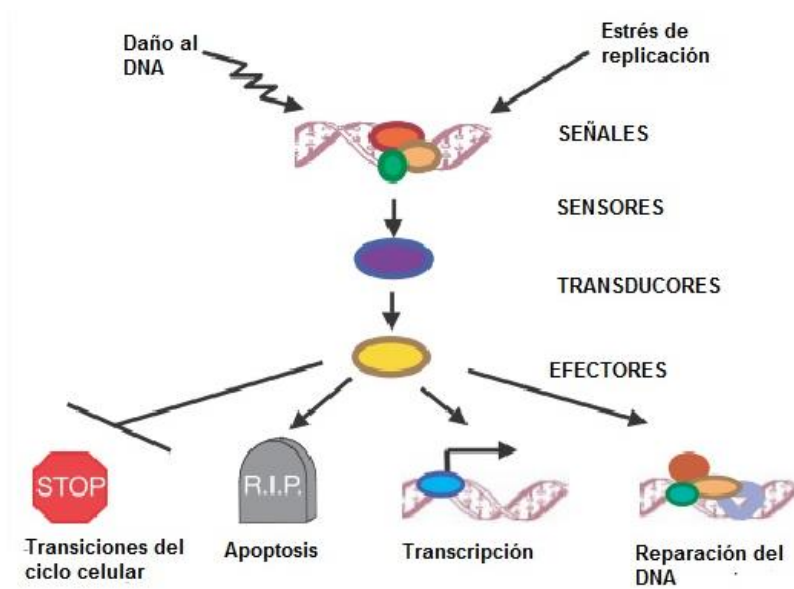


Figura 1. Posibles respuestas celulares ante el daño al DNA. Modificado de Zhou y Elledge, 2000.

Si estos mecanismos sufren algún fallo, ocurre inestabilidad genómica que se asocia con envejecimiento y procesos patológicos como el cáncer. La inestabilidad genómica se puede dividir en dos grupos: la de micro satélites asociada a un fenotipo mutado así como la cromosómica (Mozdarani, 2016). Por otra parte existen tres tipos de alteraciones en el genoma:

- a) Daño químico al DNA. Como rupturas de cadena sencilla o doble, entrecruzamientos entre las bases que pueden ser intra o intercatenarios, despurinación o despirimidinación de los azúcares y modificación de bases.
- b) Mutaciones. Como adiciones, deleciones o sustituciones de bases.
- c) Epimutaciones. Que son cambios heredables en el DNA o modificación de proteínas que transforman la expresión génica sin cambio en la secuencia de pares de base (pb) en las cadenas de DNA (Vijg y Suh, 2013).

Los mecanismos encargados de reparar el DNA dañado no son infalibles y esto conduce a daño acumulativo a lo largo del tiempo, debido a la reducción de los mecanismos de selección celular conforme el tiempo de vida de un organismo avanza, tales alteraciones en el genoma contribuyen al proceso de envejecimiento (Vijg y Suh, 2013). Además, la inestabilidad genómica se ha asociado con el desarrollo de tumores sobre todo en cánceres hereditarios en los cuales se observa inestabilidad genómica en prácticamente todo tipo de tumores (Negrini, Gorgoulis y Halazonetis, 2010), este hallazgo concuerda con la hipótesis “mutadora” de la carcinogénesis la cual sugiere que las células precancerosas tienen inestabilidad genómica favoreciendo el desarrollo tumoral por incremento en la tasa de mutaciones espontáneas (Loeb, 1991; Nowell, 1976).

I.II. Enlaces covalentes cruzados y rupturas de doble cadena en el DNA

El DNA puede sufrir diferentes tipos de daño, entre ellos se incluyen a las modificaciones de bases, sitios abásicos, cambios de bases o distorsión de la doble hélice, rupturas de cadena sencilla o doble (SSB o DSB, por sus siglas en inglés) o enlaces covalentes cruzados (ICL, por sus siglas en inglés) (Roos y Kaina, 2013),

éstos dos últimos son de especial relevancia pues los ICL son un tipo de lesión sumamente deletérea; mientras que las DSB suponen una fuente de rearrreglos cromosómicos o mutaciones, lo cual dependerá del mecanismo por el cual se reparen como se discutirá más adelante.

Los ICL son un tipo de lesión que puede afectar al DNA, que pueden ser ocasionados por diferentes metabolitos endógenos, exposición ambiental, agentes quimioterapéuticos que poseen dos grupos reactivos, los cuales se unen de manera covalente a cada nucleótido de las cadenas del DNA, evitando la separación de las mismas e impidiendo la replicación y la transcripción, comprometiendo de esta manera la viabilidad celular (Roos y Kaina, 2013).

En las DSB los esqueletos de azúcar-fosfato de las dos hebras complementarias, se rompen de manera simultánea por lo que es una lesión bastante severa ya que se compromete la integridad de la información así como su continuidad. Los organismos eucariontes han evolucionado de tal manera que poseen distintos mecanismos para hacer frente a las DSB que de hecho se encuentran relacionados entre sí en mayor o menor medida; entre estos mecanismos se pueden mencionar a la recombinación homóloga, el alineamiento de secuencias sencillas, la unión de extremos no homólogos, la conversión génica y la replicación inducida por rupturas (Mehta y Haber, 2014). Algunos estudios estiman que se produce una DSB de manera espontánea por cada 10⁸ pb (Mehta y Haber, 2014; Vilenchik y Knudson, 2003).

I.III. Agentes endógenos inductores de ICL o DSB

Los ICL y las DSB se pueden generar de manera endógena como consecuencia de la generación de productos intermediarios resultado del metabolismo celular normal así como por la exposición a diferentes agentes reactivos. Existen diversos componentes del metabolismo capaces de generar ICL siendo los aldehídos de los principales (Figura 2) los cuales son derivados de la peroxidación de lípidos (Yu et al., 2015), de entre los aldehídos destacan el acetaldehído (Figura 3G), el cual también es producto intermedio del metabolismo del etanol. El acetaldehído se transforma en acetato por medio de una reacción enzimática que se lleva a cabo por la aldehído deshidrogenasa (ALDH2). En ausencia de la ALDH2

el acetaldehído se acumula y se une al DNA para formar aductos de N2 etileno-dG (Yu et al., 2012; Yukawa et al., 2014). Existen algunos modelos que ayudan a dilucidar como los aldehídos contribuyen a la inestabilidad genómica, entre éstos se incluyen el murino doble knockout para *Aldh2* y *Fancd2* (*Aldh2*^{-/-} *Fancd2*^{-/-}) el cual presenta letalidad embrionaria, sin embargo, cuando estos embriones se transfieren a una madre heterocigota para *Aldh2* son capaces de llegar a término pero presentan anomalías en el desarrollo y predisposición a leucemias, mientras que aquellos que no la desarrollaron presentaron anemia aplásica (Garaycochea et al., 2012).

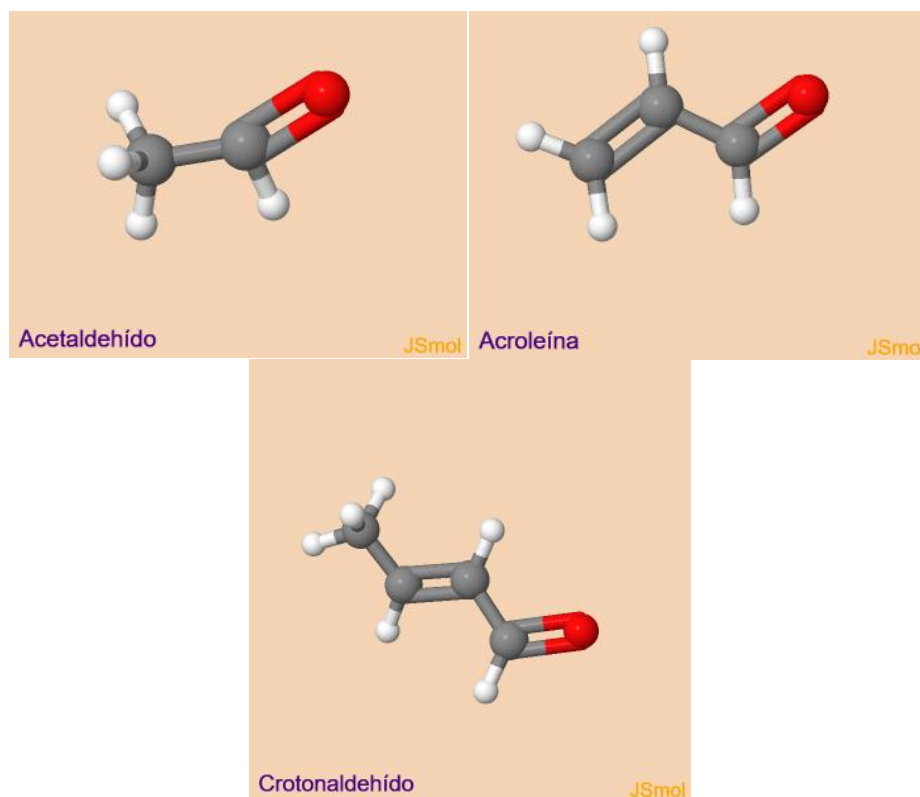


Figura 2. Los aldehídos se producen de manera endógena durante el metabolismo de lípidos, en la figura se muestran algunos de los cuales se ha reportado que participan en la producción de ICL. En gris átomo de carbono, en blanco hidrógeno y en rojo oxígeno. Imágenes realizadas en https://www.mn-am.com/online_demos/corina_demo_interactive.

Se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ERO) son capaces de generar diferentes formas de daño como rupturas de doble cadena, de cadena sencilla o ICL del tipo DNA-DNA o DNA-proteína. También el

óxido nítrico se ha reportado como fuente endógena de ICL producidos de manera independiente de la peroxidación de lípidos (Caulfield, Wishnok, and Tannenbaum 2003).

En el DNA tanto las bases como los azúcares son susceptibles de oxidación, lo que puede resultar en modificación de bases tales como la 8-oxoguanina (8-oxoG), rupturas de cadena sencilla (SSB, por sus siglas en inglés), así como ICL en proteínas (Imlay, 2003). Existe evidencia que sugiere que la transcripción del DNA es una fuente importante de DSB (Prado y Aguilera, 2005), además los DSB se generan como intermediarios en gran cantidad de procesos normales en la célula como son el caso de la recombinación V(D)J que ocurre en el ensamblaje de los genes antígeno receptor de las inmunoglobulinas, las DSB se generan también como producto intermedio durante el cambio de clase de las inmunoglobulinas (Soulas-Sprauel et al., 2007).

I.IV. Agentes exógenos inductores de ICL o DSB

Los ICL y DSB se pueden generar por exposición ambiental a diversos agentes químicos y por el uso de fármacos. Algunos factores ambientales que pueden contribuir son el humo de cigarro o el producido por la combustión de gasolinas en los automóviles como son la acroleína y el crotonaldehído (Pang y Andreassen, 2009). La radiación ionizante también es capaz de provocar gran cantidad de daño en las bases del DNA, así como en el esqueleto de azúcar fosfato produciendo SSB (Thompson, 2012; Ward, 1994). Se ha descrito que dosis altas de radiación pueden ocasionar SSB cercanos generando una DSB (Milligan et al., 1995) aunque el número de DSB ocasionados por la radiación ionizante son apenas un 10% de los SSB generados (Ma et al., 2012).

Existen diferentes agentes que se utilizan como quimioterapéuticos sobre todo en tratamientos contra distintos tipos de cáncer, entre los que se encuentran el diepoxibutano (DEB) o la mitomicina C (MMC). Aunque se ha observado que el uso de agentes inductores de ICL en pacientes de diferentes tipos de cáncer es efectivo, es difícil determinar si los ICL son una causa de cáncer en sí, esto debido a que muchos de los

quimioterapéuticos utilizados a menudo causan otro tipo de lesiones en el DNA (Deans y West, 2011) tales como alquilación de bases o enlaces covalentes interhebra.

La mostaza nitrogenada se utilizó como arma química durante la primera guerra mundial, tiempo después se empleó como quimioterapéutico aunque su mecanismo de acción no se había descrito, después le siguieron la MMC y el cisplatino como quimioterapéuticos inductores de ICL. Solamente el 5% del daño generado por estos compuestos corresponde a ICL que producen distorsión con desenrollamiento de la doble hélice de 2° a 6° y una curva de alrededor 10° (Dronkert y Kanaar, 2001; Rink y Hopkins, 1995).

El cisplatino (Figura 3B) se describió inicialmente como un compuesto con la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano a mediados de los años 60, este compuesto posee afinidad por las purinas lo que puede formar enlaces covalentes intrahebra así como ICL, los primeros se establecen en secuencias CpG o ApG. Por otra parte los ICL constituyen solo entre el 5-8% del daño producido por el cisplatino, estos ICL se crean únicamente en las regiones CpG uniéndose a la posición N7 de las guaninas (Figura 3C) (Malinge, Giraud-Panis, y Leng, 1999).

El 1,2,3,4-Diepoxibutano (DEB) el cual es un metabolito secundario producido durante el metabolismo del 1,3-butadieno, funciona como agente alquilante bifuncional el cual puede causar algunos tipos de daño entre lo que se encuentran monoadductos, ICL, SSB y DSB DNA-Proteína, en ensayos *in vivo* se ha reportado que los ICL son el tipo de daño de mayor importancia (Wen et al., 2011). El DEB tiene susceptibilidad por unirse de manera covalente a los residuos de guanina en las posiciones N1 y N7, la unión de dos guaninas en la posición N7 es la manera más común de formar el ICL (Figura 3C), la distorsión que produce el DEB sobre la doble hélice es de alrededor de 34° hacia el surco mayor.

La MMC es un agente alquilante bifuncional del DNA el cual se utiliza como antibiótico antitumoral así como medicamento anti cancerígeno citotóxico que se obtiene a partir de la actino bacteria *Streptomyces caespitosus* y se utiliza para tratar diferentes tipos de neoplasias como cáncer de vejiga, mama, cerviz, colorectal, anal, gástrico, tumores de cabeza y cuello, entre otros (Bradner, 2001).

Para generar ICL la MMC se debe metabolizar reduciendo el grupo quinona (Kennedy, Sartorelli, y Rockwell, 1980), se sabe que diferentes enzimas tienen la capacidad de llevar a cabo la reacción de reducción entre las que se incluyen la NADPH citocromo P450 reductasa, la xantina oxidasa, la citocromo b5 reductasa, la xantina deshidrogenasa y la DT-diasporasa se piensa que la DT-diasporasa es la enzima es el mecanismo principal para la reducción de la MMC (Cumings et al., 1998).

Se ha reportado que la activación de la MMC se ve favorecida en ambientes hipóxicos (baja concentración de oxígeno) como lo es el ambiente tumoral lo cual hace de ella un quimioterapéutico ideal (Tomasz, 1995). La MMC actúa sobre las secuencias CpG debido a su especificidad por las guaninas, donde puede unirse en la posición N2 de cadenas opuestas para formar un ICL (Figura 3A) o bien a la posición N7 donde constituirá monoadductos (Kumar et al., 1997; Tomasz, 1995). Los productos del daño por MMC se generan de manera desigual, el 50% de este daño se comprende por monoadductos, seguido de enlaces covalentes intrahebra con 35% y se encuentran finalmente los ICL con 15% (Warren, Maccubbin, y Hamilton, 1998). Cuando se generan ICL por MMC ésta se une por el surco menor lo que provoca distorsión negativa de la doble hélice (Norman et al., 1990).

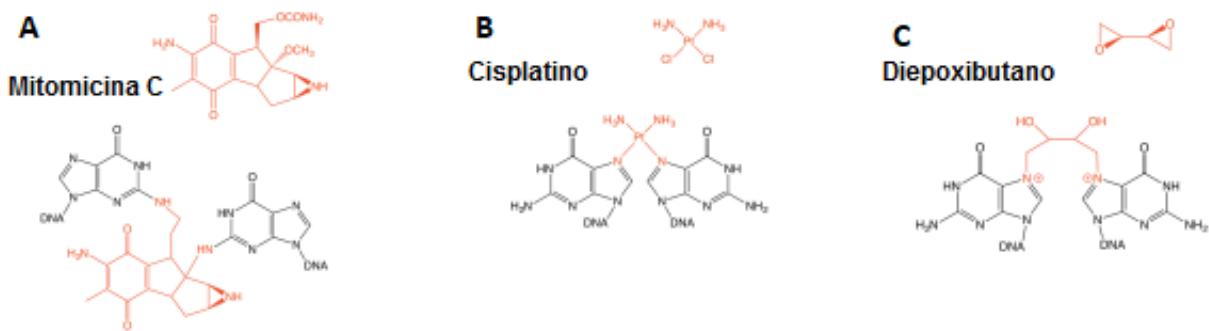


Figura 3. Estructura de diferentes agentes inductores de ICL junto con la estructura del ICL que forman: en A) mitomicina C, en B) cisplatino y C) diepoxibutano. Imagen modificada de Lopez-Martinez, Liang y Cohn 2016.

I.V. La Anemia de Fanconi (AF) y otros síndromes de inestabilidad genómica

En individuos sanos los mecanismos encargados de hacer frente al daño al DNA son capaces de responder de manera eficiente cuando tal daño tiene lugar, sin embargo, cuando las células de un individuo tienen defectos en alguno de los mecanismos de reparación, este sufre de algún síndrome de inestabilidad genómica como son ataxia telangiectasia (AT), síndrome de rupturas de Nijmegen o la anemia de Fanconi (AF) por mencionar algunos (Vermeij, Hoeijmakers, y Pothof, 2016).

Los síndromes de inestabilidad genómica comparten una serie de características entre las cuales se encuentran un patrón de herencia autosómica recesiva en su mayoría, retraso en el desarrollo físico y mental de manera general, además de forma común comparten dismorfias de diferente grado, disfunciones de órganos y sistemas, así como alto riesgo de predisposición a cáncer; las rupturas cromosómicas espontáneas son una característica menos común *in vitro* que en las células de los individuos afectados, las cuales presentan tasas altas de rupturas cromosómicas o inestabilidad lo cual se puede ver reflejado en rearrreglos cromosómicos (Wu, 2016). En la Tabla 1 se resumen algunas de las características en común de diferentes síndromes de inestabilidad cromosómica.

Tabla I. Características genóticas y fenotípicas de los síndromes de inestabilidad genómica.

Síndromes	Fenotipos	Locus	Genes	Función proteica	Predisposición a cáncer
Anemia de Fanconi	Anormalidades congénitas Falla medular	Varios	<i>FANCA, A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W</i>	Varias	Si
Síndrome de rupturas de Nijmegen	Microcefalia y retraso mental Inmunodeficiencia Radio sensibilidad	8q21.3	<i>NBS1</i>	Proteína con dominio BRC, reparación de DSB	Si
Síndrome de Bloom	Inmunodeficiencia Envejecimiento prematuro	15q26.1	<i>NML</i>	Helicasa de DNA	Si
Ataxia telangiectasia	Neurodegeneración Inmunodeficiencia Envejecimiento prematuro Radio sensibilidad	11q23	<i>ATM</i>	Proteína cinasa	Si
Ataxia telangiectasia like	Degeneración cerebelar Radio sensibilidad	11q21	<i>MRE11</i>	Exonucleasa/ Endonucleasa	Propuesto

Modificada de Wu, 2016.

La AF es una enfermedad genética, descrita por primera vez en 1927 por el pediatra suizo Guido Fanconi, quien estudio a los miembros de una familia en donde tres hijos presentaban anomalías físicas diversas así como características que recordaban a la anemia perniciosa, llegando a la conclusión de que tal complejidad en la enfermedad no podía deberse a un solo defecto genético (Lobitz y Velleuer, 2006). Actualmente se reconoce a la AF como síndrome genéticamente heterogéneo (poligénico) cuya herencia es predominantemente autosómica recesiva aunque para algunos genes la herencia es ligada al X (*FANCB*) o autosómica dominante (*FANCR*). La AF se debe a mutaciones bialélicas heredadas en alguno de los 22 genes (Tabla 2) de la vía FA/BRCA la cual es responsable de la reparación de ICL en el DNA (Bluteau et al., 2016; Knies et al., 2017), debido a esta deficiencia en la reparación las células AF son hipersensibles a los agentes inductores de ICL. Mutaciones en los genes *FANCA*, *FANCC* y *FANCG* que abarcan juntos alrededor del 80% de los pacientes (Tabla 3, Figura 4). Esta hipersensibilidad se manifiesta como una frecuencia

elevada de aberraciones cromosómicas (AC), que incluyen DSB no reparadas y figuras de intercambio radial entre cromosomas no homólogos (REF, por sus siglas en inglés) (Figura 5). La presencia de REF ha llevado a los estudios de AF a sugerir que la unión de extremos no homólogos clásica (cNHEJ, por sus siglas en inglés) es la encargada de religar a las DSB en ausencia de una vía FA/BRCA funcional (Auerbach, 2003). Los pacientes de AF presentan un espectro amplio de características las cuales se clasifican en tres grupos principales: malformaciones congénitas, falla medular y predisposición a cáncer.

Tabla II. Genes de la vía FA/BRCA.

Gen	Locus	Tamaño del gen (pb)	Tamaño de la proteína (kDa)	Función	Referencia
FANCA	16q24.3	79,110	163	Complejo central	(Apostolou et al., 1996; Ten Foe, et al., 1996)
FANCB	Xp22.31	77,165	95	Complejo central	(Meetei et al., 2004)
FANCC	9p22.3	327,743	63	Complejo central	(Strathdee, Duncan, y Buchwald, 1992)
FANCD1/BRCA2	13q12.3	85,405	380	Recombinación Homóloga	(Howlett et al., 2002)
FANCD2	3p25.3	75,546	162	Complejo FANCD2/FANCI	(Timmers et al., 2001)
FANCE	6p21.3	14,768	60	Complejo central	(de Winter et al., 2000a)
FANCF	11p15	4,269	42	Complejo central	(de Winter et al., 2000b)
FANCGXRCC9	9p13	6,182	68	Complejo central	(Joenje et al., 1997)
FANCI	15q26.1	73,314	149	Complejo FANCD2/FANCI	(Dorsman et al., 2007; Sims et al., 2007; Smogorzewska et al., 2007)
FANCL/BRIP1/BACH1	17q22	184,752	140	Helicasa	(Levitus et al., 2005; Levrán et al., 2005; Litman et al., 2005)
FANCL/PHF9	2p16.1	82.439	43	Complejo central y Ubiquitin ligasa	(Meetei et al., 2003)
FANCM	14q21.3	64.958	250	Helicasa y complejo central	(Meetei et al., 2005)
FANCN/PALB2	16p12	38.198	130	Recombinación Homóloga	(Reid et al., 2007)
FANCO/RAD51C	17q25.1	43,076	42	Recombinación Homóloga	(Vaz et al., 2010)
FANCP/SLX4	16p13.3	30.434	200	Reclutador de Endonucleasas	(Kim et al., 2011; Stoepker et al., 2011)
FANCO/XP/ERCC1	16p13.1 2	32,204	101	Endonucleasa	(Bogliolo et al., 2013)
FANCP/RAD51	15q15	37,566	37	Recombinación homóloga	(Ameziane et al., 2015)
FANCS/BRCA1	17q21	125,951	207	Recombinación homóloga	(Sawyer et al., 2015)
FANCT/TUBE2T	1q32.1	10,324	23	Transferencia de Ubiquitina	(Virts et al., 2015)
FANCU/XRCC2	7q36.1	31,387	32	Recombinación homóloga	(Park et al., 2016)
FANCV/REV7/MAD2L2	1p36	17,309	24	Síntesis translesión	(Bluteau et al., 2016)
FANCW/RFD3	16q23.1	45,499	85	Transferencia de ubiquitina	(Knies et al., 2017)

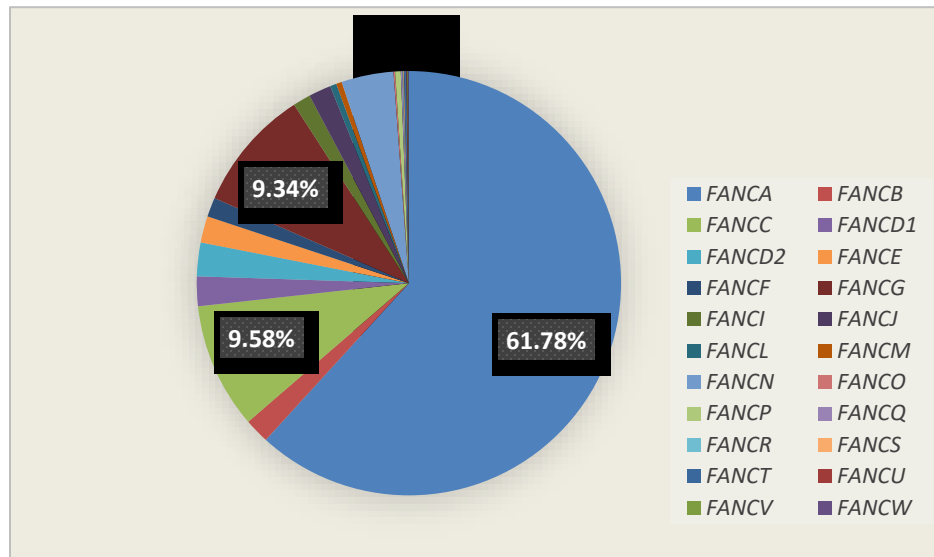


Figura 4. Heterogeneidad genética en la anemia de Fanconi, datos de las variantes patogénicas reportadas en bases de datos públicas para cada uno de los 22 genes FANC. Consultado en Leiden Open Variation Database (LOVD) [<http://www2.rockefeller.edu/fanconi/>] el 3 de Septiembre de 2018.

I.V.I. Aspectos clínicos

Los pacientes de AF presentan una gran cantidad de alteraciones fenotípicas e inclusive existen pacientes sin ninguna anomalía aparente. Una característica sugestiva de AF son los defectos del eje radial tales como pulgares bífidos o supernumerarios, aplasia o hipoplasia de radio o pulgares, anomalías esqueléticas en vértebras, gastrointestinales, fístula traqueoesofágica, alteraciones renales como riñón en herradura, así como cardíacas (Van Der Lelij et al., 2010). El retraso en el crecimiento y el bajo peso al nacimiento son comunes en los pacientes de AF, además de algunas anomalías en la pigmentación de la piel como son la presencia de manchas café con leche o la hiperpigmentación. Existen otros defectos que pueden manifestarse o hacerse más evidentes con el paso del tiempo como son deterioros en el oído, oculares y en el sistema nervioso central. Otra característica común en los pacientes con AF es la estatura baja debido a falla del sistema endocrino (Giri et al., 2007; Wajnrajch et al., 2001). Este patrón de malformaciones es ampliamente variable tanto inter- como intrafamiliar donde incluso gemelos monocigóticos presentan diferencias.

En el segundo grupo se encuentran las características hematológicas las cuales rara vez se manifiestan desde el nacimiento, sino que esto ocurre alrededor de los siete años. Los pacientes de AF se caracterizan por la presencia de falla medular generalizada lo cual se hace evidente por la presencia de hematomas recurrentes, petequias, sangrado y fatiga, debido a la trombocitopenia así como infecciones del tracto respiratorio recurrentes por leucopenia. La hipoplasia de la médula ósea ocurre en tiempo variable y progresa hacia anemia aplásica y pancitopenia cuando al menos dos o tres linajes sanguíneos se encuentran afectados (Butturini et al., 1994).

La predisposición a cáncer es el tercer grupo de características principales de los pacientes de AF tanto a cánceres hematológicos como síndrome mielodisplásico y leucemia mieloide aguda con aproximadamente de 40 al 60% de individuos afectados a los 40 años, así como tumores sólidos principalmente carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (con riesgo incrementado de 500-700 veces más que la población general) (Rosenberg, Tamary, y Alter, 2011). Se sabe que las mutaciones en *FANCA*, *FANCC* y *FANCG* se encuentran en cerca del 90% de los pacientes, además se observa que en los que tienen mutaciones en *FANCS*, *FANCR*, *FANCO* y *FANCU* no presentan, al menos de momento falla medular o predisposición a leucemias (Rodríguez y D'Andrea, 2017).

I.V.II. Aspectos celulares

A diferencia del fenotipo clínico de los pacientes de AF que es sumamente heterogéneo, el fenotipo celular es común en todas las células afectadas el cual se caracteriza por presentar una frecuencia elevada de AC espontáneas así como hipersensibilidad a agentes que son capaces de inducir ICL, como la MMC, DEB o cisplatino (Niedernhofer, Lalai y Hoeijmakers, 2005). Entre las AC que se generan se encuentran rupturas de cadena sencilla, DSB, así como las figuras de radiales que involucran al menos dos cromosomas y son características de las células de AF (Figura 5) (Bogliolo y Surrallés, 2015). El ensayo de AC es la metodología con la cual se realiza la confirmación y el diagnóstico diferencial de AF (Oostra et al., 2012).

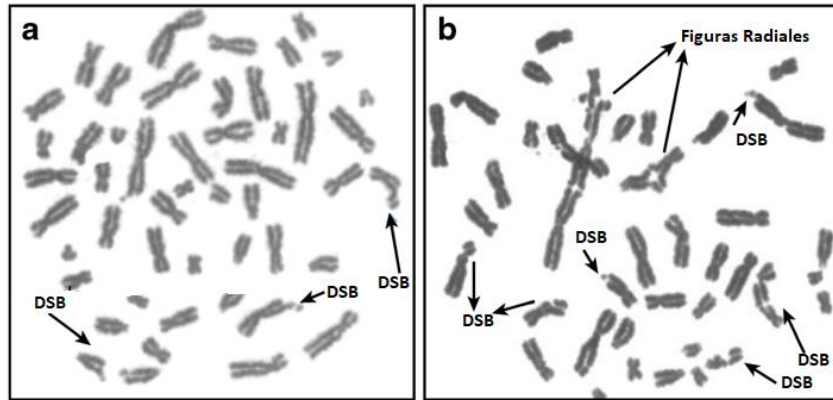


Figura 5. Prueba de rupturas cromosómicas con MMC (40 ng/ml) en linfocitos normales (a) y linfocitos de un paciente con AF (b), en ambas se puede observar la presencia de DSB mientras que las figuras radiales se observan únicamente en las células del paciente AF. Imagen modificada de Sevilla-Montoya et al. 2017.

Debido a su hipersensibilidad a los agentes inductores de ICL las células con mutaciones en los genes de la vía FA/BRCA presentan arresto en la fase S tardía y G_2 del ciclo celular, lo cual es dependiente de CHK1 cuando se exponen a este tipo de agentes (Guervilly, Macé-Aimé, y Rosselli 2008). Otra característica de las células AF es la sobreexpresión de proteínas componentes de la cNHEJ, esto ocurre debido a que algunas proteínas participantes de la vía FA/BRCA participan además en la supresión de la cNHEJ, entre ellos se encuentra FANCD2 por su actividad de endonucleasa que genera estructuras en la DSB únicamente son capaces de reconocer las proteínas de reparación por cHR (Adamo et al., 2010; Pace et al., 2010), además de presentar incrementado el porcentaje de muerte celular por apoptosis.

I.VI. La vía FA/BRCA participa en la reparación de los ICL

Aunque los ICL se pueden detectar en diferentes fases del ciclo celular como durante la fase G_1 esto ocurre principalmente en la fase S debido a que se reconoce el arresto de las horquillas de replicación producido el ICL (Clauson, Scharer y Niedernhofer, 2013). Los ICL se reparan por medio de la vía FA/BRCA (Schwartz y D'Andrea, 2010) (Figura 6). en la cual participan diversas proteínas entre las que se incluyen a las de AF, es decir aquellas de las que se han identificado pacientes con al menos una mutación en los genes que codifican para dicha proteína así como proteínas asociadas, además de proteínas que pertenecen a

diferentes vías de reparación como la reparación por escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés), la reparación por síntesis traslesión y la reparación por recombinación homóloga.

La vía FA/BRCA se puede dividir en tres secciones principales que a continuación se describen:

- La parte río arriba. En el inicio de la vía FA/BRCA el complejo FANCM-FAAP24-MHF1/2 reconoce a las horquillas de replicación arrestadas por el ICL debido a la estructura particular que adquiere el DNA, este complejo a su vez recluta al complejo central o *core* compuesto además del complejo FANCM-FAAP24-MHF1/2 por las proteínas FANCA, B, C, E, F, G, L (Kee y D'Andrea, 2010) así como FAAP100, FAAP20 y UBE2T (FANCT).
- La monoubiquitinación de FANCD2/FANCI. La segunda parte de la vía FA/BRCA se compone de la monoubiquitinación del complejo FANCD2/FANCI, lo cual se lleva a cabo por una cadena de transferencia de las ubiquitinas en la que participan 3 enzimas diferentes, la E1 que corresponde a la activación, la E2 que colabora en la conjugación y la E3 que contribuye al ligamiento de la ubiquitina, la enzima E2 en la vía FA/BRCA es UBE2T (FANCT) mientras que la enzima con función E3 es FANCL (Schwertman, Bekker-Jensen y Mailand 2016). Además de la monoubiquitinación el complejo FANCD2/FANCI requiere de fosforilación lo cual se lleva a cabo por la cinasa ATR (Ishiai et al., 2008).
- La sección río abajo. La monoubiquitinación del complejo FANCD2/FANCI induce el reclutamiento de la endonucleasa FAN1 así como de la proteína de andamiaje SLX4 (FANCP) que contiene sitios de unión para las endonucleasas SLX1, MUS81 y XPF (FANCO) (Kim et al., 2013). El siguiente paso consiste en realizar cortes en ambos lados de una de las cadenas involucradas en el ICL los que se realizan por la acción de endonucleasas, XPF efectúa esta función de manera preferencial aunque dependiendo de la estructura del ICL pueden participar SLX1, MUS81 o FAN1, esta escisión genera tres intermediarios de reparación: un SSB, un monoadocto y un DSB.

El SSB es el primer intermediario que se repara gracias a el mecanismo de síntesis translesión de DNA, al mecanismo de tolerancia de daño al DNA que permite evitar el estancamiento prolongado de la horquilla de replicación a costa de la integridad del mensaje genético, lo que implica que es una potencial fuente de mutaciones. Dicho mecanismo se lleva a cabo de manera coordinada por las polimerasas de síntesis translesión (TLS) [REV1 y POL ζ , un heterodímero compuesto por REV1 y REV7 (FANCV)], que son polimerasas propensas a error capaces de sobrepasar al aducto generado para añadir nucleótidos en la hebra complementaria (Kim y D'Andrea 2012), la hebra reparada servirá posteriormente como cadena molde durante la cHR. Aún no está del todo claro cómo es que participan juntas estas dos polimerasas TLS, sin embargo la evidencia sugiere que REV1 puede funcionar como una proteína de andamiaje (de manera similar a FANCP) para diferentes polimerasas de síntesis translesión entre las que se incluye a POL ζ (Guo, Sonoda et al. 2006; Guo Tang et al. 2006).

El monoaducto se repara por medio de la vía NER, la cual es capaz de reconocer y reparar removiendo las moléculas que producen distorsiones en la doble hélice de DNA y SSB. De manera general en esta vía de reparación existe un complejo de reconocimiento entre sus componentes se encuentran XPC, este complejo censa el daño y posteriormente se recluta a las helicasas XPB y XPD junto con otras proteínas que forman un complejo, entre estas proteínas se incluyen las endonucleasas XPF (FANCP) y XPG que realizan cortes en la cadena dañada y a ambos lados del monoaducto, después se une PCNA junto con polimerasas (δ , ϵ y κ) de DNA para resintetizar el segmento cortado y finalmente se sella por medio de la ligasa 1 (Martelijn et al., 2014).

Las DSB son el tercer tipo de lesión que se repara principalmente por dos vías la cHR y la cNHEJ. Durante la vía FA/BRCA las DSB se reparan por la primera la cHR ya que la vía FA/BRCA funciona durante la fase S del ciclo celular y en la fase G₂ temprana, además existe evidencia que sugiere que la vía FA/BRCA favorece la reparación de las DSB por la recombinación homologa clásica (cHR) (Kee y D'Andrea, 2010).

La cHR es una vía libre de error en la cual se utiliza a una de las cadenas de DNA como molde para reparar de manera fiel el segmento de DNA dañado. Durante la fase inicial de la cHR MRE11, un componente del complejo MRN (MRE11-RAD50-NBS1), realiza una incisión en el extremo 5' del DSB cerca de 300 pb río arriba por medio de su actividad endonucleasa y extiende la resección en dirección 3' a 5' por medio de su actividad de exonucleasa lo que genera extremos salientes 3', para lo cual es necesaria la interacción con CtIP; se piensa que esta modificación del DSB separa al heterodímero KU70/KU80 conduciendo la reparación hacia la cHR, en el siguiente paso participan el complejo BRCA1-BARD1 que participan como reguladores de la resección así como enlace para los pasos posteriores. Después los extremos salientes 3' son recubiertos por el complejo RPA el cual se conforma de RPA1 y RPA2, este filamento de DNA-RPA es blanco de RFWD3 (FANCW) el cual transfiere ubiquitininas a los monómeros de RPA promoviendo los siguientes pasos de la cHR en donde se da el recambio de los monómeros de RPA por RAD51 (FANCR) con ayuda de las proteínas BRCA2 (FANCD1) que participa en el desplazamiento de RPA por medio de sitios de unión a SEM1, ssDNA, RAD51 y el complejo BRCA1-BARD1 a través de PALB2 (FANCN), además BRCA1 (FANCS) RAD52, RAD54, BRIP1 (FANCI) contribuyen para la estabilización del filamento (Kee and D'Andrea 2010). La carga de RAD51 en el extremo saliente 3' permite la búsqueda de homología en invasión en una cadena molde la cual es necesaria para llevar a cabo la reparación por cHR, proceso en el que también participa BRCA1-BARD1, los filamentos de nucleoproteína de RAD51 forman el complejo sináptico que contiene un intermediario de tres hélices de DNA lo que facilita la formación del heteroduplex conformado por la hebra invasora así como por la cadena complementaria del DNA invadido, a continuación si el apareamiento de bases es suficiente se establece la sinapsis y se desplaza la hebra no apareada de la molécula de DNA invadida formando el D-loop, este proceso se lleva a cabo por medio de la hidrólisis de ATP que realiza RAD51 y el desensamblaje de RAD51 del ssDNA. El extremo 3' de la hebra invasora se acopla a la DNA polimerasa δ que extiende la hebra invasora utilizando la hebra complementaria como molde. La manera en que culmina la reparación depende del grupo celular en que se lleve a cabo, cuando

se trata de una célula somática la reparación culmina en alineamiento de hebra dependiente de síntesis, un mecanismo en el cual solamente uno de los extremos del DSB invade la hebra molde mientras que el segundo filamento se resecciona pero permanece pasivo, este último extremo se alinea con la hebra naciente facilitando la terminación de la recombinación homóloga (HR). Debido a que no existe la formación de una unión de Holliday se dice que en este mecanismo de HR no existe entrecruzamiento. Por otra parte, cuando la reparación se lleva a cabo en células gaméticas se forman dos entrecruzamientos entre las hebras invasoras y las invadidas conocidas como uniones de Holiday en las cuales el DNA está entrelazado a dichos intermediarios que son resueltos por diferentes complejos de resolución entre los que se incluyen a XRCC3-RAD51C (FANCO), dando como resultado o no recombinación de estas hebras (Figura 6) (San Filippo, Sung y Klein, 2008).

Durante la reparación de la DSB el complejo MRN además permite reclutar a la cinasa ATM, la cual fosforila a una variedad de proteínas entre las que se incluyen la histona H2AX, cuya fosforilación es un marcador de daño en el DNA que mantiene activo el bloqueo del ciclo celular mientras se lleva a cabo la reparación (Burma et al., 2001).

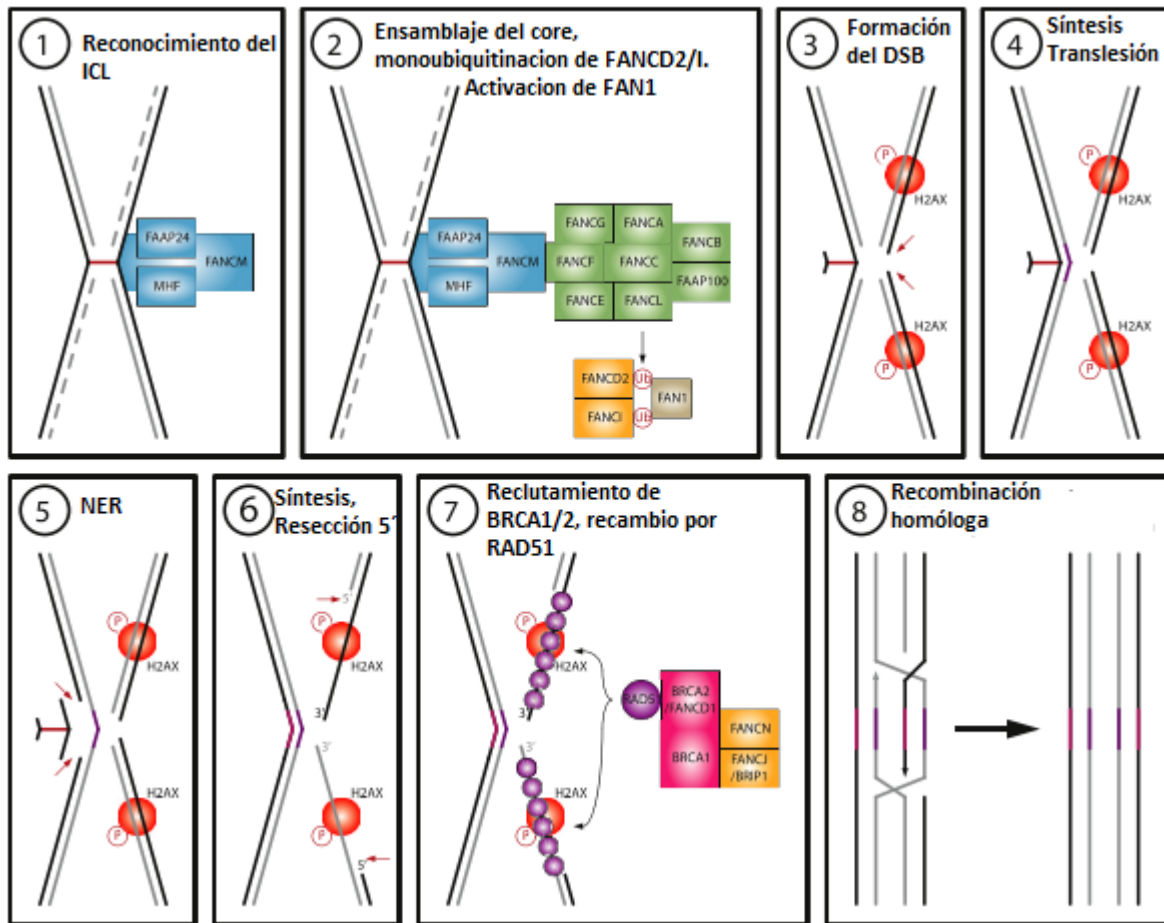


Figura 6. Esquema representativo de la vía FA/BRCA, en el que indican los eventos principales como el reconocimiento del sitio de daño, el reclutamiento del complejo *core*, el corte en el DNA y la reparación por NER y HRR. Imagen modificada de Stecklein y Jensen, 2012.

I.VII. Mecanismos de reparación de DSB alternos a la vía FA/BRCA

Cuando la vía FA/BRCA es funcional las DSB generadas después de desenganchar el ICL se reparan mediante cHR la cual actúa durante las fases S y G₂ del ciclo celular y se bloquean otras vías de reparación como la cNHEJ que actúa a lo largo de todo el ciclo celular y es el mecanismo principal para la reparación de DSB (Kee y D'Andrea, 2010; Kim et al., 2013).

Durante la reparación por cNHEJ (Figura 7), no se utiliza DNA como molde para la reparación sino que los extremos rotos de las cadenas de DNA son unidos y ligados directamente por lo cual se dice que esta vía es propensa a error, además se sabe que para formar los apareamientos entre los extremos a reparar

requiere de solo 4 pb de homología. La cNHEJ se compone de dos pasos de sinapsis, en el primero de ellos conocido como sinapsis de largo alcance el heterodímero Ku se une a los extremos rotos, Ku está compuesto por dos subunidades (KU70 y KU80) y es una de las proteínas nucleares más abundantes. Ku posee una afinidad alta por extremos de DNA y es capaz de unirse a estos antes de la elección de un mecanismo de reparación, la unión de KU70/KU80 al DSB permite reclutar a la proteína DNAPKcs que es la subunidad catalítica, una vez que se constituye la forma activa u holoenzima (Meek, 2009) este complejo tiene la capacidad de autofosforilarse así como fosforilar a diferentes factores de reparación tales como RPA2, una subunidad de 34 kDa de RPA, XLF/Cernunnos, WRN, ligasa IV (LigIV), XRCC4 y la exonucleasa Artemis para activarlos (Cruet-Hennequart et al., 2008; Otsuki et al., 2007; Soubeyrand et al., 2006; Yu et al., 2008). La autofosforilación de DNA-PKcs provee la energía necesaria para llevar a cabo su cambio conformacional; una vez activado el complejo holoenzima el siguiente paso es el procesamiento de los extremos libres de la DSB, en este paso actúan diferentes proteínas tales como PNK, TDT, así como la exonucleasa Artemis quien junto con el complejo MRN reseccionan los extremos del DNA así como las polimerasas μ y λ las cuales rellenan los huecos presentes en la ruptura (Lans, Marteijn y Vermeulen, 2012). En el segundo paso de sinapsis participan XLF, funciones no catalíticas de XRCC4-LIG4 y la actividad catalítica de DNA-PKcs, en este paso se alinean los extremos del DSB. Finalmente los extremos son reunidos por la el complejo formado por XLF-XRCC4-LIG4-PAXX.

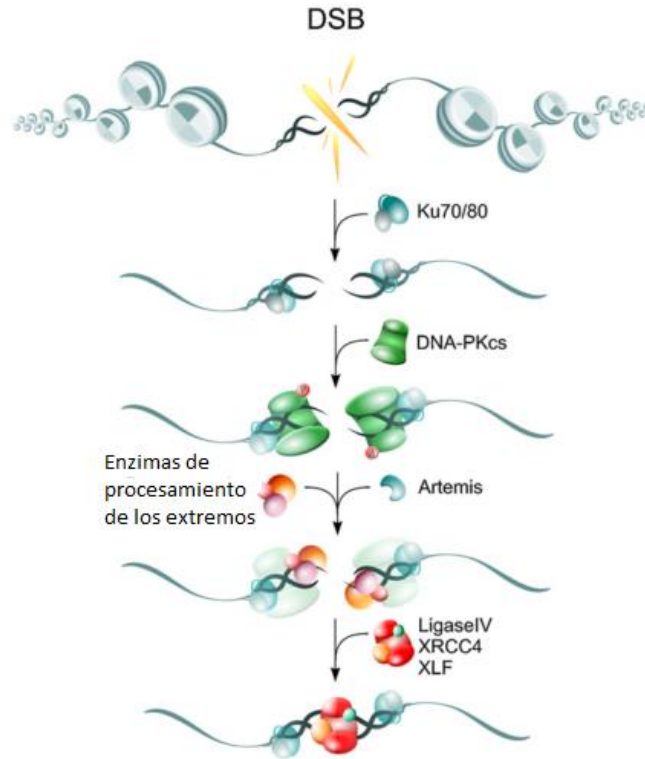


Figura 7. Esquema representativo de la cNHEJ durante la reparación de DSB, se muestran los pasos principales de esta vía. Imagen modificada de Mladenov y Iliakis, 2011.

Recientemente se han reportado rutas alternas de reparación de DSB en el DNA, una de ellas es la unión de extremos no homólogos alterna (aNHEJ) (Figura 8). Se ha observado la aNHEJ en líneas celulares de diferentes organismos, como pollo (células DT40), en las que se demostró que no toda la actividad de religamiento de DSB se debe a la cNHEJ (Hanlon Newell et al. 2008). Existe evidencia de una amplia actividad de unión de extremos rotos de DNA en células mutantes para el heterodímero Ku (Wang et al., 2001) y para LIG4 (Wang et al., 2001), así como en células proficientes para la cNHEJ que son tratadas con inhibidores de la DNA-PK (Wang et al., 2001). Existen reportes de la presencia de éste mecanismo en algunos tumores, la aNHEJ se distingue de la cNHEJ por la presencia de micro homología en el DNA reparado además de ser un mecanismo de reparación más lento (Bennardo et al., 2008). Al igual que la

cNHEJ la aNHEJ es capaz de funcionar durante cualquier fase del ciclo celular aunque se ha observado que su mayor actividad es en las fases S y G₂ (Mladenov et al., 2013).

Aunque la dinámica de esta vía es muy similar a la cNHEJ en sus procesos (reconocimiento de la DSB, procesamiento, unión y ligamiento de los extremos) las proteínas que participan no son las mismas. Durante la aNHEJ el reconocimiento inicial de la DSB se lleva a cabo por PARP1 el cual compite con KU por la unión a las DSB debido a la afinidad de ambas proteínas por los DSB. Es característico de esta vía la presencia de micro homologías entre las cadenas reparadas, se piensa que el complejo MRN y CtIP pudiesen ser responsables de ello por medio de reseccionar estas cadenas y favorecer la reparación por aNHEJ; lo que parecía inicialmente poco probable debido a su participación en la CHR, sin embargo hay evidencia que lo sugiere (Davis y Chen, 2010; Deriano et al., 2009; Rahal et al., 2010; Rass et al., 2009; Xie, Kwok, y Scully, 2009). Así como se piensa que Ku participa en el alineamiento de los extremos durante la cNHEJ (Feldmann et al., 2000), existe evidencia *in vitro* que sugiere que la histona H1 realiza una función similar durante la aNHEJ (Rosidi et al., 2018). El ligamiento de los extremos lo realizan el complejo formado por la DNA ligasa 3 (LIG3) y XRCC1 así como la DNA ligasa 1 (LIG1). Se ha reportado además que otras proteínas participan en la vía aunque su función no está del todo clara, tal es el caso de WRN que forma un complejo estable con LIG3 el cual es afín a las DSB (Sallmyr, Tomkinson, y Rassool 2018).

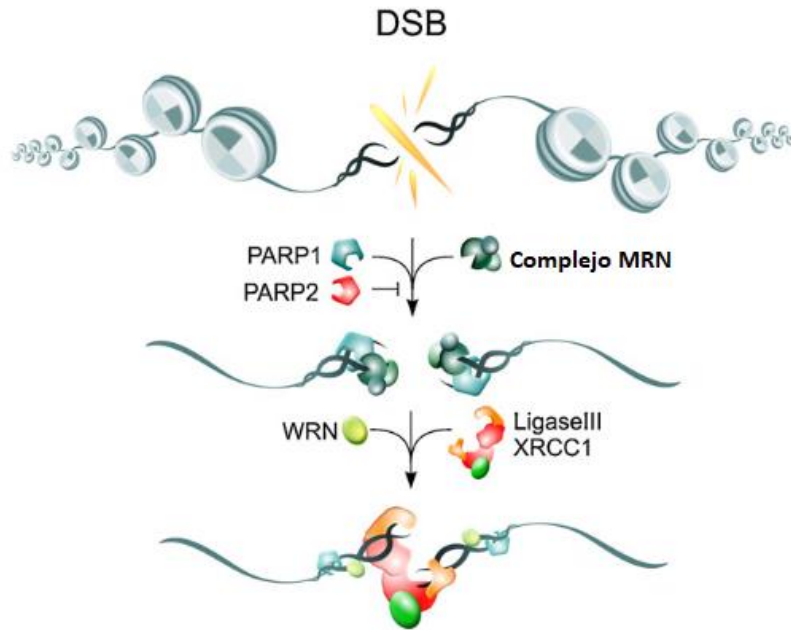


Figura 8. Esquema de la aNEJ. Modificada de Mladenov y Iliakis, 2011.

Otra vía de reparación es la recombinación homóloga alterna (aHR), la cual no se ha caracterizado totalmente; sin embargo existe evidencia que sugiere su existencia. Se ha observado que en células de pacientes de AF y en modelos animales con mutaciones en componentes de la vía FA/BRCA se observan *foci* de RAD51 en los sitios de las DSB (Digweed et al., 2002; Godthelp et al., 2002; Zwet et al., 2002), esto indica que a pesar de ser incapaces de activar la HR por medio de la vía FA/BRCA RAD51 puede reclutarse a los sitios de las DSB y ejercer un papel en su reparación (Gebhart et al., 1985; Godthelp et al., 2002; Latt et al., 1975).

El ensayo de intercambio de cromátidas hermanas (SCE, por sus siglas en inglés) es una herramienta clásica para evidenciar eventos de HR, ésta ha sido ampliamente utilizada en modelos así como en células de pacientes de AF. Cuando se midió la frecuencia de SCE en células con mutaciones en distintos genes *FANC* los resultados mostraron diferencias mientras en algunos trabajos no se encontraron diferencias en la frecuencia de SCE al comparar con individuos sanos (Gebhart et al., 1985; Godthelp et al., 2006; Latt et al., 1975), en otro grupo se encontró decremento en la frecuencia de SCE (Latt et al., 1975; Porfirio et al.,

1983), y en un tercer grupo se encontró aumento en la frecuencia (Billardon y Moustacchi, 1986; Miura, Morimoto y Koizumi, 1983), estos datos aparentemente contradictorios sugieren la existencia de más de un mecanismo de HR que participa en la reparación de las DSB (Thompson y Hinz, 2009).

Estos mecanismos de reparación de DSB son objeto de muchos estudios que han permitido comenzar a comprenderlos así como conocer sus componentes y el entorno en los que actúan, sin embargo no se ha reportado su participación y relevancia en las células AF.

I.VIII. Inhibidores químicos en el estudio de la reparación del DNA

Existen diferentes estrategias para el estudio de los mecanismos de reparación de DNA, ya sea mediante el estudio de líneas celulares derivadas de pacientes, o bien en organismos modelo, una manera de hacerlo es por medio de generar mutaciones en organismos modelo o bien identificar mutaciones en células humanas (Kim et al., 2015; Knies et al., 2017) o el uso de RNA de interferencia (siRNA) cuyo blanco son mRNA específicos modificando la expresión de su proteína (Castella et al., 2015; Kim et al., 2011). Otra estrategia es el uso de inhibidores químicos específicos los cuales pueden unirse a la proteína de interés impidiendo su actividad o compiten con ellas por los blancos (Aguilar-Quesada et al., 2007; Alagpulinsa et al., 2014).

La 4-amino-1,8-naphtalimida (4AN) es un potente inhibidor de PARP1 cuyo mecanismo de acción no se conoce con exactitud, pero se piensa que compite con PARP1 por las moléculas de NAD⁺ uniéndose a ellas e impidiendo así a formación de poli(ADP ribosa), además sensibiliza a las células a la radiación gamma y potencia la citotoxicidad del 1-metil-3nitro-1nitroguanidina (Vodenicharov et al., 2000). Este inhibidor es específico de fase S y se sabe que induce arresto en la horquilla de replicación además de generar DSB cuando las células se exponen prolongadamente en células que se dividen de manera rápida (Noël et al., 2006).

Actualmente se utilizan inhibidores de PARP en el tratamiento de tumores con mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* como son el Iniparib y Olaparib (Vinayak y Ford, 2012). Se ha empleado el inhibidor 4AN en el tratamiento de diferentes enfermedades como son desordenes neuro inflamatorios, enfermedades virales

así como en el tratamiento de cáncer (Kamal et al., 2013). Se observó que en células hepG2 de carcinoma hepatocelular, el tratamiento combinado de 4AN y trióxido de arsénico produce que la eficiencia de la reparación del DNA sea menor, además se notó reducción en la viabilidad celular y el número de colonias formadas (Li et al., 2015).

El compuesto 3(fenilmetil)-2-[(1E)-2-(3-piridinil)etenil]-4(3H)-quinazolinona (B02) es un inhibidor altamente específico de RAD51 humano, el cual se une al dominio de unión al DNA de cadena sencilla (ssDNA) de RAD51 lo que impide su adhesión a la hebra de DNA así como la formación del microfilamento de RAD51, además esto impacta en eventos posteriores como la migración de la cadena ya que se impide la unión de RAD51 al DNA de cadena doble (dsDNA) suprimiendo la HR. Además se sabe que este inhibidor sensibiliza a la célula a agentes inductores de ICL y DSB en particular cisplatino y MMC (Huang et al., 2012). Se ha descrito que en el inhibidor B02 reduce la viabilidad celular e induce muerte celular por apoptosis en células de mieloma múltiple cuando se utiliza de manera conjunta con doxorrubicina, un agente inductor de DSB muy comúnmente utilizado como quimioterapéutico en mieloma múltiple. Las células de mieloma múltiple tienen sobre expresado *RAD51*, así como hiperactivación de HR. Este efecto citotóxico no se observó en células B normales CD19+ cuyos niveles de RAD51 son los normales (Alagpulinsa et al., 2014).

II. OBJETIVOS

Objetivo general.

Describir mecanismos alternos de reparación de rupturas de doble cadena generadas a partir de un enlace covalente cruzado en células deficientes en la vía FA/BRCA.

Objetivos particulares.

1.- Determinar si existe algún cambio en la sobrevivencia celular y sobre la integridad del DNA de las células AF-A al bloquear la funcionalidad de la NHEJ, aNHEJ o aHR por medio de inhibidores químicos y someterlas a tratamiento con MMC.

2.- Determinar si el tratamiento con los inhibidores químicos induce cambios en la cantidad y localización a los sitios de DSB de las proteínas de NHEJ, aNHEJ o aHR al someterlas a tratamiento inductor de ICL como la MMC.

3.- Describir la posible activación de las vías de NHEJ, aNHEJ y aHR en respuesta a DSB generadas a partir de ICL en células AF-A.

III. ANTECEDENTES

III.I. Antecedentes directos

Nuestro grupo de trabajo realizó un modelo computacional de lógica booleana de la vía FA/BRCA en el cual se simularon mutaciones en diferentes genes de la vía, tanto en genes río arriba, del complejo central y río abajo, en este modelo las entradas (daño genómico) que se simularon fueron ICL, DSB y aductos. El modelo arrojó varias predicciones, una de ellas sugiere que en las células AF que sufren daño en el DNA causado por agentes inductores de ICL una de las cadenas de DNA se corta por medio de endonucleasas alternas a las que participan en la vía FA/BRCA, proponiendo como probable candidato a XPF/ERCC1/FANCD1. Este modelo propone además que cuando los mecanismos canónicos de cHR y cNHEJ no funcionan, la célula puede responder al daño por ICL por una vía que utiliza al complejo MRN dirigiendo la reparación de los DSB a una vía de recombinación homóloga independiente de la vía FA/BRCA, es decir la aHR. Finalmente otra de las predicciones obtenidas sugiere que un mecanismo capaz de liberar el arresto de G₂ conocido como "*checkpoint recovery*" participa regulando negativamente a la vía FA/BRCA. Estas hipótesis en conjunto sugieren que en ausencia de la vía FA/BRCA se activan mecanismos alternos de reparación además de la NHEJ que contribuyen a mantener la integridad genómica y permitir su progresión a través del ciclo celular (Rodríguez et al., 2012).

El *checkpoint recovery* es un mecanismo que participa en la liberación del arresto en la fase G₂ una vez que se ha reparado el DNA dañado, sin embargo se ha observado que las células AF son capaces de progresar a través del ciclo celular aun con daño genómico, nuestro grupo realizó una segunda versión del modelo

booleano antes descrito en el cual se simplificó para reorganizar los nodos e interacciones de una manera más eficiente, este nuevo modelo arrojó una predicción respecto al *checkpoint recovery* que propone que en las células AF este mecanismo es capaz de liberar el arresto aun cuando exista daño en el DNA lo que permite la división y supervivencia aunque cada vez presentarán mayor cantidad de daño en el DNA (Rodríguez et al., 2015).

Para corroborar la predicción del modelo booleano que sugiere la participación de una vía alterna de recombinación homóloga dependiente del complejo MRN la cual que repara los DSB cuando las vías cHR y cNHEJ no se encuentran funcionales, nuestro grupo de trabajo evaluó la respuesta al daño al DNA en células silvestres (NL49) y en células deficientes para *FANCA* (VU817) inhibiendo a uno de los componentes de MRN, MRE11 con mirina. Se analizó la frecuencia y tipo de AC así como la distribución a lo largo del ciclo celular, los resultados mostraron que con la inhibición de MRE11 no se incrementa de manera significativa la frecuencia de AC ni tampoco existe diferencia en la frecuencia de figuras radiales en ninguna de las líneas celulares ya sea en tratamiento con mirina o combinado con MMC, tampoco se encontraron diferencias significativas en la dinámica del ciclo celular inducidas por el tratamiento con mirina solo o combinado con MMC (Fiesco Roa 2015).

Por otra parte, existe evidencia que sugiere que cuando se bloquea a la cNHEJ en las células AF se revierte al menos de manera parcial la hipersensibilidad a agentes inductores de ICL, la inestabilidad genómica y las alteraciones del ciclo celular, sin embargo, hay estudios en los que sus resultados contradicen esto, para analizar el comportamiento del modelo de nuestro laboratorio se utilizaron dos líneas celulares linfoblastoides NL49 silvestre y VU817 mutante para *FANCA* y se les inhibió DNA-PKcs por medio de NU7026, un inhibidor ATP competitivo específico para DNA-PKcs y se trataron con MMC, se realizó prueba de AC y sobrevivencia. Los resultados obtenidos mostraron en ambas líneas que la frecuencia de rupturas no reunidas aumenta en el tratamiento combinado del inhibidor NU7026 y MMC comparado con los tratamientos individuales o el control sin tratamiento no obstante la frecuencia de figuras radiales no

muestra diferencias significativas, estos resultados en conjunto sugieren que las células AF en efecto son hiperdependientes de la cNHEJ para reparar DSB. Debido a que el mecanismo de acción del inhibidor NU7026 evita la fosforilación por parte de DNA-PKcs de sus blancos entre ellos si misma, es posible que se impida su disociación de los DSB y esto bloquee la reparación de los DSB por la aHR además de impedir la reparación por cNHEJ en este trabajo se sugiere que en las células AF la aNHEJ podría ser el mecanismo responsable de la formación de las figuras radiales (Rodríguez Soto 2015).

III.II. Antecedentes no directos

Se conoce que las proteínas de la vía FA/BRCA bloquean el acceso de las proteínas de cNHEJ a los sitios de DSB y evitan reparación potencialmente anómala. Sin embargo, las células AF sobreexpresan a las proteínas clave de la cNHEJ y muestran gran número de REF después de ser expuestas a DEB o MMC, por lo que se ha propuesto que la sobre activación de la cNHEJ en las células AF es la responsable directa de la generación de las REF. Cuando Pace y colaboradores encontraron que en células B de pollo (línea celular DT40) mutantes para *Fancc*^{-/-} son sensibles a cisplatino pero no a rayos X mientras que las mutantes para *Dna-pkcs* o *Lig IV* presentan sensibilidad a rayos X pero no a cisplatino, sin embargo en un doble mutante para *Fancc* y *Ku70* la sensibilidad a cisplatino no está presente, se encontraron resultados similares en células humanas *FANCC*^{-/-} mutantes a las cuales se les redujo la expresión de KU70 y se trataron con MMC, además en las células de pollo DT40 encontraron que el doble mutante para *Fancc* y *Ku70* la HR se restableció (Pace et al., 2010).

En otro estudio (Adamo et al., 2010) se encontró que en *C. elegans* las células doble mutantes para *fcd-2* y *lig4* no presentan la hipersensibilidad a cisplatino, mostaza nitrogenada así como otros agentes inductores de ICL, teniendo niveles similares a las células con genotipo silvestre, esto se corroboró al analizar la frecuencia de anormalidades cromosómicas, la sobrevivencia, la cantidad de *foci* de rad51 mantenido a lo largo del tiempo así como la apoptosis en células germinales. Además utilizaron dos líneas celulares derivadas de un paciente de glioblastoma, una proficiente para *DNA-PKcs* (MO59K) y otra deficiente para el mismo gen (MO59J). Los autores observaron que cuando se interfería a *FANCD2* por

siRNA las células MO59K presentaron hipersensibilidad a MMC, además cuando se inhibió de la misma manera a *FANCD2* en las células MO59J no se observó hipersensibilidad a MMC. Se obtuvieron resultados similares al utilizar células HeLa en tratadas con el inhibidor específico de DNA-PKcs NU7026, siRNA para *FANCD2* o un tratamiento de ambos.

Por otra parte existe evidencia aparentemente contradictoria que sugiere que el bloqueo de la cNHEJ no (Thongthip et al. 2017) restablece el fenotipo de las células AF, Bunting y colaboradores encontraron que cuando se inhibe la expresión de *Ku80*, *DNA-PKcs* o *53bp1* en fibroblastos embionarios de ratón mutantes para *Fancd2* no se restablecen de la sensibilidad a inductores de ICL (Bunting et al. 2012) encontraron que cuando se inhibe la expresión de *Ku80*, *DNA-PKcs* o *53bp1* en fibroblastos embionarios de ratón mutantes para *Fancd2* no se restablecen de la sensibilidad a inductores de ICL. En otro estudio (Pace et al. 2010) encontraron que en células DT40 deficientes en *Fancc* si se induce una segunda mutación bialélica en *Lig4* las células no se recuperan de la hipersensibilidad a MMC o DEB. Finalmente Thongthip y colaboradores encontraron que la supresión de diferentes componentes de la cNHEJ como DNA-PKcs, LIG4 o 53BP1 por medio de inhibidores químicos, RNAi o CRISPR-cas9 no es capaz de rescatar defectos en proliferación y solamente la supresión de 53BP1 disminuye de forma parcial las anomalías cromosómicas en células RA3087 (FA-A) (Thongthip et al. 2017).

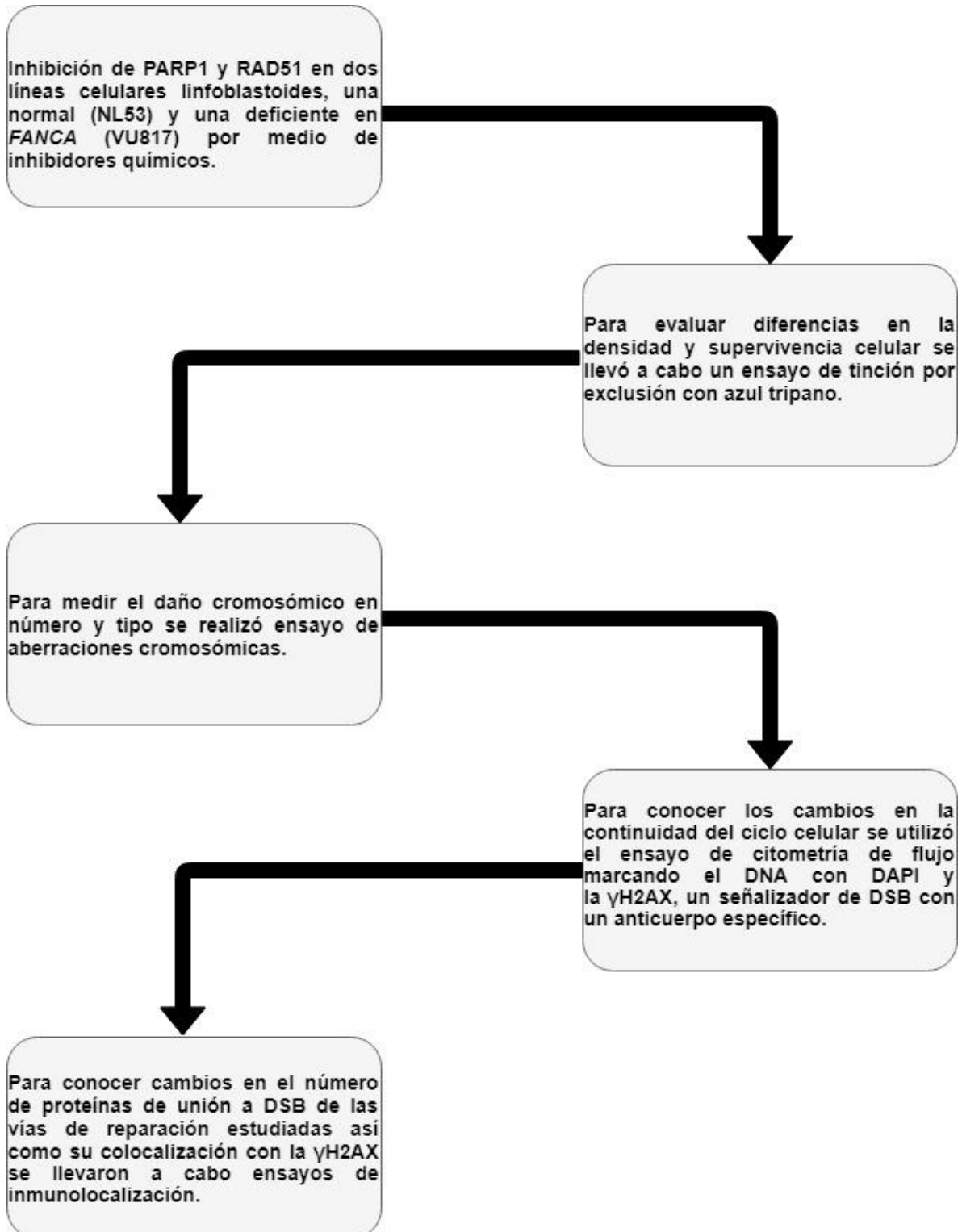
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha descrito la existencia de mecanismos alternos de recombinación homóloga y unión de extremos no homólogos (aHR y aNHEJ, respectivamente) sin embargo, no se conoce el papel que desempeñan en la reparación de los DSB generados a partir de ICL en las células AF así como su participación en la formación de figuras radiales; por lo que la pregunta de investigación es:

¿Qué papel tienen los mecanismos alternos de reparación de DSB (aCNHEJ y cHR) en las células de anemia de Fanconi?

V. METODOLOGÍA

V.I. Diseño experimental



V.II. Cultivos y líneas celulares

Se trabajó con dos líneas celulares linfoblastoides de linaje B:

- 1.- Proficiente para la vía FA/BRCA (NL53) con cariotipo 46, XY.
- 2.- Deficiente de la vía FA/BRCA (VU817) con cariotipo 46, XX, t(5;14)(p15.2;q11.2), +14, t(18;21)(q23q12;p11.1;q22)?,+18 y con variante patogénica en forma homocigota en el gen *FANCA* NG_011706.1(NM_000135.2): c.88-?_189+?del.

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: Medio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con los siguientes suplementos: 10% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina (CAS 56-85-9), 1% de piruvato de sodio (CAS 113-24-6), 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de gentamicina (CAS 1405-41-0) (Gibco, Carlsbad, CA, USA). En condiciones de incubación a 37 ° C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Para todos los experimentos fue utilizado un esquema de cuatro tratamientos el cual se tomó del trabajo previo de nuestro grupo para evaluar los efectos de la inhibición química de DNA-PKcs con la finalidad de comparar los resultados obtenidos con dicho estudio (Rodríguez Soto 2015)(Figura 9):

- Un control con solo medio de cultivo suplementado.
- Un tratamiento con MMC a una concentración de 10 ng/mL durante 24 horas.
- Un tratamiento con un solo inhibidor químico 18 horas antes de la cosecha, los inhibidores utilizados se describen con detalle más adelante.
- Un tratamiento combinado de MMC 24 horas y posteriormente con un inhibidor químico 18 horas antes de la cosecha.

Los cultivos se lavaron a las 24 horas y se agregó medio fresco, posteriormente se agregó el inhibidor en los tratamientos que lo incluían seis horas después (hora 30), finalmente se cosecharon a las a las 48 horas. Se empleó este esquema de tratamientos y tiempos con base en resultados obtenidos en experimentos previos llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo, en estas condiciones experimentales se puede evidenciar daño inducido por la MMC sin una reducción excesiva de la supervivencia celular.

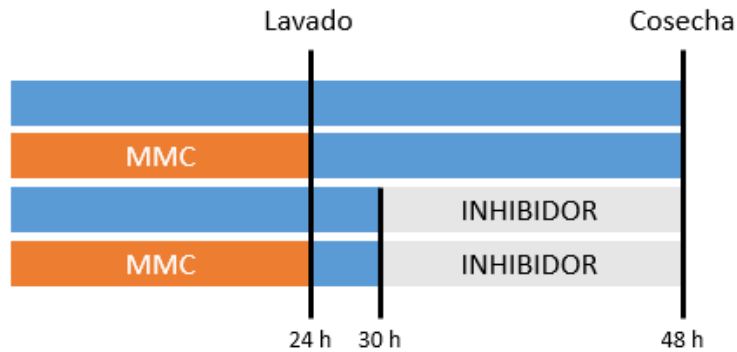


Figura 9. Esquema de tratamientos utilizados en todos los experimentos, en naranja se indica el periodo de tratamiento con MMC mientras que en gris el periodo de tiempo para los inhibidores químicos.

V.III. Bloqueo de vías de reparación

Se utilizaron inhibidores químicos para bloquear algunas vías de reparación de DSB con el fin de determinar su importancia en el contexto de las células AF. Se utilizaron los siguientes inhibidores específicos:

- El (fenilmetil)-2-[(1E)-2-(3-piridinil)etenil]-4(3H)-quinazolinona (B02) (Sigma-Aldrich, CAS 1290541-46-6) es un inhibidor específico de RAD51 humano, el cual se une al ssDNA impidiendo la unión de RAD51 al DNA así como la formación del filamento de nucleoproteína, se usó para inhibir la función de la proteína RAD51 de la vía de aHRR utilizando concentraciones de 5, 12.5, 25, 50 y 100 μM . Las concentraciones de trabajo se determinaron con base en la literatura, encontrando un rango de concentraciones de 10 a 250 μM (Alagpulinsa et al., 2014; Huang et al., 2011, 2012)
- El 4-amino-1,8-naphtalimida (4AN) (Sigma-Aldrich, CAS 1742-95-6) es un potente inhibidor de PARP1 la cual realiza una inhibición de tipo mezclado y con respecto al sustrato NAD^+ , se usó para inhibir a la proteína PARP1 de la vía de aNHEJ utilizando concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1, 5 y 10 μM . Las concentraciones de trabajo se determinaron con base en la literatura, encontrando un rango de concentraciones de 0.1 a 10 μM (Aguilar-Quesada et al., 2007; Curtin, 2017; Luo et al., 2015).

V.IV. Análisis de viabilidad

Se analizó el impacto sobre la viabilidad visto como porcentaje de células vivas y la densidad celular considerado como número de células vivas en ambas líneas celulares después de someterse a los cuatro tratamientos y a diferentes concentraciones de los inhibidores; al inicio de la cosecha se tomó una alícuota de la cual se tomaron 10 μL y se tiñó con 10 μL de azul tripano (Gibco, CAS 72-57-1), pipeteando 10 μL de esta solución en una cámara de Neubauer y se contaron las células vivas y muertas para determinar el porcentaje de viabilidad así como la densidad celular. Este ensayo se realizó por triplicado en cada condición experimental.

V.V. Análisis de aberraciones cromosómicas

Para determinar cambios en la frecuencia de DSB y de REF se analizó la frecuencia de AC. Para la cosecha se agregó a cada condición experimental 2U de colchicina (Gibco, CAS 64-86-8) en una concentración de 20 μM diluido en solución isotónica y se dejó incubar durante una hora, se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm y a temperatura ambiente, se resuspendieron con un vórtex, posteriormente se adicionó 5 mL de solución hipotónica (20g de KCl (Sigma-Aldrich, CAS 7447-40-7) en 1 L de agua destilada estéril) y se dejaron incubar a 37 °C durante 30 minutos, se prefijaron con 1 mL de fijador Carnoy (metanol (Emsure, CAS 67-56-1) y ácido acético (Emsure, CAS 64-19-7) en proporción 3:1) frío, se mezclaron por inversión y se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones, se decantaron y mezclaron por inversión, la fijación se realizó con 5 mL de fijador Carnoy frío dos veces. Se realizaron por goteo dos laminillas de cada condición experimental. La tinción se llevó a cabo por una tinción dual de Wright (Merck, CAS 68988-92-1) y Giemsa (Merck, CAS 51811-82-6) durante 30 segundos en cada una y lavándolas en agua 30 segundos. Cada condición experimental se realizó por triplicado y se utilizó un 1.5×10^6 de células para cada uno analizando 25 metafases.

V.VI. Análisis de ciclo celular y muerte

Para conocer los patrones de fosforilación de la variante de histona H2AX, el principal señalizador de DSB así como cambios en la dinámica del ciclo celular se realizó un ensayo de citometría de flujo usando el “kit” de BD Pharmingen Cytofix/Cytoperm.

Para este ensayo se utilizó 1×10^6 células por condición experimental.

Después de la cosecha se centrifugaron las muestras a 1500 rpm durante 5 minutos, se realizó la fijación y permeabilización en un solo paso con 66 μ l de Cytofix/Cytoperm y se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, a continuación se lavó con 500 μ l de Perm Wash Buffer 1X y se centrifugó nuevamente para retirar el sobrenadante, después se adicionaron 25 μ l de Buffer Permeabilization Plus para incubar en hielo durante 10 minutos, posteriormente se dió un lavado con 500 μ l de Perm Wash Buffer 1X, se fijaron por segunda vez con 25 μ l de Cytofix/Cytoperm y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos, se dió un lavado con Perm Wash Buffer 1X; para la tinción se utilizó 20 μ l de Perm Wash Buffer 1X y 1 μ l del anticuerpo primario específico para la γ H2AX el cual se encuentra acoplado a un anticuerpo secundario con marca fluorescente (Alexa Fluor 647 Mouse anti H2AX pS139), se dejó incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente y se lavó con 500 μ l de Perm Wash Buffer 1X y se almacenó toda la noche a 4°C, El día siguiente se añadió 250 μ l de solución bloqueadora (250 μ l de PBS + 3% de SFB + 1 μ l de tritón por cada ml de solución), finalmente se agregó 1 μ l de DAPI por cada ml de solución. Las células se pasaron a través del citómetro de flujo Attune NxT (Invitrogen) y se leyeron 50,000 eventos, los resultados se analizaron con el programa FlowJo 7.6.1 (FlowJo, www.flowjo.com). Cada condición experimental se realizó por triplicado.

V.VII. Inmunolocalización

Para evaluar el reclutamiento de las diferentes proteínas de reparación en las DSB se realizaron ensayos de inmunolocalización. Se usaron anticuerpos específicos para las proteínas DNAPKcs, RAD51 y PARP1 además de la variante de histona fosforilada γ H2AX, que indica la presencia de DSB.

Los anticuerpos que se utilizaron fueron los siguientes:

Anticuerpos primarios:

YH2AX: H2A.X phospho (S139) rabbit de Cell Signalling (Cat.2577s). Isotipo IgG. [1/200].

RAD51: RAD51 antibody (1484) Mouse monoclonal antibody Isotipo IgG2b. (Cat. GTX70230) [1/300].

Ku80: Ku80 antibody [9403] Mouse monoclonal [1/300].

PARP1: PARP monoclonal mouse de Genetex (Cat. GT982). Isotipo IgG1 [1/100-1/1000].

Anticuerpos secundarios:

Alexa Fluor 488 Chicken anti- rabbit polyclonal. Isotipo IgG (verde) [1/350].

Alexa Fluor 555 Donkey anti-mouse polyclonal de Molecular probes. Isotipo IgG. (rojo). [1/1000].

Al momento de la cosecha se lavaron las células con 3 mL de PBS se incubaron durante 5 minutos y posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, estos pasos se repitieron una vez más para después agregar 200 µL de paraformaldehído (Sigma-Aldrich, CAS 30525-89-4) diluido al 4% diluido en PBS y se dejaron en incubación durante 15 minutos, a continuación se dieron dos lavados más con 2 mL de PBS durante 15 minutos y se agregó tritón X100 (Sigma-Aldrich, CAS) a concentración de 0.1 % diluido en 2 mL de PBS y se dejó incubando a 4 °C durante 12 horas; al siguiente día se dieron dos lavados de 15 minutos con PBS centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos y a temperatura ambiente, posteriormente se colocó la muestra en una laminilla cargada y se dejó incubar aproximadamente 10 minutos sin permitir que se secase, a continuación se realizó el bloqueó con 100 µL de BSA (Roche, CAS 9048-46-8) diluido al 1% en PBS y se dejó incubar por 1 hora, se dieron dos lavados más con PBS durante 15 minutos y se añadió 25 µL de los anticuerpos primarios (contra DNAPKcs o PARP1 o RAD51 y YH2AX) a las concentraciones indicadas más adelante y diluidos en PBS, después se dejó incubando durante 18 horas, se dieron dos lavados más con PBS y se agregó 25 µL de la solución de los anticuerpos secundarios en las concentraciones indicadas más adelante y diluidos en PBS, y se lavaron dos veces con PBS durante 15 minutos; finalmente se adicionó 8 µL de DAPI diluido en medio de montaje VECTASHIELD® Antifade

Mounting Medium with DAPI (Cat. H-1200) en una dilución 1:50 y se colocó un cubreobjetos para sellar la muestra.

Cada ensayo se realizó por duplicado. Se utilizaron un millón de células y se analizaron con un microscopio Imager.Z1 leyéndose 100 núcleos por condición experimental.

V.VIII. Análisis estadístico

Se comprobó la normalidad de los datos por la prueba de Saphro-Wilk. Para determinar si las diferencias encontradas en los resultados fueron estadísticamente significativas se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía cuando la distribución de los datos fue normal, mientras que cuando los datos no mostraron normalidad se empleo U de Mann-Whitney, se utilizó una $p \leq 0.05$ como nivel de significancia. Todos los análisis se llevaron a cabo con el software SPSS versión 22. Los datos se representaron como media \pm DE.

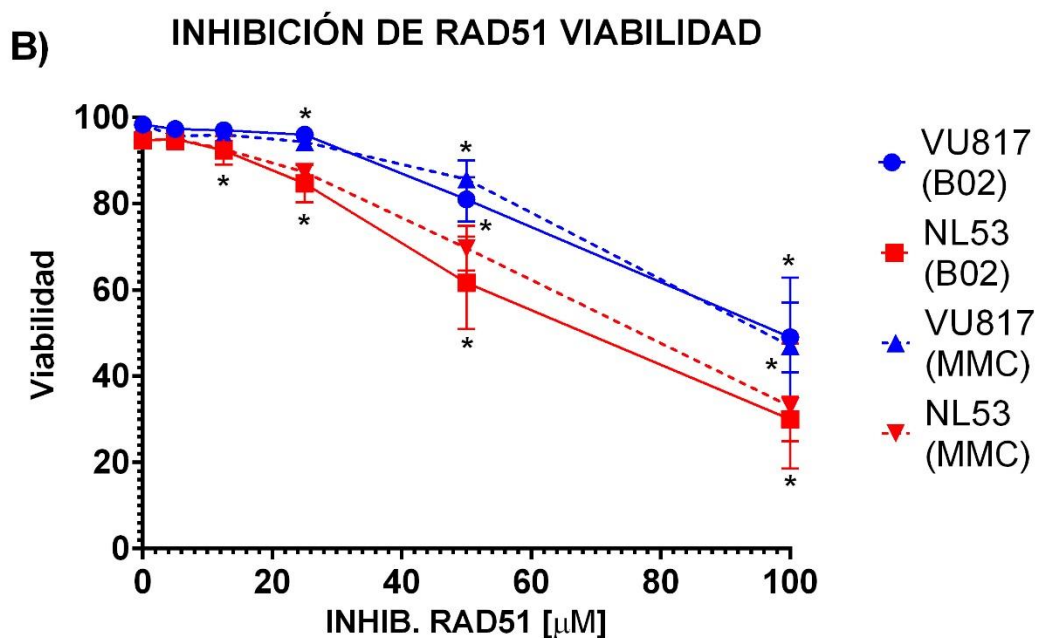
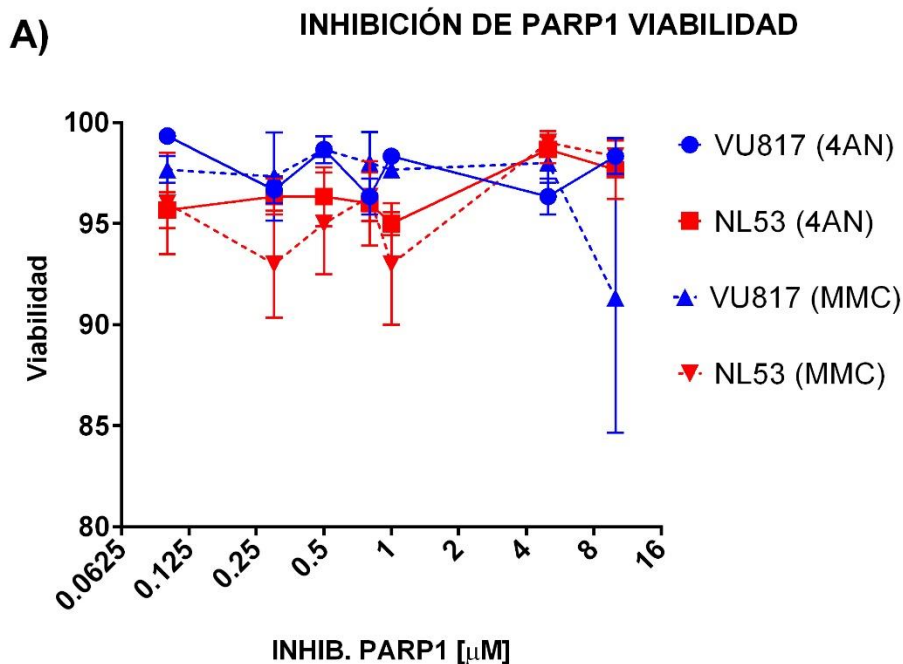
VI. RESULTADOS

VI.I. Viabilidad y densidad celular

Como resultado del análisis de viabilidad celular, no se observó diferencia en la línea celular NL53 con el tratamiento del inhibidor de PARP1 4AN en las concentraciones de 5 μ M así como en la de 10 μ M en tratamiento único, así como en el combinado con MMC al comparar con el SNTX (Gráfica 1A).

Respecto al inhibidor B02 se detectó que en las células NL53 disminuyó la viabilidad en las concentraciones de 50 y 100 μ M en el tratamiento único y en el conjunto con MMC al comparar contra el SNTX (control negativo). Por otra parte, cuando se comparó contra el tratamiento de MMC se también se encontró que disminuyó la viabilidad en las concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 μ M en tratamiento combinado con MMC (Gráfica 1B).

Se evaluó el efecto del inhibidor B02 en la línea celular VU817 y se notó reducción en la viabilidad celular en las concentraciones de 25, 50 y 100 μ M ($p \leq 0.05$) así como en el tratamiento conjunto con MMC a las mismas concentraciones cuando se comparó con el SNTX. Cuando se realizaron comparaciones con el tratamiento de MMC se encontró reducción en las concentraciones de 50 y 100 μ M en tratamientos combinados con MMC (gráfica 1B).

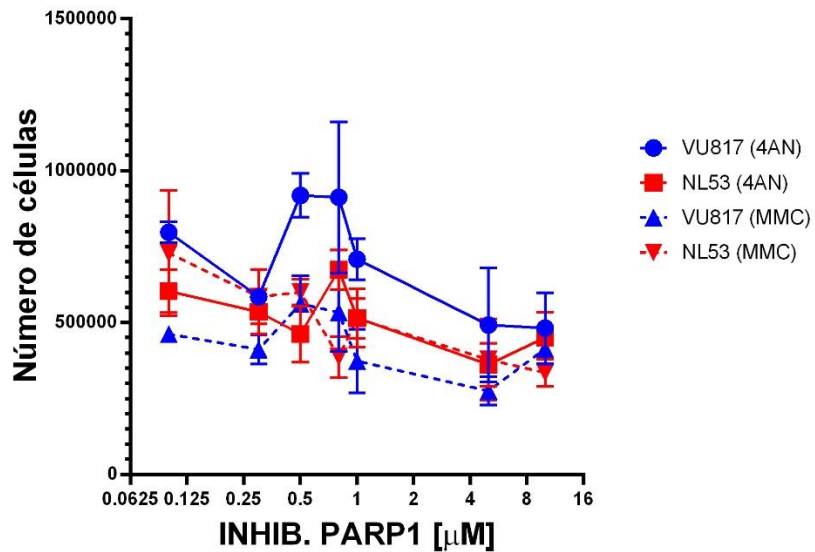


Gráfica 1. El inhibidor de PARP1 4AN no reduce la supervivencia en las células NL53 y VU817 mientras que el inhibidor de RAD51 B02 reduce la supervivencia en ninguna de las líneas celulares, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL A) Células tratadas con distintas dosis del inhibidor 4AN más sus respectivos controles (SNTX y MMC), B) Células tratadas con diversas dosis del inhibidor B02 y sus respectivos controles (SNTX y MMC), * $p \leq 0.05$, los experimentos se realizaron por triplicado.

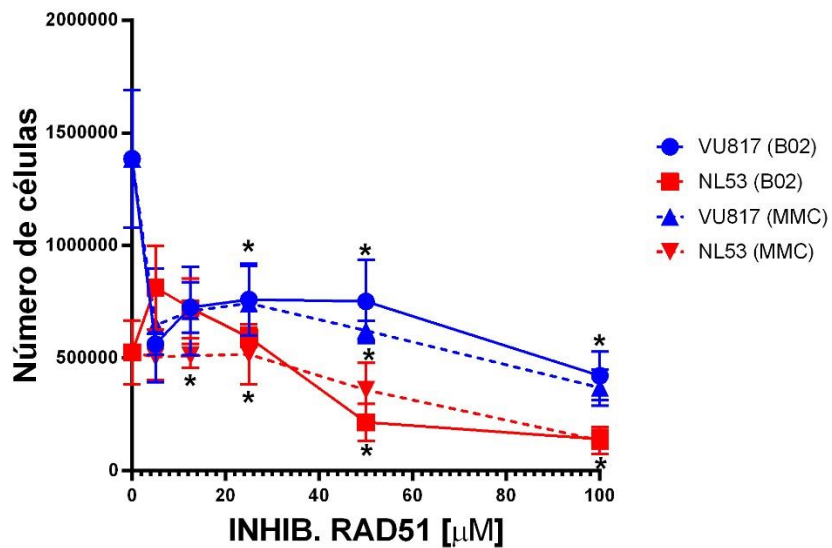
Se evaluó el impacto de los tratamientos sobre la densidad celular, encontrándose que el inhibidor de PARP1 4AN no produjo cambios significativos sobre la línea NL53 mientras que en la línea celular VU817 se observó reducción en la concentración de 0.8 μM en el tratamiento combinado con MMC al comparar contra el SNTX (Gráfica 2A).

El inhibidor de RAD51 B02 causó sobre la línea NL53 reducción del número celular en la concentración de 100 μM en tratamiento único así como en el combinado con MMC cuando se comparó con el SNTX, además cuando se comparó con el de MMC se observó reducción significativa en la concentración de 100 μM en tratamiento combinado con MMC (Gráfica 2B). Al analizar los cambios debidos al tratamiento con el inhibidor de RAD51 B02 sobre la línea celular VU817 se encontró reducción del número de células en la concentración de 5 μM , en la de 50 μM en tratamiento combinado con MMC así como en la de 100 μM en tratamiento único y combinado con MMC cuando se compararon con el SNTX, además en la concentración de 100 μM combinado con MMC se observó el mismo efecto al comparar con el de MMC (Gráfica 2B).

A) INHIBICIÓN DE PARP1 NÚMERO DE CÉLULAS



B) INHIBICIÓN DE RAD51 NÚMERO DE CÉLULAS



Gráfica 2. El inhibidor de PARP1 4AN no reduce el número de células vivas en ninguna de las líneas celulares mientras que el inhibidor de RAD51 B02 reduce el número de células vivas en las células NL53 y VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL. A) Células tratadas con distintas dosis del inhibidor 4AN y sus respectivos controles (SNTX y MMC), B) Células tratadas con diversas dosis del inhibidor B02 y sus respectivos controles (SNTX y MMC), * $p \leq 0.05$, los experimentos se realizaron por triplicado.

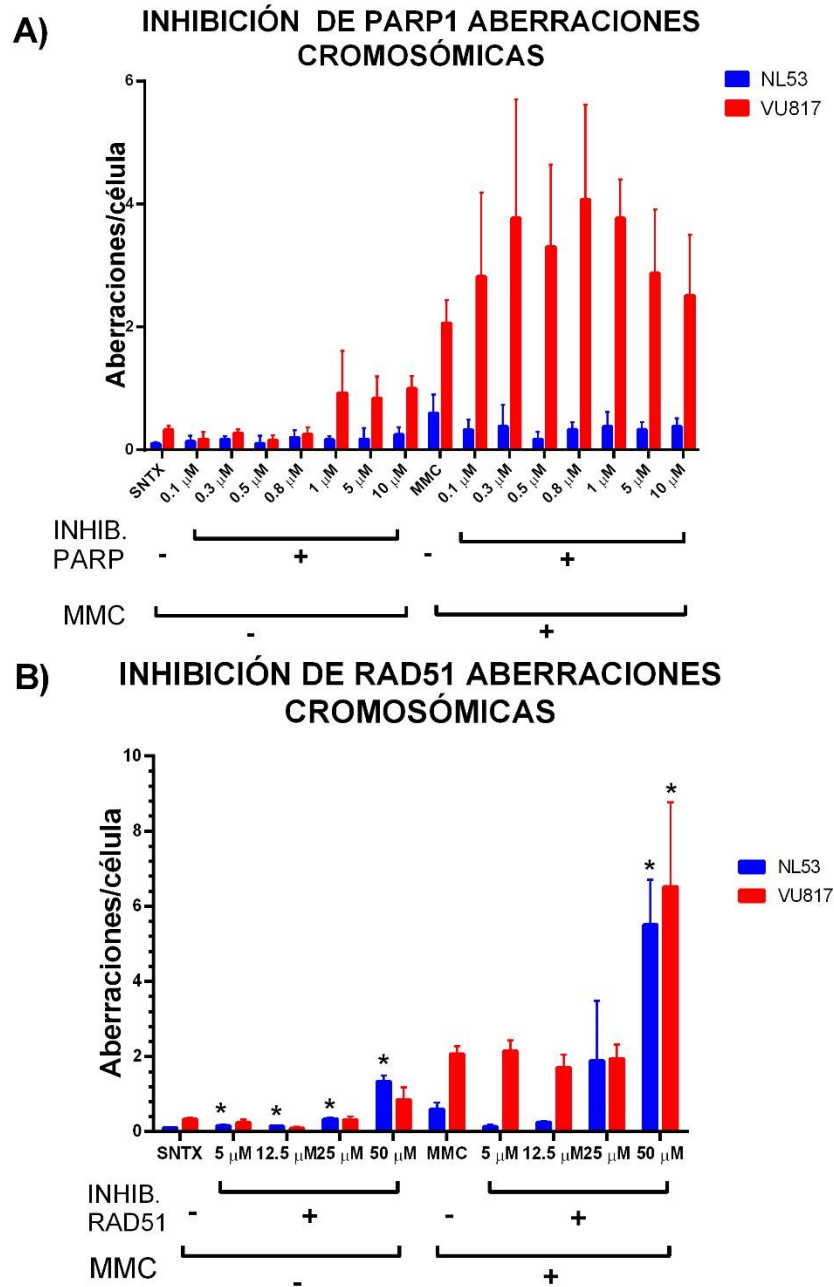
VI.II. Aberraciones cromosómicas

Como resultado del ensayo de aberraciones cromosómicas se obtuvieron diferentes datos tales como frecuencia de AC tanto reunidas como no reunidas y totales, porcentaje de células con rupturas reunidas, aberrantes y multiaberrantes. Las AC totales se componen de dos elementos, las AC no reunidas conformadas a su vez por rupturas cromosómicas, cromatídicas y fragmentos mientras que en las AC reunidas se incluyen a cromosomas dicéntricos, cromosomas en anillo y figuras radiales (triradios, tetraradios, etc.). Las AC reunidas son evidencia de DSB que fueron reparadas de manera errónea, por lo que en el contexto de nuestro proyecto el analizar por separado las AC reunidas y no reunidas nos permitió hacer una primera aproximación de los mecanismos implicados en la reparación de DSB generadas a partir de un ICL en las células proficientes y deficientes en la vía FA/BRCA. Se pudieron obtener metafases para el análisis de las AC en casi todas las condiciones experimentales con excepción del tratamiento conjunto del inhibidor de RAD51 B02 y MMC, en las células NL53 se obtuvieron metafases analizables en únicamente dos réplicas mientras que en las VU817 solamente en una por lo que no se incluyen en las siguientes gráficas.

Cuando se trataron a las células NL53 con el inhibidor de PARP1 se encontró aumento en la frecuencia de aberraciones por célula en las concentraciones de 0.3 y 10 μM así como en el combinado con MMC en las mismas concentraciones, además se observó el mismo efecto en las de 0.8, 1, 5 μM en tratamiento combinado con MMC al comparar con el SNTX (Gráfica 3A), mientras que en la línea VU817 se encontró aumento en la concentración de 10 μM en tratamiento combinado con MMC también al comparar con el SNTX (Gráfica 3A).

Cuando se evaluó el efecto del inhibidor B02 sobre la línea NL53 se observó aumento en la frecuencia de AC en la concentración de 12.5 μM en combinación con MMC, se observó el mismo efecto en las concentraciones de 25 y 50 μM tanto en tratamiento único como en los combinados con MMC y en la de 100 μM al comparar contra el SNTX, al comparar con el de MMC se encontró aumento en la concentración de 50 μM (Gráfica 3B). En la línea celular VU817 este inhibidor causó reducción en la concentración de

12.5 μM , así como aumento en las concentraciones de 12.5, 25 y 50 μM en tratamiento combinado con MMC cuando se comparó con el SNTX, mientras que se observó aumento en la concentración de 50 μM en tratamiento combinado con MMC cuando se comparó con el de MMC (Gráfica 3B).

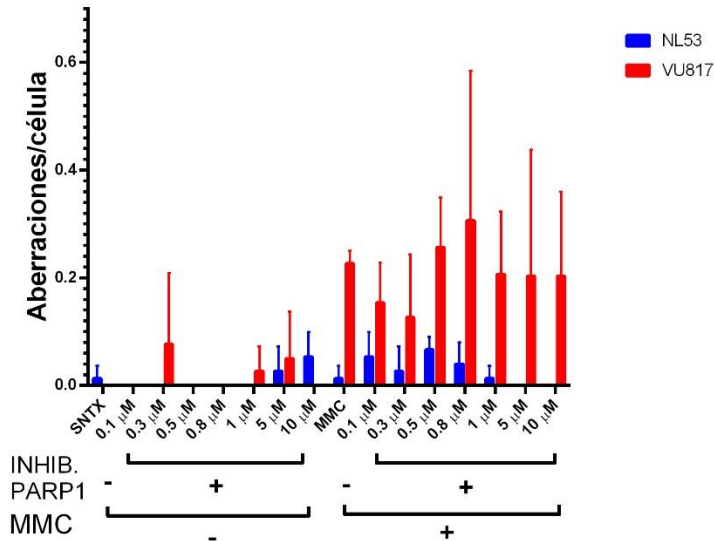


Gráfica 3. El inhibidor de PARP1 4AN no aumenta la frecuencia de AC por célula en las células NL53 ni VU817 mientras que el inhibidor B02 si aumenta la frecuencia de AC por célula en ambas líneas celulares. SNTX son el grupo testigo, la MMC se aplico en concentración de 10 ng/mL. A) Células tratadas con distintas dosis del inhibidor 4AN más sus respectivos controles (SNTXy MMC), B) Células tratadas con diversas dosis del inhibidor B02 y sus respectivos controles (SNTX y MMC), * $p \leq 0.05$, los experimentos se realizaron por triplicado.

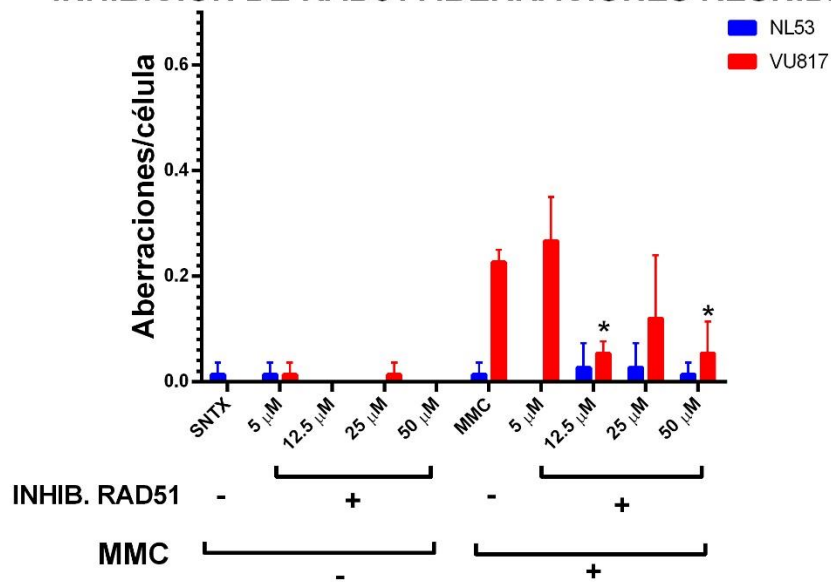
Respecto a la frecuencia de AC reunidas no se encontraron diferencias inducidas por el inhibidor 4AN sobre la línea celular NL53 (Gráfica 4A), mientras que en la línea celular VU817 se observó aumento en la en las concentraciones de 0.1, 0.3, 1 y 10 μM en tratamientos combinados con MMC cuando se comparó con el SNTX (Gráfica 4A).

Cuando se analizaron los cambios inducidos por el inhibidor B02 no se observaron diferencias sobre la línea celular NL53 (Gráfica 4B), por otra parte, en la línea VU817 se notó aumento en la frecuencia de AC reunidas en la concentración de 5 μM en tratamiento combinado con MMC al comparar con el SNTX, además se observó reducción en la concentración de 12.5 μM en tratamiento combinado con MMC al comparar con el SNTX, también se encontró la misma tendencia en las de 25 y 50 μM en combinación con MMC aunque no resultaron estadísticamente significativas (Gráfica 4B). Se observó reducción en las concentraciones de 12.5 y 50 μM en tratamiento conjunto con MMC cuando se comparó con el de MMC (Gráfica 4B).

A) INHIBICIÓN DE PARP1 ABERRACIONES REUNIDAS



B) INHIBICIÓN DE RAD51 ABERRACIONES REUNIDAS

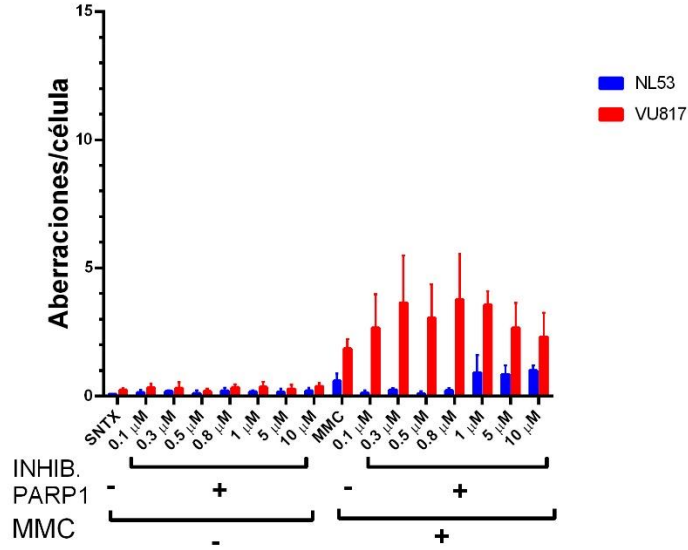


Gráfica 4. El inhibidor de PARP1 4AN aumenta la frecuencia de aberraciones reunidas por célula en la línea VU817 mientras que el inhibidor B02 aumenta la frecuencia de aberraciones reunidas por célula en la línea VU817 en concentraciones altas, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL. A) Células tratadas con distintas dosis del inhibidor 4AN y sus respectivos controles(SNTX y MMC), B) Células tratadas con diversas dosis del inhibidor B02 y sus respectivos controles (SNTX y MMC), *p < 0.05, los experimentos se realizaron por triplicado.

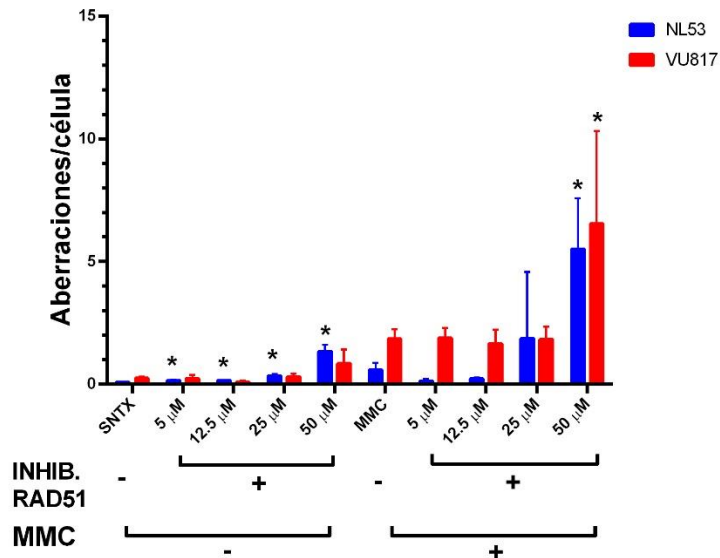
En el análisis de las AC no reunidas se observó que el inhibidor de PARP1 tuvo efecto sobre la línea celular NL53 evidenciado como aumento en las concentraciones 0.3 y 1 μM y en las de 0.8, 1, 5 y 10 μM en tratamientos conjuntos con MMC cuando se comparó con el SNTX, mientras que se encontró reducción en la de 0.1 μM en combinación con MMC al comparar con el de MMC (Gráfica 5A). Respecto a la línea celular VU817 el inhibidor de PARP1 causó aumento en todas las concentraciones en tratamientos combinados con MMC cuando se compararon con el SNTX (Gráfica 5A).

El tratamiento con el inhibidor de RAD51 B02 tuvo el efecto esperado sobre las AC no reunidas, en la línea celular NL53 provocó aumento en todas las concentraciones así como en las de 12.5, 25, 50 μM en tratamiento combinado con MMC al compararlos con el SNTX, mientras que cuando se realizaron las comparaciones con el tratamiento de MMC se observó reducción en la concentración de 5 μM en tratamiento combinado con MMC y aumento en la de 50 μM en combinación con MMC (Gráfica 5B). Se observó el mismo efecto sobre las células VU817 en las concentraciones 5, 12.5, 25 y 50 μM en tratamiento combinado con MMC al compararlas con el control SNTX, además aumentó en la de 50 μM y MMC al comparar con el de MMC (Gráfica 5B).

A) INHIBICIÓN DE PARP1 ABERRACIONES NO REUNIDAS



B) INHIBICIÓN DE RAD51 ABERRACIONES NO REUNIDAS

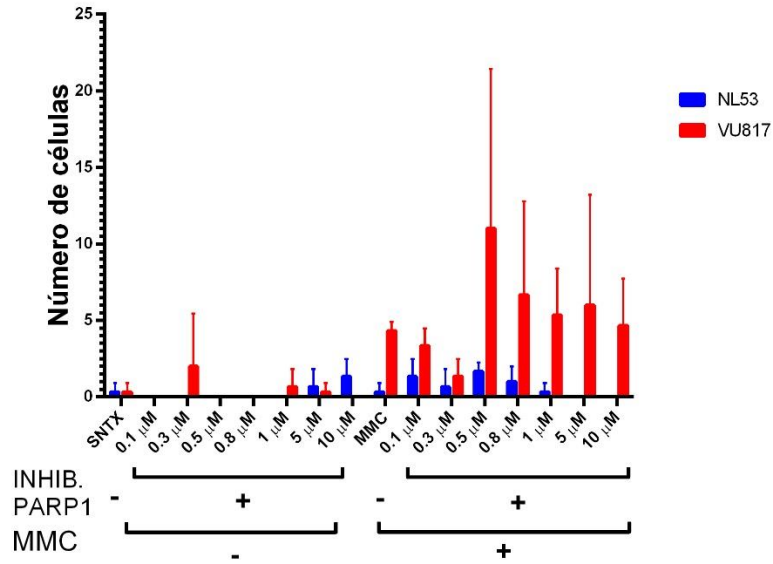


Gráfica 5. El inhibidor de PARP1 4AN aumenta la frecuencia de aberraciones cromosómicas no reunidas por célula en la línea VU817 mientras que el inhibidor de RAD51 B02 aumenta la frecuencia de aberraciones cromosómicas reunidas por célula en ambas líneas celulares, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL. A) Células tratadas con distintas dosis del inhibidor 4AN más sus respectivos controles (SNTX y MMC), B) Células tratadas con diversas dosis del inhibidor B02 más sus respectivos controles (SNTX y MMC), * $p \leq 0.05$, los experimentos se realizaron por triplicado.

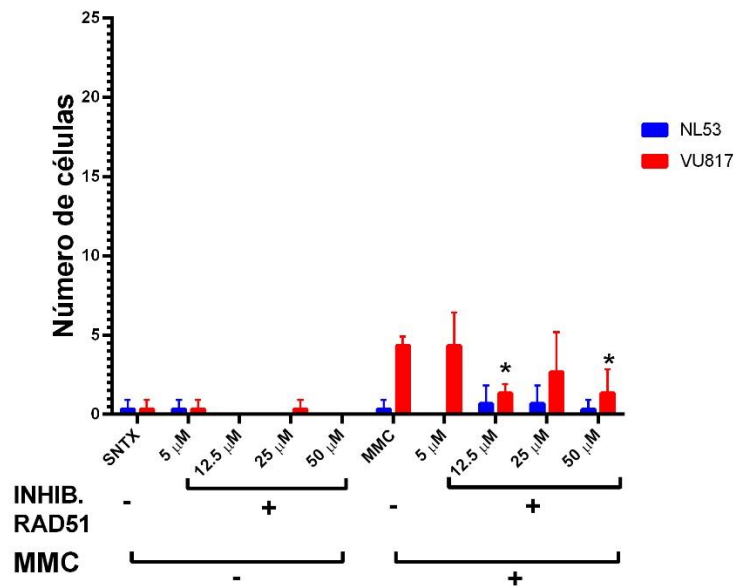
Se evaluó el efecto de los inhibidores sobre el número de células que presentaron figuras radiales. El tratamiento con el inhibidor de PARP1 4AN no provocó diferencias en la línea celular NL53 (Gráfica 6A). Por otra parte el tratamiento con este inhibidor sobre la línea VU817 provocó aumento en las concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 10 μM en tratamientos conjuntos con MMC al comparar con el SNTX, al realizar comparaciones con el tratamiento de MMC se observó reducción de la frecuencia de figuras radiales en las concentraciones de 0.1 y 0.3 μM (Gráfica 6A).

El tratamiento con el inhibidor de RAD51 no provocó cambios sobre la línea celular NL53 al comparar con el SNTX o el de MMC (Gráfica 6B), mientras que sobre la línea celular VU817 se observó aumento en la concentración de 5 μM en tratamiento combinado con MMC al comparar con el SNTX, cuando se realizaron las comparaciones con el de MMC se encontró reducción en las concentraciones de 12.5 y 50 μM y MMC (Gráfica 6B).

A) INHIBICIÓN DE PARP1 CÉLULAS CON FIGURAS RADIALES



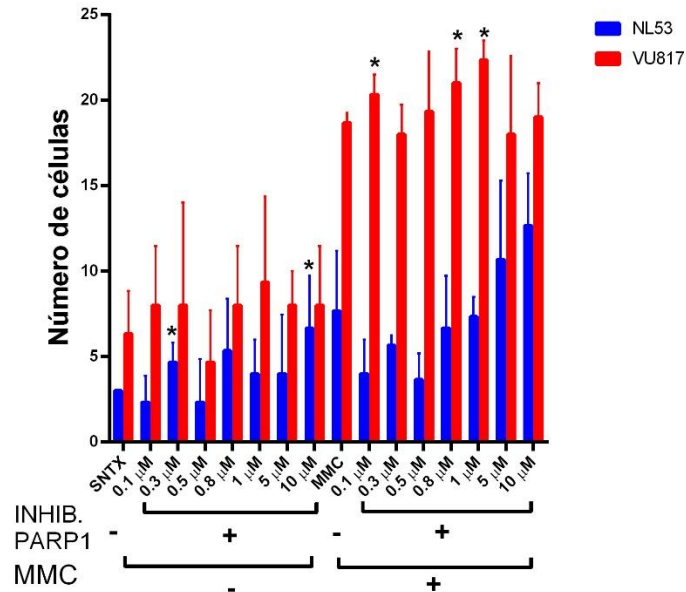
B) INHIBICIÓN DE RAD51 CÉLULAS CON FIGURAS RADIALES



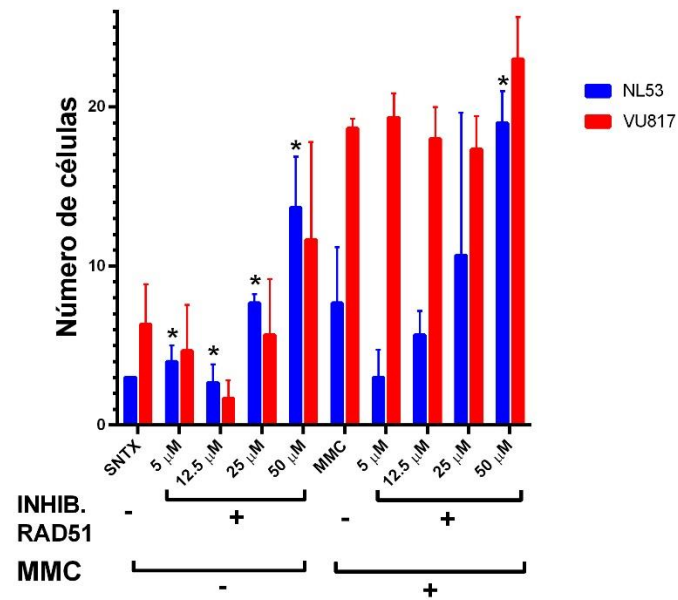
Gráfica 6. El tratamiento con el inhibidor de PARP1 4AN aumenta la frecuencia de figuras radiales por en la línea VU817 mientras que el inhibidor B02 disminuye la frecuencia de figuras radiales por célula en la línea celular VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL. A) Células tratadas con distintas dosis del inhibidor 4AN más sus respectivos controles (SNTX y MMC), B) Células tratadas con diversas dosis del inhibidor B02 más sus respectivos controles (SNTX y MMC), * $p \leq 0.05$, los experimentos se realizaron por triplicado.

Se analizó el porcentaje de células en las que se encontraron por lo menos una aberración cromosómica. Cuando se trató a las células NL53 con el inhibidor 4AN y se comparó con el SNTX se observó aumento en las concentraciones de 0.3 y 10 μM en tratamiento único y combinado con MMC, así como en las de 0.8, 1, 5, 10 μM en tratamiento conjunto con MMC (Gráfica 7A). En las células VU817 se encontró aumento en las concentraciones de 0.1, 0.3 y 1 μM en tratamiento combinado con MMC cuando se comparó con el SNTX, se presentó esta misma tendencia en las de 0.5, 5 y 10 μM en tratamiento combinado con MMC sin embargo, éstas diferencias no resultaron estadísticamente significativas, cuando se compararon con el de MMC se observó aumento en las de 0.1, 0.8 y 1 μM en tratamiento combinado con MMC (Gráfica 7A). El tratamiento con el inhibidor B02 indujo aumento en el porcentaje de células aberrantes sobre la línea NL53 esto se presentó en las concentraciones de 12.5 μM , en las de 25 y 50 μM en tratamiento único al comparar con el SNTX, además cuando se realizaron las comparaciones con el de MMC se observó aumento en la concentración de 50 μM en combinación con MMC (Gráfica 7B). En la línea VU817 éste inhibidor causó reducción en la concentración de 12.5 μM cuando se comparó con el SNTX, además se observó aumento en las concentraciones de 5, 12.5, 25 y 50 μM en tratamiento combinado con MMC cuando se comparó con el SNTX (Gráfica 7B).

A) INHIBICIÓN DE PARP1 CÉLULAS ABERRANTES



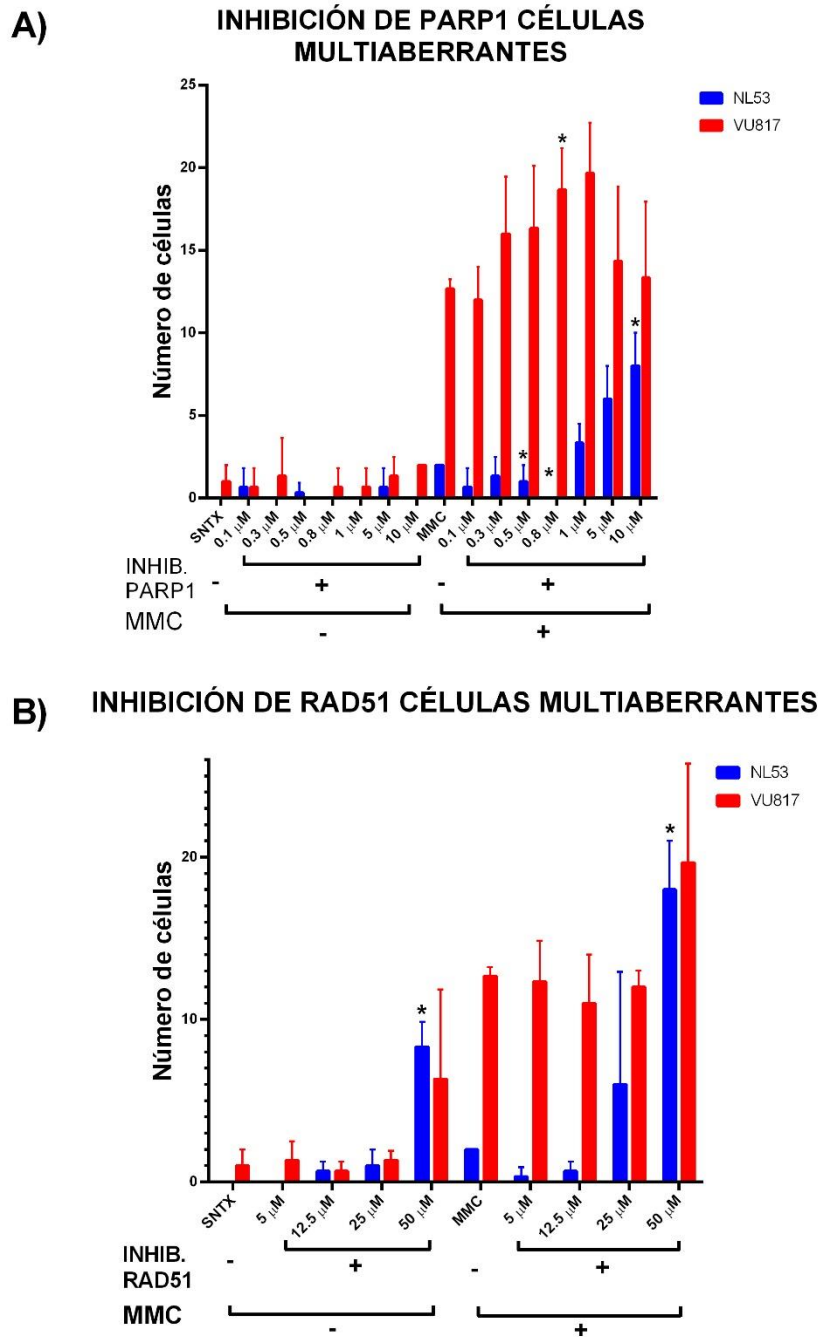
B) INHIBICIÓN DE RAD51 CÉLULAS ABERRANTES



Gráfica 7. El inhibidor de PARP1 4AN aumenta el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas en la línea VU817 mientras que el inhibidor de RAD51 B02 aumenta el porcentaje de células aberrantes en ambas líneas celulares, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL. A) Células tratadas con distintas dosis del inhibidor 4AN más sus respectivos controles (SNTX y MMC), B) Células tratadas con diversas dosis del inhibidor B02 más sus respectivos controles (SNTX y MMC), * $p \leq 0.05$, los experimentos se realizaron por triplicado.

Respecto al porcentaje de células multiaberrantes se encontró que el tratamiento con el inhibidor de PARP1 4AN indujo sobre la línea celular NL53 aumento en las concentraciones de 1, 5 y 10 μM combinación con MMC al comparar con el SNTX, cuando se comparó con el de MMC se observó reducción en las de 0.5 y 0.8 μM en tratamiento combinado con MMC, también provocó aumento en la concentración de 4AN 10 μM y MMC (Gráfica 8A). Sobre las células VU817 causó aumento en las concentraciones de 0.3 y 10 μM cuando se comparó con el SNTX, mientras que al realizar la comparación con el de MMC se observó aumento en las de 0.8 y 1 μM combinado con MMC (Gráfica 8A).

El tratamiento con el inhibidor de RAD51 sobre la línea celular NL53 mostró aumento en el porcentaje de células multiaberrantes en la concentración de 25 μM con MMC, en la de 50 μM en tratamiento único y en combinación con MMC al comparar con el SNTX. Por otra parte, cuando se comparó con el de MMC se encontró reducción en las concentraciones de 5 y 12.5 μM en tratamiento combinado con MMC, adicionalmente este inhibidor provocó aumento en la concentración de 50 μM con MMC (Gráfica 8B). Además sobre la línea celular VU817 indujo aumento en las concentraciones de 5, 12.5, 25, y 50 μM en tratamiento combinado con MMC al comparar con el SNTX (Gráfica 8B).

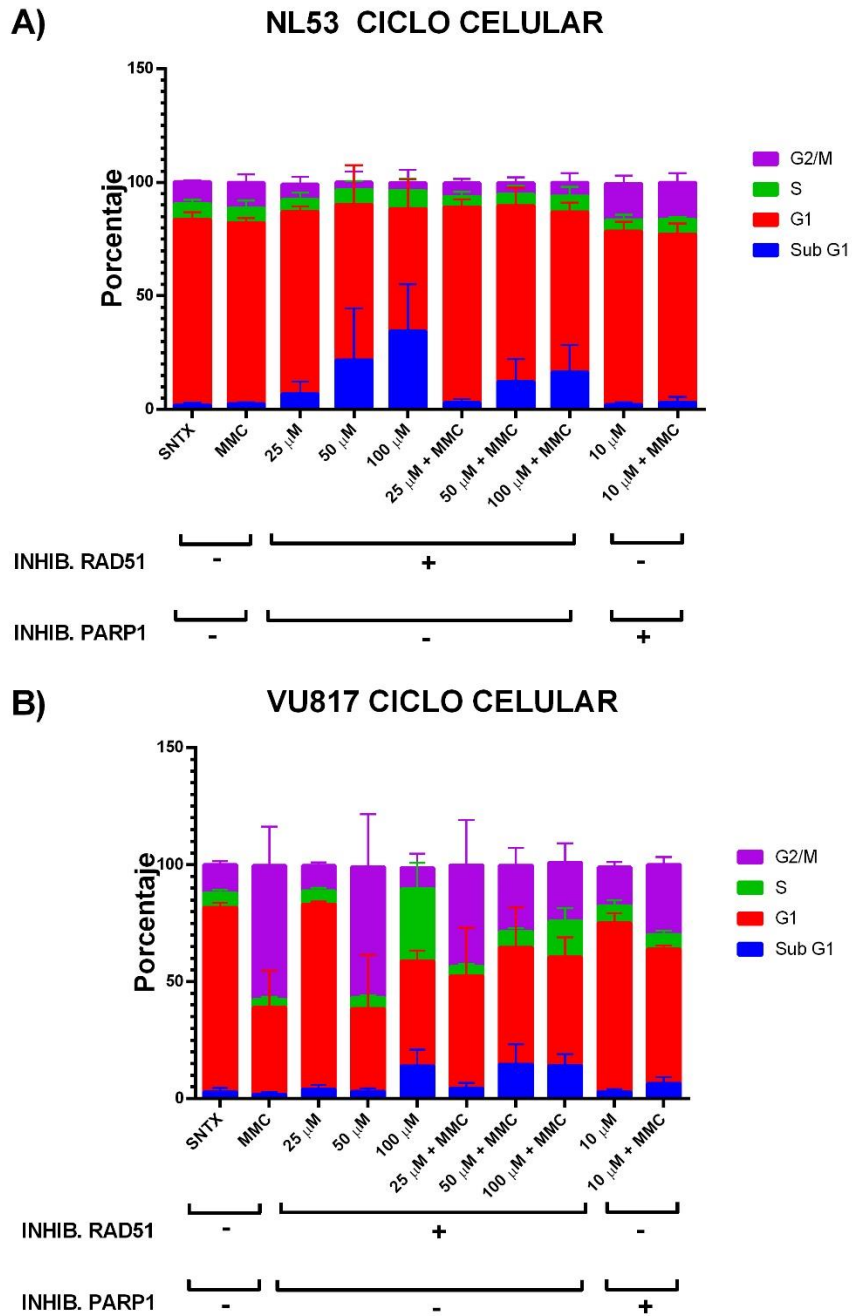


Gráfica 8. El inhibidor de PARP1 4AN aumenta el porcentaje de células multiaberrantes en ambas líneas celulares mientras que el inhibidor B02 aumenta el porcentaje de células multiaberrantes en la línea NL53, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL. A) Células tratadas con distintas dosis del inhibidor 4AN más sus respectivos controles (SNTX y MMC), B) Células tratadas con diversas dosis del inhibidor B02 más sus respectivos controles (SNTX y MMC), * $p \leq 0.05$, los experimentos se realizaron por triplicado.

VI.III. Dinámica del ciclo celular

Se detectó el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular con base en su contenido de DNA (Gráfica 9) mientras que se empleó un anticuerpo específico para detectar la γ H2AX (Gráfica 10). Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de AC se decidió utilizar la concentración de 10 μ M del inhibidor de PARP1 4AN y las concentraciones de 25, 50 y 100 μ M del inhibidor de RAD51 B02.

Se observó tendencia dependiente de la concentración del inhibidor B02 en el porcentaje de células en sub G_1 en ambas líneas celulares, el tratamiento con el inhibidor de PARP1 4AN no mostró diferencias (Gráfica 9). Se mostró tendencia a disminuir el porcentaje de células en G_1 la cual fue inversamente proporcional a la concentración del inhibidor B02 en ambas líneas celulares, además esta tendencia se observó en el tratamiento combinado con MMC en la línea NL53 (Gráfica 9A). Se encontró también reducción en el porcentaje de células en G_1 cuando se trataron con el inhibidor de PARP1 en ambas líneas celulares. No se observaron diferencias en el porcentaje de células en fase S sobre la línea celular NL53 inducidas por ninguno de los inhibidores, mientras que sobre la línea VU817 se encontró aumento en la concentración de 100 μ M (Gráfica 9B). En las células NL53 el porcentaje de células en G_2/M disminuyó con el tratamiento del inhibidor B02 en todas las concentraciones en los tratamientos únicos y con MMC (Gráfica 9A), mientras que en la línea celular VU817 se observó aumento en el porcentaje de células en G_2/M en la concentración de 50 μ M, además se observó tendencia a disminuir en los tratamientos combinados con MMC (Gráfica 9B). No se observaron cambios inducidos por el inhibidor 4AN en ninguna de las líneas celulares, ninguno de estos resultados mostró significancia estadística.



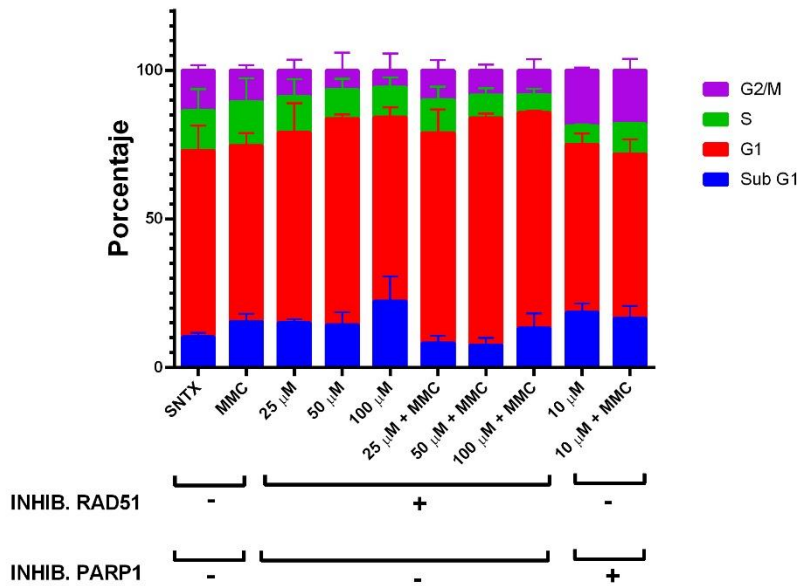
Gráfica 9. La MMC incrementa el porcentaje de células en G₂/M en las células VU817. El inhibidor de RAD51 B02 aumenta el porcentaje de células muertas en sub G₁ en ambas líneas celulares en todas las concentraciones mientras que en la concentración de 100 μM aumentó el porcentaje de células en fase S en las células VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL. A) Distribución del ciclo celular para la línea NL53. B) Distribución del ciclo celular para la línea VU817, * p≤0.05, los experimentos se realizaron por triplicado.

VI.IV. Células H2AX positivas

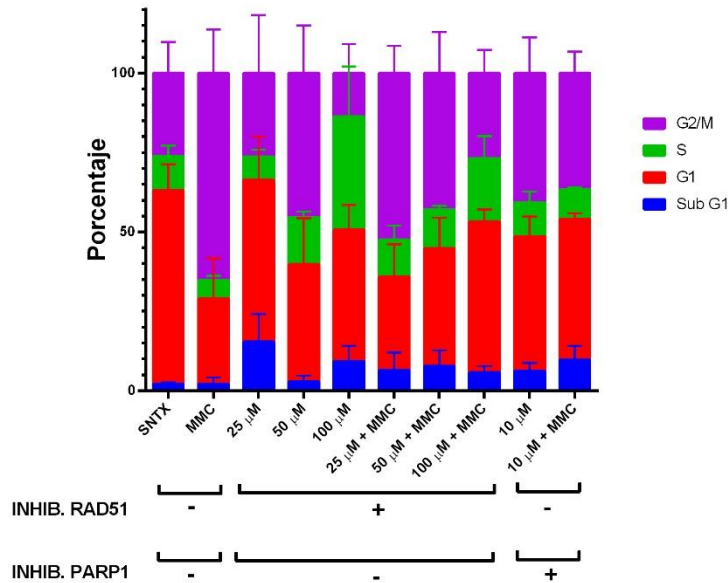
A continuación por medio del programa FlowJo 7.6.1 se seleccionaron solo aquellas células con marca de γ H2AX para conocer si las células con daño presentaban un patrón de distribución del ciclo celular distinto inducido por alguno de los inhibidores. Se tomó como el 100% aquellas células positivas para la γ H2AX y se dividieron por fase del ciclo celular.

Al analizar únicamente las células positivas para la γ H2AX, es decir aquellas que se encuentran señalizando DSB en búsqueda de nuevos patrones de distribución del ciclo celular se conservaron las mismas tendencias observadas en las células totales tanto para la línea NL53 (Gráfica 10A) como para la VU817 (Gráfica 10B).

A) NL53 CICLO CELULAR γ H2AX POSITIVAS



B) VU817 CICLO CELULAR γ H2AX POSITIVAS



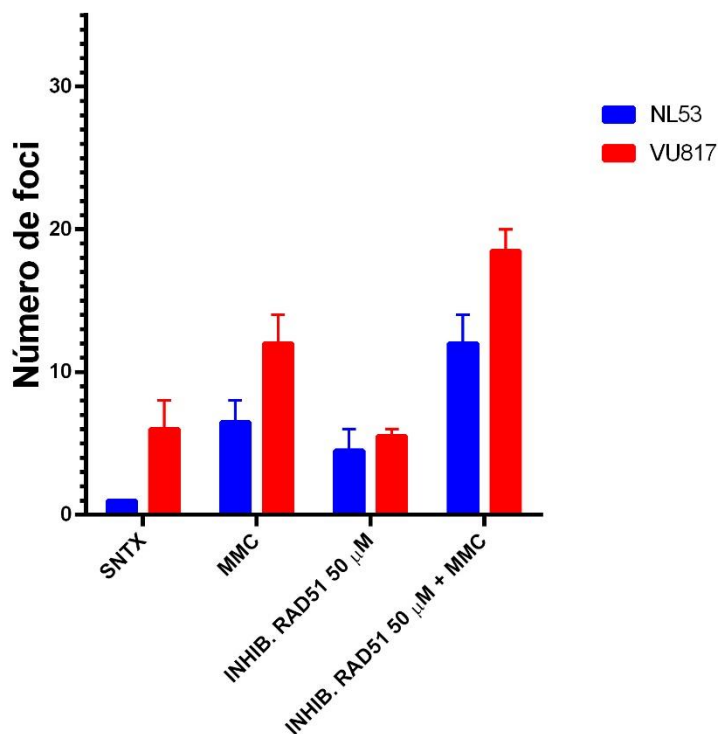
Gráfica 10. La MMC incrementa el porcentaje de células en G₂/M en las células VU817. El inhibidor de RAD51 B02 aumenta el porcentaje de células muertas en Sub G₁ en ambas líneas celulares en todas las concentraciones mientras que en la concentración de 100 μ M aumentó el porcentaje de células en fase S en las células VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL. A) Distribución del ciclo celular para la línea NL53 positivas para la γ H2AX. B) Distribución del ciclo celular para la línea VU817 positivas para la γ H2AX, * p \leq .05, los experimentos se realizaron por triplicado.

VI.V. Inmunolocalización

Los resultados obtenidos en la citometría de flujo permitieron seleccionar al inhibidor de RAD51 B02 en la concentración de 50 μ M para los ensayos de inmunolocalización. Por medio de anticuerpos específicos se detectó la presencia de la variante de histona fosforilada γ H2AX además de tres proteínas que se unen a los DSB, RAD51, KU80 y PARP1 en diferentes mecanismos de reparación. Se realizaron marcajes dobles para observar la colocalización con la γ H2AX de las diferentes proteínas de unión a DSB se realizaron dos replicas para cada condición experimental y en cada una se leyeron 100 células (Gráficas 11-19 y Figuras 10-21).

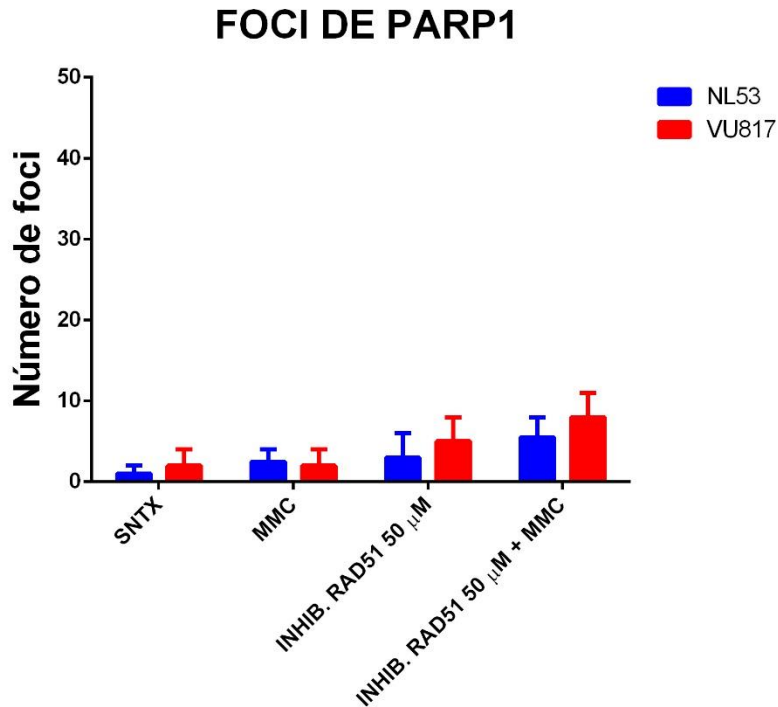
En las células marcadas con la γ H2AX y PARP1 se encontró reducida cantidad de *foci* de la γ H2AX en los controles sin tratamiento, sin embargo se observó mayor número en la línea VU817, mientras que en el tratamiento con MMC aumentó en ambas líneas celulares, además en el tratamiento con el inhibidor de RAD51 solamente aumentó en las células NL53, en el tratamiento combinado se encontró aumento en ambas líneas celulares el cual fue mayor al observado en cada uno de los tratamientos simples (Gráfica 11).

FOCI DE γ H2AX EN CÉLULAS MARCADAS PARA PARP1



Gráfica 11. Número de *foci* de γ H2AX en células con marcaje simultáneo para PARP1. El inhibidor de RAD51 B02 muestra una tendencia a incrementar el número de *foci* de γ H2AX en las células con doble marcaje para PARP1 y γ H2AX en ambas líneas celulares, se muestran tratamientos el inhibidor B02 [50 μ M] y/o MMC además del control sin tratamiento (SNTX) en las líneas NL53 y VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL, * $p < 0.05$. Los experimentos se realizaron por duplicado.

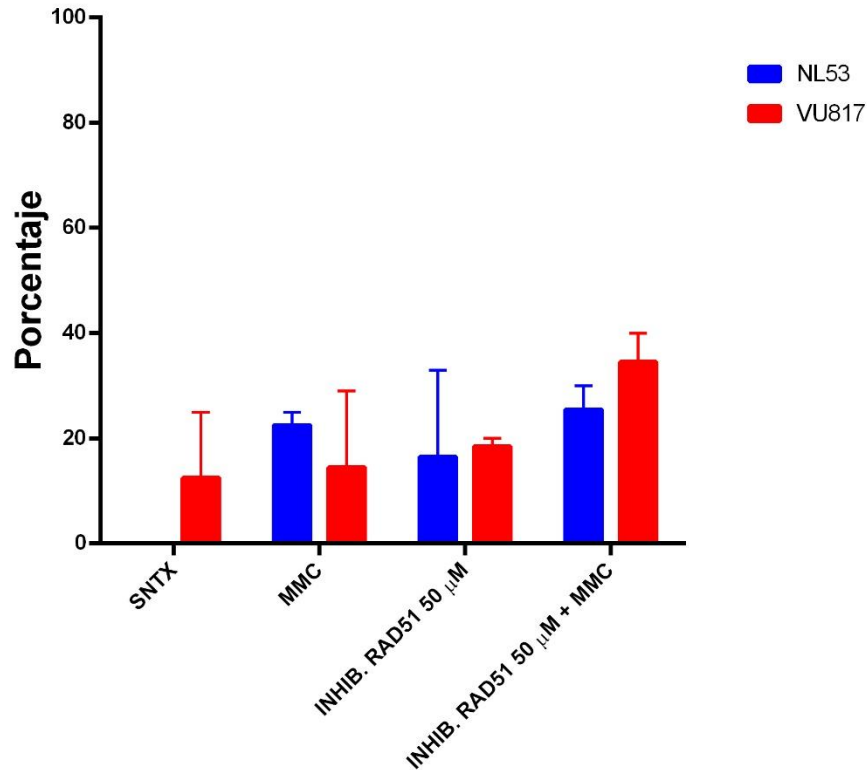
Al analizar el número de *foci* de PARP1 el tratamiento con MMC no aumentó el número de manera importante, además el tratamiento con el inhibidor de RAD51 B02 indujo aumento del número de *foci* de PARP1 en ambas líneas celulares el cual fue más evidente cuando se combinó con MMC (Gráfica 12).



Gráfica 12. Número de *Foci* de PARP1. El tratamiento con MMC aumenta el número de *foci* de PARP1 en tratamiento simple o combinado con el inhibidor de RAD51 en las líneas NL53 y VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL, * $p \leq 0.05$. Los experimentos se realizaron por duplicado.

En el SNTX no se observaron *foci* de PARP1 colocalizando con la γ H2AX en la línea celular NL53, mientras que en la línea VU817 se encontraron aunque en bajo porcentaje, por otra parte, en el tratamiento con MMC este porcentaje aumentó en la línea NL53 y en las células VU817 fue similar al observado en el control SNTX, el tratamiento con el inhibidor de RAD51 causó aumento en el porcentaje de colocalización el cual fue más evidente en las células NL53, en el tratamiento combinado hubo aumento mayor que el observado en los tratamientos simples (Gráfica 13).

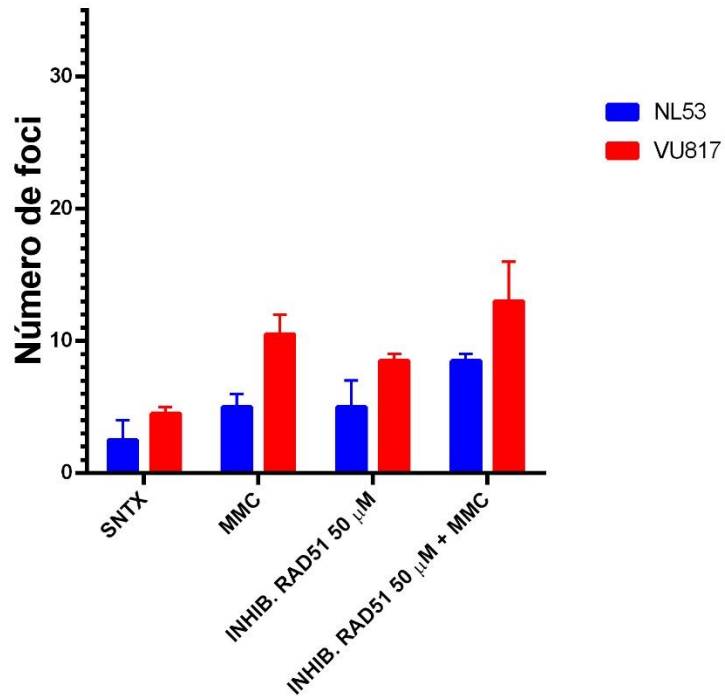
COLOCALIZACIÓN DE PARP1 CON γ H2AX



Gráfica 13. Colocalización de PARP1 con la γ H2AX. El inhibidor de RAD51 B02 muestra una tendencia a aumentar el número de *foci* donde colocalizan PARP1 y γ H2AX en ambas líneas celulares, se muestran tratamientos el inhibidor B02 [50 μ M] y/o MMC además del control sin tratamiento (SNTX) en las líneas NL53 y VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL, * $p \leq 0.05$. Los experimentos se realizaron por duplicado.

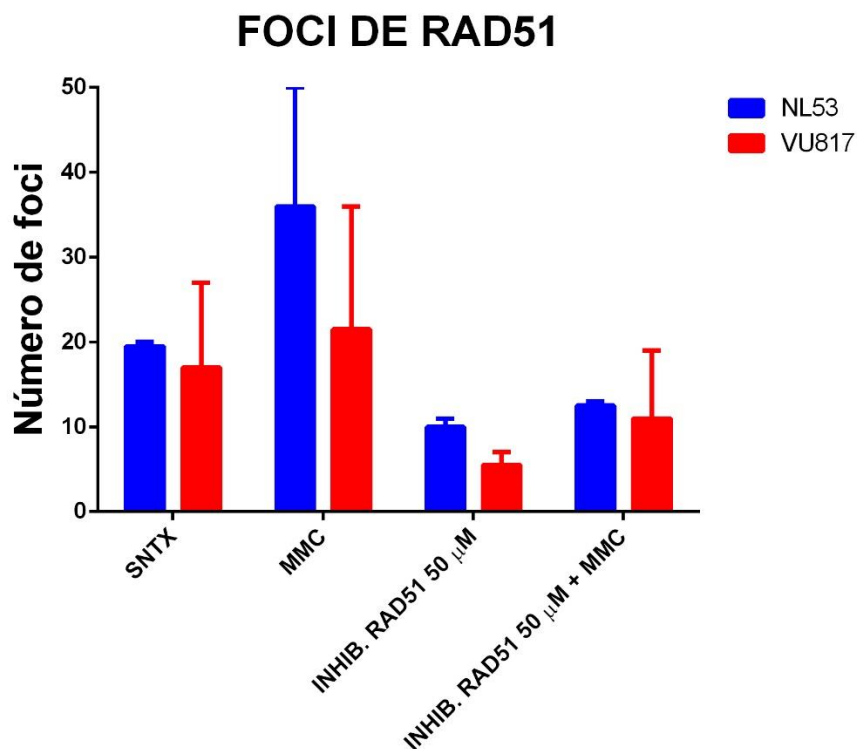
En el marcaje doble con los anticuerpos específicos para RAD51 y γ H2AX se observó aumento en el número de *foci* de γ H2AX para los tratamientos con MMC respecto al control en ambas líneas celulares, además se encontró aumento en el número de *foci* con el inhibidor B02 similar al del tratamiento con MMC para ambas líneas celulares, mientras que en el tratamiento combinado mostró aumento en el número de *foci* aún mayor que en el observado con MMC o B02 en ambas líneas celulares (Gráfica 14).

FOCI DE γ H2AX EN CÉLULAS MARCADAS PARA RAD51



Gráfica 14. Número de *foci* γ H2AX en células con marcaje simultáneo para RAD51. El inhibidor de RAD51 B02 muestra una tendencia a incrementar el número de *foci* de γ H2AX en las células con doble marcaje para RAD51 y γ H2AX en ambas líneas celulares, se muestran tratamientos el inhibidor B02 [50 μ M] y/o MMC además del control sin tratamiento (SNTX) en las líneas NL53 y VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL, * $p \leq 0.05$. Los experimentos se realizaron por duplicado.

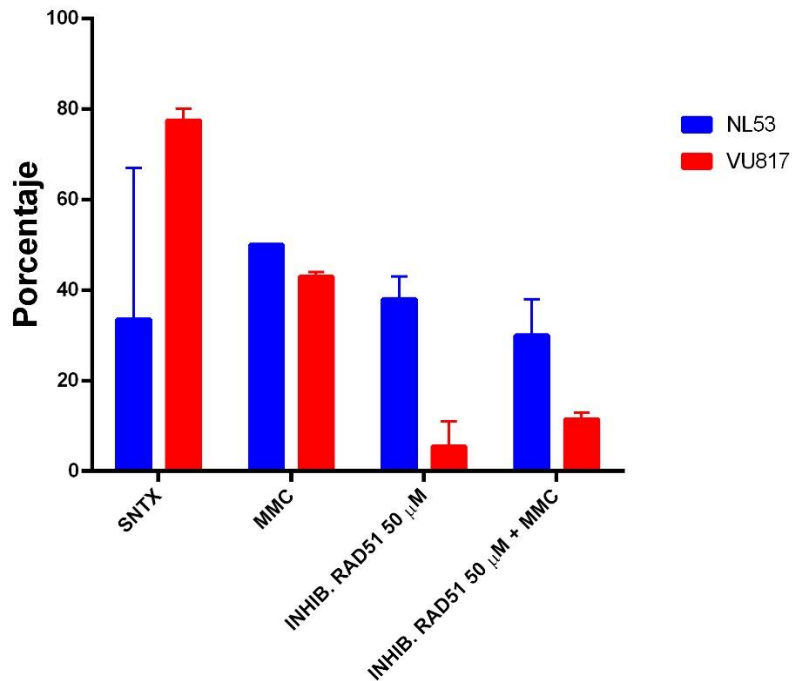
El tratamiento con MMC incrementó el número de *foci* de RAD51 en ambas líneas celulares, el tratamiento con el inhibidor de RAD51 mostró disminución del número de *foci* de RAD51 tanto en tratamiento simple como en el combinado con MMC, sin embargo se encontró mayor cantidad en el tratamiento combinado para ambas líneas (Gráfica 15).



Gráfica 15. Número de *foci* de RAD51. El inhibidor de RAD51 B02 disminuye el número de *foci* de γ H2AX en ambas líneas celulares, se muestran tratamientos el inhibidor B02 [50 μ M] y/o MMC además del control sin tratamiento (SNTX) en las líneas NL53 y VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL, * $p \leq 0.05$. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Se observó mayor porcentaje de colocalización entre γ H2AX con RAD51 en la línea VU817 respecto de la NL53, el tratamiento con MMC aumentó en el porcentaje en la línea celular NL53 mientras que disminuyó en la línea celular VU817, en el tratamiento con el inhibidor B02 mostró ligera reducción en las células NL53 la cual resultó aún más marcada en la línea celular VU817, finalmente en los tratamientos combinados del inhibidor y MMC se encontró menor porcentaje de colocalización comparado con los tratamientos individuales de inhibidor y MMC (Gráfica 16).

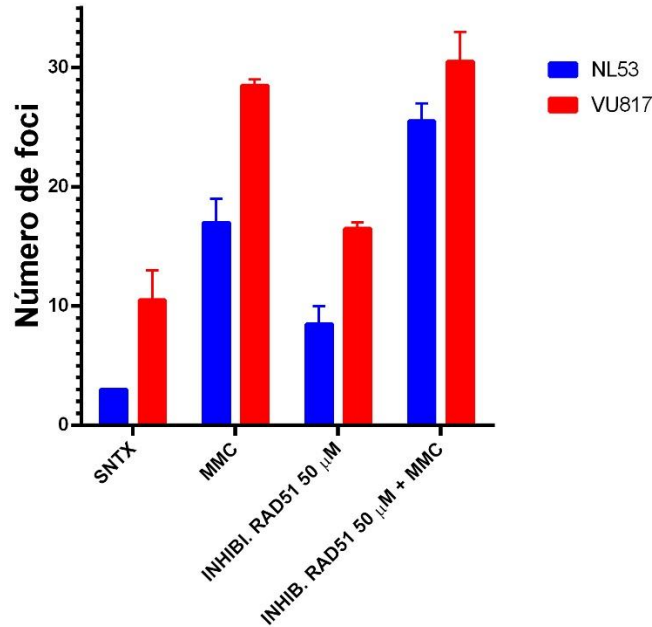
COLOCALIZACIÓN DE RAD51 CON γ H2AX



Gráfica 16. Colocalización de RAD51 con la γ H2AX. El inhibidor de RAD51 B02 muestra una ligera tendencia a disminuir el número de *foci* donde colocalizan la γ H2AX y RAD51 en la línea NL53 mientras que esta tendencia es más marcada en la línea VU817, se muestran tratamientos el inhibidor B02 [50 μ M] y/o MMC además del control sin tratamiento (SNTX) en las líneas NL53 y VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL, * $p < 0.05$. Los experimentos se realizaron pro duplicado.

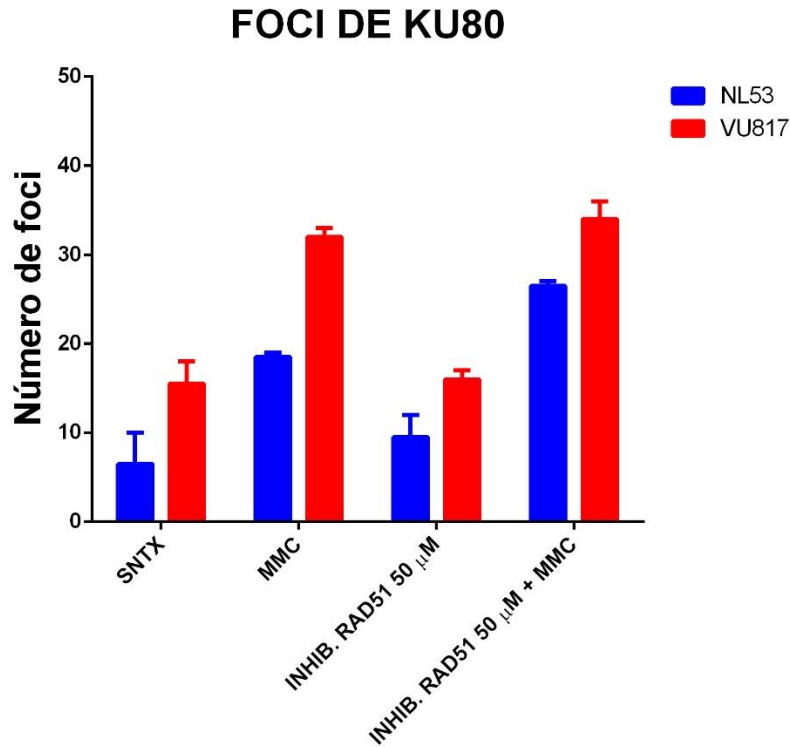
En las células con el marcaje de γ H2AX y Ku80 se observó un patrón similar al que presentaron las células marcadas para γ H2AX y RAD51 con respecto al número de *foci* de γ H2AX, sin embargo hubo un número ligeramente mayor en el número de *foci* encontrados en todas las condiciones experimentales así como en ambas líneas celulares (Gráfica 17).

FOCI DE γ H2AX EN CÉLULAS MARCADAS PARA KU80



Gráfica 17. Número de *foci* de γ H2AX en células con marcaje simultáneo para Ku80. El inhibidor de RAD51 B02 muestra una tendencia a incrementar el número de *foci* de γ H2AX en las células con doble marcaje para Ku80 y γ H2AX en ambas líneas celulares, se muestran tratamientos el inhibidor B02 [50 μ M] y/o MMC además del control sin tratamiento (SNTX) en las líneas NL53 y VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL, * $p \leq 0.05$. Los experimentos se realizaron por duplicado.

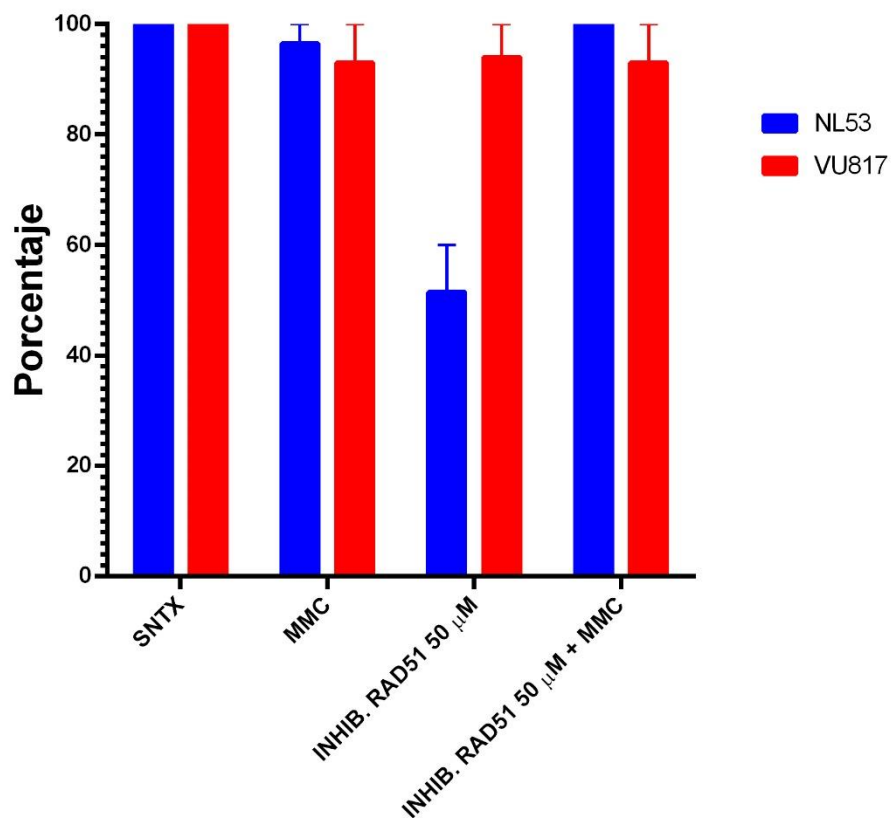
Cuando se analizó en número de *foci* de Ku80 se observó que el tratamiento con MMC incrementó éste en las dos líneas celulares, mientras que el tratamiento combinado del inhibidor B02 y MMC mostraron este mismo efecto sin embargo es atribuible a la MMC por lo que el inhibidor de RAD51 B02 no indujo cambios apreciables en el número de *foci* (Gráfica 18).



Gráfica 18. Número de *Foci* de Ku80. El tratamiento con MMC aumenta el número de *foci* de Ku80 en tratamiento simple o combinado con el inhibidor de RAD51 en las líneas NL53 y VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL, * $p \leq 0.05$. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Respecto a la colocalización con la γ H2AX se encontró que en ambas líneas celulares fue del 100% para el SNTX en ambas líneas celulares mientras disminuyó ligeramente con el tratamiento de MMC, en el tratamiento con el inhibidor B02 se observó gran reducción en las células NL53 mientras que en la línea VU817 se observó reducción equivalente a la observada en el tratamiento con MMC, en el tratamiento combinado del inhibidor de B02 y MMC se conservó 100% de colocalización en la línea NL53 mientras que en la línea VU817 se observó un porcentaje equivalente al de los tratamientos simples (Gráfica 19).

COLOCALIZACIÓN DE KU80 CON γ H2AX



Gráfica 19. Colocalización de Ku80 con la γ H2AX. El inhibidor de RAD51 B02 no altera el porcentaje de *foci* donde colocalizan Ku80 y γ H2AX salvo en la línea NL53 en tratamiento único, se muestran tratamientos el inhibidor B02 [50 μ M] y/o MMC además del control sin tratamiento (SNTX) en las líneas NL53 y VU817, la MMC se administró en una concentración de 10 ng/mL, * $p \leq 0.05$. Los experimentos se realizaron por duplicado.

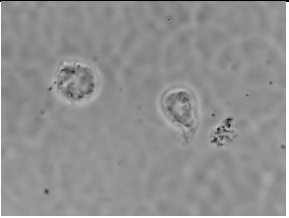

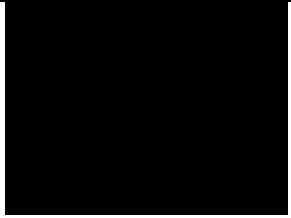

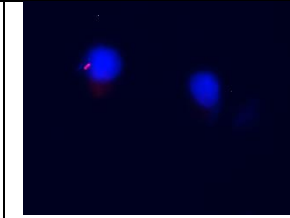

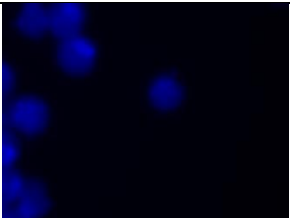
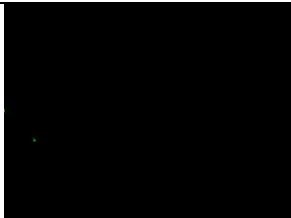

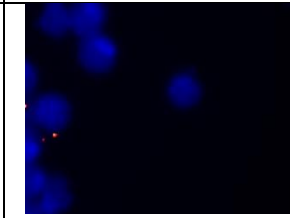
Sin tratamiento.					
Línea	Contraste	DAPI	γ H2AX	RAD51	EMPALME
NL53					
VU817					

Figura 10. Imágenes representativas de inmunolocalización para el control sin tratamiento con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y RAD51 (rojo).




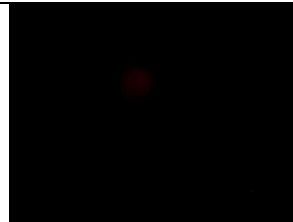

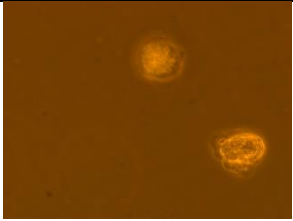
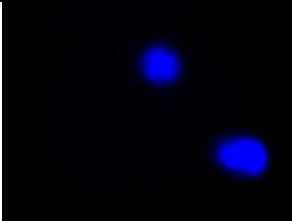
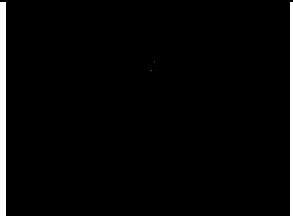

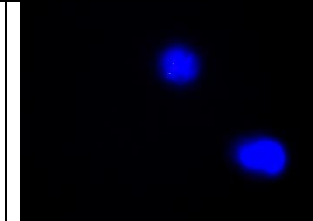
MMC.					
Línea	Contraste	DAPI	γ H2AX	RAD51	EMPALME
NL53					
VU817					

Figura 11. Imágenes representativas de inmunolocalización para tratamiento con MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y RAD51 (rojo).






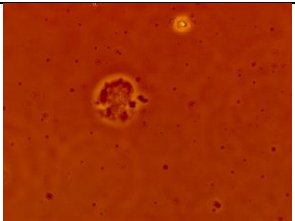




B02.					
Línea	Contraste	DAPI	γ H2AX	RAD51	EMPALME
NL53					
VU817					

Figura 12. Imágenes representativas de Inmunolocalización para tratamiento con el inhibidor de RAD51 B02 con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y RAD51 (rojo).

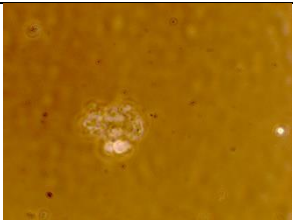
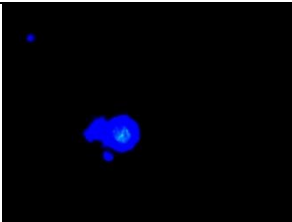
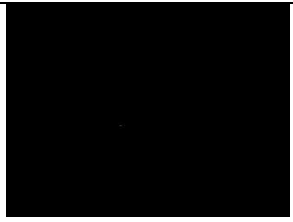
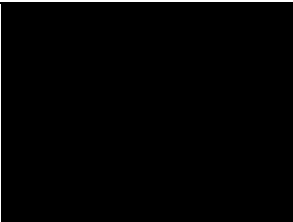
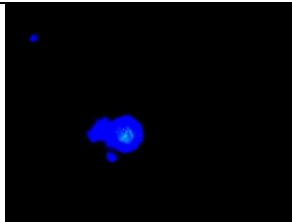


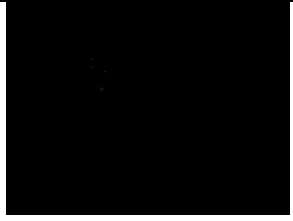


B02 +MMC.					
Línea	Contraste	DAPI	γ H2AX	RAD51	EMPALME
NL53					
VU817					

Figura 13. Imágenes representativas de Inmunolocalización para tratamiento con el inhibidor de RAD51 B02 y MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y RAD51 (rojo).


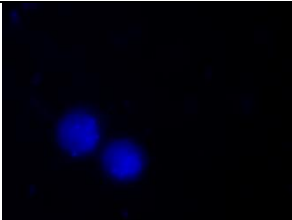

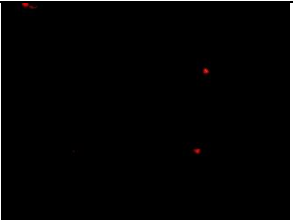
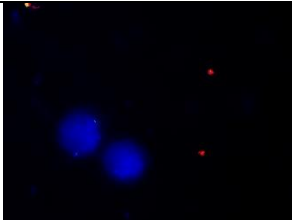

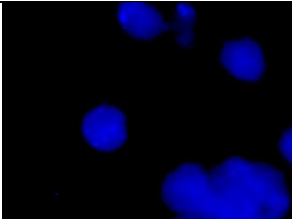

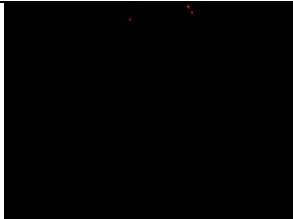
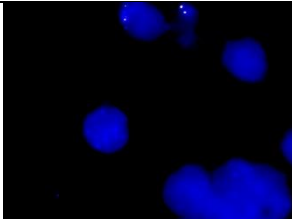
Sin tratamiento.					
Línea	Contraste	DAPI	γ H2AX	Ku80	EMPALME
NL53					
VU817					

Figura 14. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el control sin tratamiento con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y Ku80 (rojo).


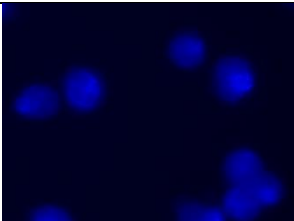
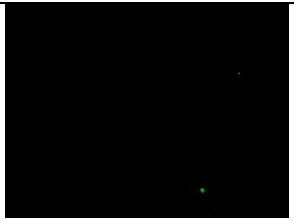

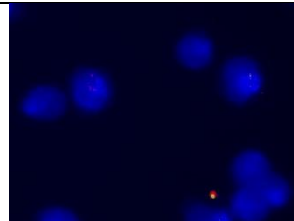

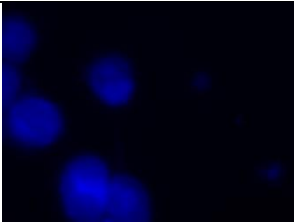
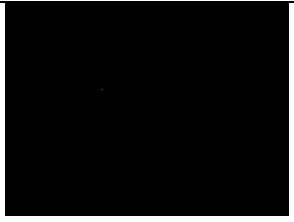
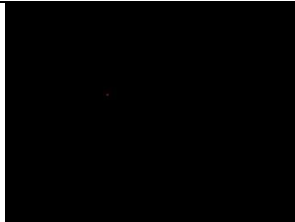
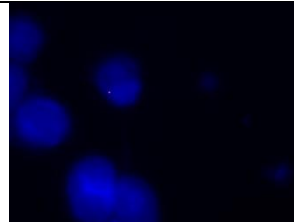
MMC.					
Línea	Contraste	DAPI	γ H2AX	Ku80	EMPALME
NL53					
VU817					

Figura 15. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento de MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y Ku80 (rojo).


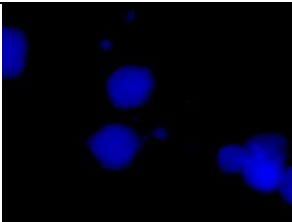
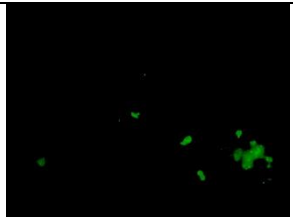
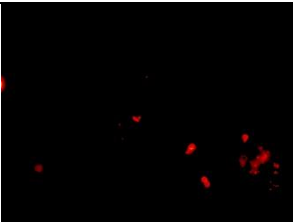
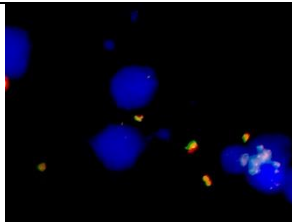


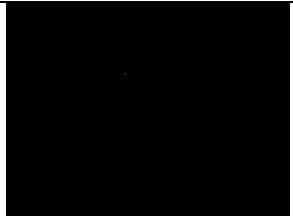


B02.					
Línea	Contraste	DAPI	γ H2AX	Ku80	EMPALME
NL53					
VU817					

Figura 16. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento con el inhibidor de RAD51 B02 con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y Ku80 (rojo).

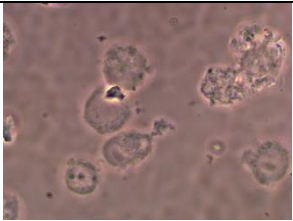
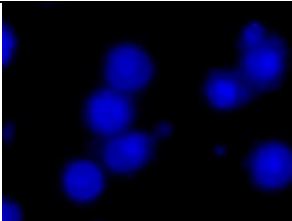
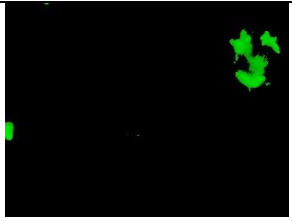

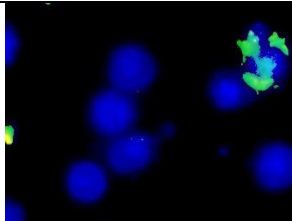
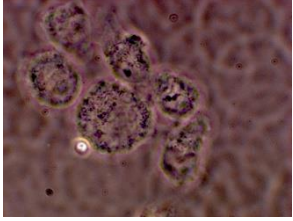
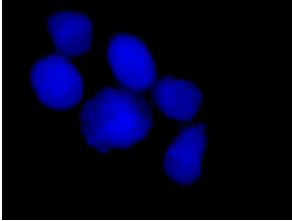


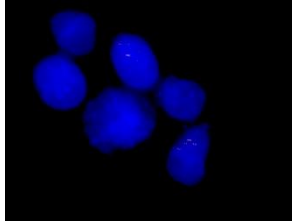
B02 + MMC.					
Línea	Contraste	DAPI	γ H2AX	Ku80	EMPALME
NL53					
VU817					

Figura 17. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento con el inhibidor de RAD51 B02 y MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y Ku80 (rojo).







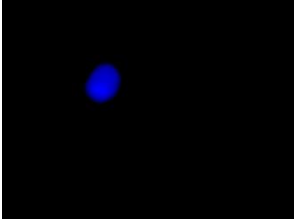



Sin tratamiento.					
Línea	Contraste	DAPI	γ H2AX	PARP1	EMPALME
NL53					
VU817					

Figura 18. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el control sin tratamiento con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y PARP1 (rojo).


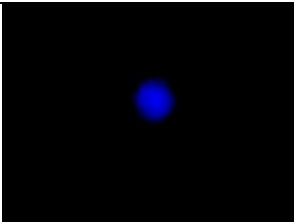
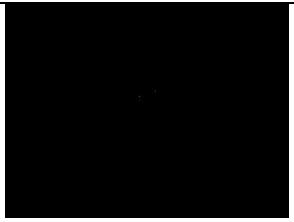
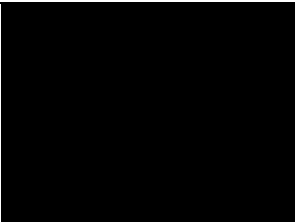
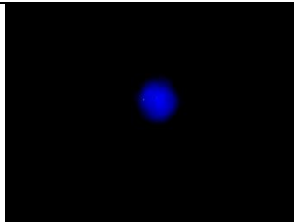

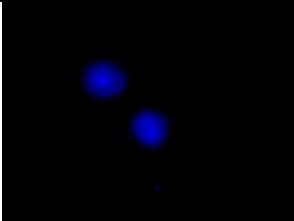
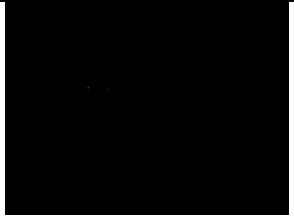

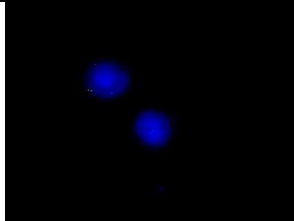
MMC.					
Línea	Contraste	DAPI	γ H2AX	PARP1	EMPALME
NL53					
VU817					

Figura 19. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento de MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y PARP1 (rojo).

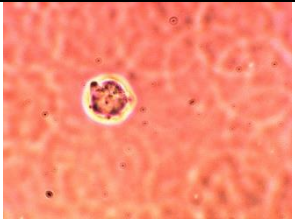

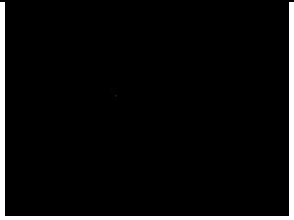



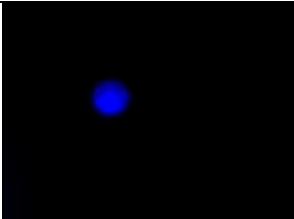


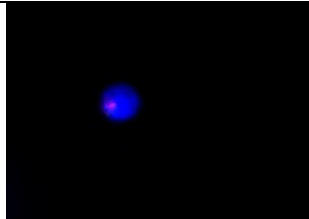
B02.					
Línea	Contraste	DAPI	γ H2AX	PARP1	EMPALME
NL53					
VU817					

Figura 20. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento del inhibidor de RAD51 B02 con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y PARP1 (rojo).

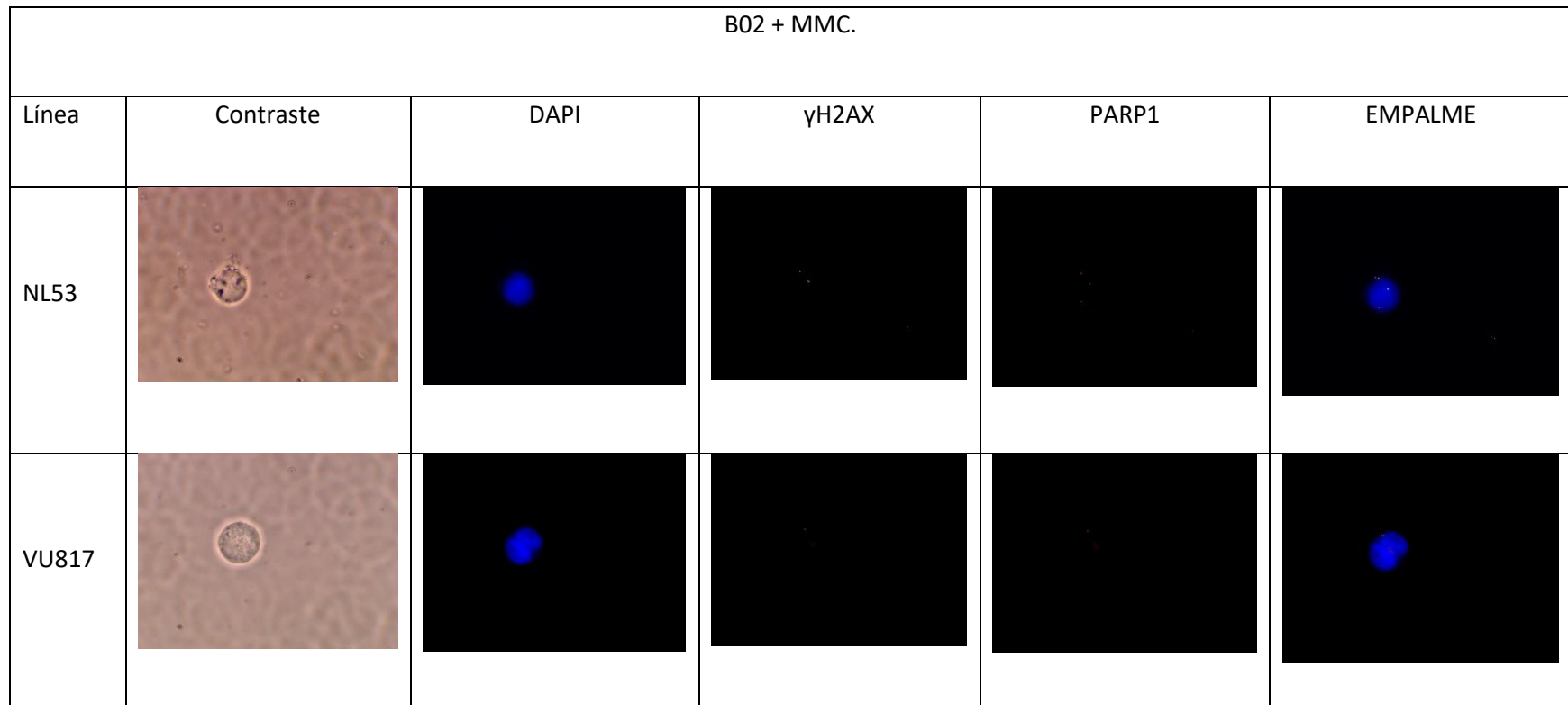


Figura 21. Imágenes representativas de Inmunolocalización para el tratamiento del inhibidor de RAD51 B02 y MMC con los anticuerpos primarios para la γ H2AX (verde) y PARP1 (rojo).

VII. DISCUSIÓN

Las células eucariontes utilizan dos mecanismos principales para reparar los DSB los cuales son la cHR y la cNHEJ, sin embargo, se ha reportado la existencia de mecanismos alternos como son la aHR y la aNHEJ. La vía FA/BRCA es el mecanismo responsable de sensar y reparar los ICL generando diferentes intermediarios de reparación, uno de ellos son los DSB que se reparan de manera preferencial por cHR, no obstante, cuando las células no pueden acceder a esta vía las DSB se reparan por medio de cNHEJ generando como resultado la formación de figuras radiales, ambos mecanismos (cHR y cNHEJ) son considerados canónicos. Actualmente no se conoce la relevancia que tienen los mecanismos alternos en las células AF, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto que ejerce la inhibición química de RAD51 (componente de la cHR y aHR) y PARP1 (aNHEJ) sobre la viabilidad y proliferación celular, la dinámica del ciclo celular, la presencia de la H2AX así como su colocalización nuclear con proteínas de la cNHEJ, aHR y aNHEJ.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las células AF utilizan como mecanismo principal para reparar los DSB a la cNHEJ generando las figuras radiales como resultado, por otra parte los mecanismos juegan un papel compensatorio ante la ausencia de la cHR, a pesar de que la aHR juega un papel secundario la ausencia de esta vía resulta letal para la célula mientras que el papel de la aNHEJ no parece ser muy relevante, en la Figura 22 se muestra un modelo de la activación de estos mecanismos en las células normales y AF propuesto a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

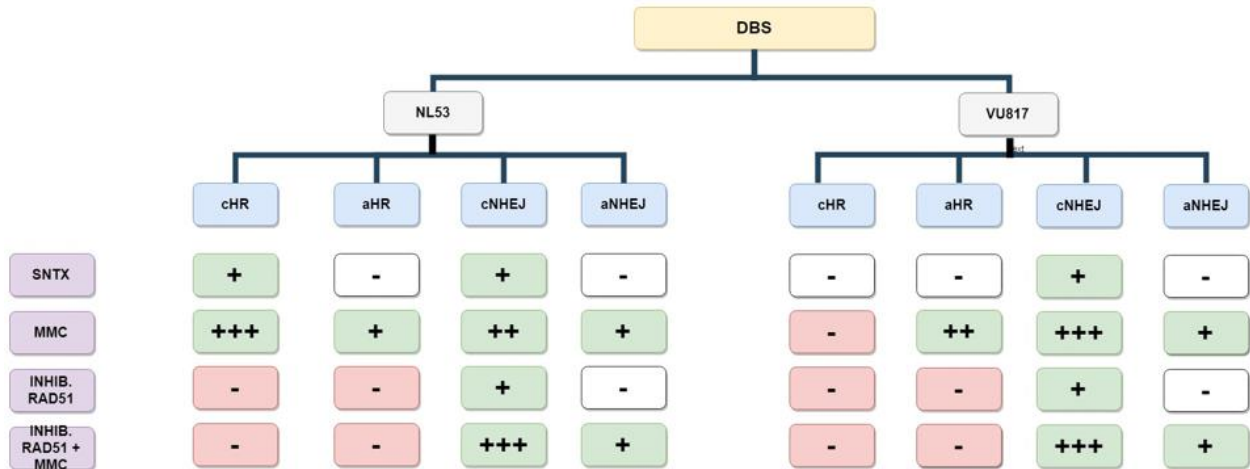


Figura 22. Activación de las vías de reparación de DSB en células normales y AF en cuatro diferentes condiciones experimentales, los símbolos (+) representan el uso de la vía de reparación indicada.

Existe evidencia que sugiere que en las células con mutaciones en genes *FANCD1* el suprimir a la cNHEJ puede eliminar la sensibilidad a agentes inductores de ICL así como restablecer el fenotipo celular normal (Adamo et al. 2010; Pace et al. 2010), mientras que hay reportes contradictorios en los cuales no se observa dicho efecto al inhibir o bloquear a la cNHEJ, el grupo de Bunting reportó que cuando al bloquear a los genes *Ku80*, *DNA-PKcs* o *53bp1* en fibroblastos embionarios de ratón mutantes para *Fancc2* no se revierte el fenotipo de las células AF (Bunting et al. 2012), por otra parte Pace y colaboradores encontraron que en células DT40 con una mutación bialélica de *Fancc* cuando se genera una mutación adicional en *Lig4* las células no se recuperan de la hipersensibilidad a MMC o DEB (Pace et al. 2010). Finalmente Thongthip y colaboradores encontraron que la supresión de diferentes componentes de la cNHEJ como *DNA-PKcs*, *LIG4* o *53BP1* por medio de inhibidores químicos, RNAi o CRISPR-cas9 no es capaz de rescatar defectos en proliferación y solamente la supresión de *53BP1* disminuye de forma parcial las anomalías cromosómicas en células RA3087 (FA-A), esta aparente discrepancia en los resultados de los diferentes grupos de trabajo puede deberse a diferencias entre los diferentes organismos, tipos celulares e inclusive interacciones entre los componentes de ambas vías (Thongthip et al. 2017). El conocer la manera en que

interaccionan estas vías así como la participación de otros mecanismos en células hematopoyéticas de pacientes AF como es la línea VU817 resultaría de utilidad para el diseño de estrategias terapéuticas.

De igual manera en algunos estudios se propone la participación de diferentes mecanismos involucrados en la reparación de las DSB (Bennardo et al., 2008; Hanlon Newell et al., 2008; Wang et al., 2001) por lo que la elección del mecanismo de reparación es un proceso complejo que depende de diversos factores tales como la fase del ciclo celular en el que se produce el DSB, si se llevan a cabo o no eventos de resección de las hebras así como la extensión de ésta, regulación positiva o negativa sobre las proteínas involucradas, un ejemplo de esto es RAD51, del que se ha reportado existen reguladores positivos y negativos durante la reparación de los DSB (Ceccaldi, Rondinelli, y D'Andrea 2016; Wang et al., 2015). Scully y colaboradores proponen un modelo de árbol de decisiones por el que la célula elige el mecanismo más apropiado para reparar el DSB, en este modelo aspectos como la accesibilidad al DSB, la estructura del DSB, si existe o no resección o el ambiente de resección pueden ayudar a cambiar la decisión entre cNHEJ, aNHEJ, cHR o reparación por alineamiento de hebra sencilla (SSA) (Scully et al. 2019) (Figura 23).

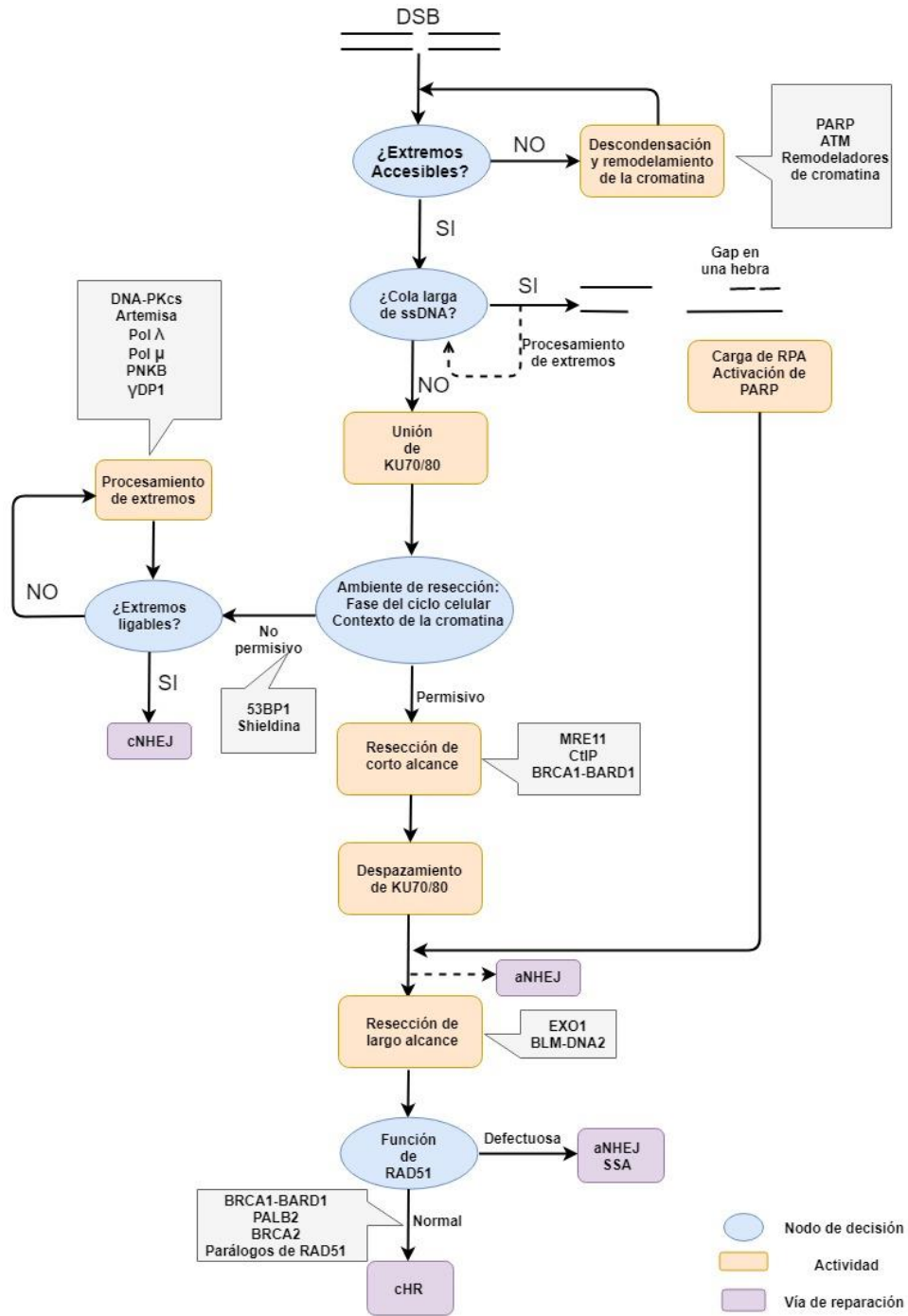


Figura 23. Árbol de decisiones para la reparación de un DSB. Activación de PARP y la señalización vía ATM son parte de una respuesta temprana a las DSB que pueden facilitar la descondensación y remodelamiento de la cromatina y el reconocimiento de los extremos de DNA. La decisión inicial depende de la estructura de los extremos de DNA, los extremos romos o mínimamente reseccionados unen al factor de la cNHEJ Ku 70/80. ssDNA o DNA con *gaps* se unen directamente a PARP lo que puede evitar el reconocimiento del extremo de DNA por Ku 70/80 si no existe un procesamiento adicional. La resección de los extremos de DNA es crucial para la decisión de la vía de reparación entre cNHEJ o cHR. Si el ambiente celular desfavorece la resección se posibilita la retención de Ku 70/80 en el extremo de DNA, conduciendo a cNHEJ. El procesamiento adicional del extremo de DNA dentro de las sinapsis de cNHEJ facilita la ligación. Si el ambiente celular favorece la resección de extremos favorecen el desplazamiento de Ku 70/80 y el acoplamiento de la resección de gran escala necesaria para la cHR. Mecanismos propensos a error como aNHEJ o SSA) pueden funcionar de manera oportunista sobre los ssDNA o sobre intermediarios de recombinación. Imagen modificada de Scully et al. 2019.

VII.I. La inhibición de PARP1 no afecta la viabilidad y proliferación celular

Cuando se trataron ambas líneas celulares con el inhibidor de PARP1 4AN no se observaron alteraciones significativas en la viabilidad celular ni tampoco en la densidad celular, estos resultados concuerdan con lo esperado debido a que en el caos de las células NL53 ambas vías canónicas son funcionales y el bloquear a un mecanismo de respaldo no debería impedir la reparación de la mayor parte de los DSB, respecto a las células AF-A que carecen la vía libre de error cHR aún cuentan con la cNHEJ funcional, de acuerdo con reportes previos las células deficientes en la vía FA/BRCA hiperactivan la cNHEJ lo que conduce a la formación de figuras radiales, es decir muchos de los DSB son reparados erróneamente (Bunting et al. 2010). Es posible que la hiperactivación de la cNHEJ en las células AF imposibilite la reparación de los DSB por mecanismos que funcionen de manera similar como es el caso de la aNHEJ, además de acuerdo con el modelo de árbol de decisión de Scully y colaboradores para que un DSB se repare por medio de la aNHEJ es necesario el desplazamiento del heterodímero KU70/80 y al encontrarse hiperactivada la cNHEJ se esperaría que gran cantidad de DSB se protejan de la resección por medio de la unión de KU70/80 favoreciendo la reparación por cNHEJ.

VII.II. La inhibición de RAD51 disminuye la viabilidad y proliferación celular

Cuando se bloqueó a RAD51 ambas líneas celulares mostraron una disminución importante de la viabilidad así como de la proliferación celular. Estos resultados fueron los esperados en el caso de las células NL53 debido a que la inhibición de RAD51 imita el fenotipo de las células mutantes para *FANCR* que al igual que en mutantes para otros genes *FANC* presentan una muerte celular incrementada e hipersensibilidad a MMC, sin embargo para las células *FANCA* deficientes los resultados no fueron los esperados, se ha reportado que en diferentes modelos y células de pacientes AF la presencia de *foci* de RAD51 en los sitios de las DSB (Digweed et al., 2002; Godthelp et al., 2002; Zwet et al., 2002) lo que sugiere que a pesar de ser incapaces de activar la HR por medio de la vía FA/BRCA RAD51 puede reclutarse a los sitios de los DSB y ejercer un papel en su reparación, no obstante, no es de esperar impacto sobre la viabilidad celular tan grande como el observado cuando la célula cuenta con la cNHEJ para reparar las DSB, además el modelo booleando de nuestro grupo de trabajo destaca la participación de un mecanismo alternativo de HR únicamente cuando ambos mecanismos canónicos (cHR y cNHE) se encuentran impedidos (Rodríguez et al. 2012). Nuestros resultados sugieren que la aHR es un mecanismo esencial para reparar los DSB aún cuando no tiene un rol principal, es probable que repare aquellos DSB en los cuales la resección imposibilite la reparación por medio de la cNHEJ.

VII.III. La inhibición de PARP1 no altera la reparación de los DSB en células normales o AF

Los resultados obtenidos del análisis de aberraciones cromosómicas no mostraron cambios significativos al tratamiento con el inhibidor de PARP1, el único cambio significativo observado fue el aumento en el número de células aberrantes en las células VU817, lo cual se puede deber a que el tener una de las vías canónicas comprometida sensibiliza de manera mayor al bloqueo de una vía alterna, aún cuando esta pudiera no ser tan relevante, lo que se refleja como ligero aumento en el número de lesiones no reparadas. A diferencia de lo encontrado en el presente trabajo, diversos reportes describen que las células tumorales con mutaciones en genes componentes de la cHR se vuelven hiperdependientes de mecanismos de reparación de DSB en los que participa PARP1 como es el caso de la aNHEJ (Bast, Hennessy y Mills 2009;

Bryant et al., 2005). Ceccaldi y colaboradores encontraron que en células tumorales de cáncer ovárico epitelial la polimerasa θ (POL θ) se sobre expresa, cuando utilizaron un siRNA para inhibirla se mostró aumento de la actividad de la HR, así como incremento en el número de *foci* de RAD51 inducidos por IR, lo que sugiere que la POL θ inhibe a la HR, lo que demostraron al detectar la interacción de POL θ con RAD51 por medio de inmunoprecipitación. Aunado a estos resultados encontraron sobre-expresión de POL θ en algunos tumores deficientes en la HR, posteriormente emplearon tres diferentes grupos de líneas celulares con defectos en HR así como sus respectivos controles en los que evaluaron supervivencia así como sensibilidad a inhibidores de PARP o ATM, MMC o cisplatino mostrando que las células deficientes en la HR son hipersensibles a la inhibición de PARP1, finalmente describieron que la doble mutación para *Fancd2* y *Pol θ* conduce a letalidad embrionaria (Ceccaldi et al., 2015).

Esta discrepancia entre estos resultados posiblemente se deba a que a diferencia de los estudios realizados por otros grupos, en nuestro estudio se utilizaron células deficientes en *FANCA* cuyo producto forma parte del *core* por lo que las proteínas que participan en la recombinación homóloga son funcionales, permitiendo la reparación por medio de la aHR después de un evento de resección que desplace a KU70/80, este desplazamiento impide la reparación por cNHEJ, mientras que las mutaciones en genes de HR imposibilitarían el uso de cualquier mecanismo de recombinación homóloga llevando a la célula a ser hiperdependiente de otros mecanismos como la aNHEJ o la SSA.

Por otra parte si se ve afectada la parte intermedia de la vía FA/BRCA como deficiencia en *FANCD2* puede afectarla cHR, esto se ha estudiado en células HeLa S3 tratadas con MMC encontrando se induce letalidad embrionaria interacción de FANCD2 con CtIP (importante en la resección de los DSB durante la cHR) es esencial para el reclutamiento de RPA2 durante la reparación de los DSB inducidos por MMC (Unno et al. 2014).

VII.IV. La inhibición de RAD51 afecta la reparación de los DSB en células silvestres y AF

El inhibidor de RAD51 indujo aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas totales así como en las rupturas no reunidas, estas últimas indicativo de DSB no reparados. Se sabe que las células AF

presentan inestabilidad cromosómica la cual podemos observar como aumento en el número de rupturas no reunidas así como la formación de figuras radiales, por lo cual, este resultado concuerda con lo esperado para la línea celular NL53, sin embargo, no se esperaba aumento importante de la inestabilidad cromosómica en las células VU817 cuando se trataron con el inhibidor de RAD51 ya que al tener la cHR inaccesible, la cNHEJ repararía los DSB de manera preferencial. Estos resultados muestran que la aHR es un mecanismo relevante para la supervivencia celular ante el reto de lesiones que causan DSB, lo que sugiere que a pesar de que la mayoría de los DSB se reparan por cNHEJ un número importante son reseccionados para posteriormente repararse por otros mecanismos entre los que se encuentran la recombinación homóloga independiente de la vía FA/BRCA.

Por otra parte llama la atención que el tratamiento con el inhibidor de RAD51 disminuyese el número de figuras radiales en las células AF-A cuando lo esperado era aumento en la frecuencia debido al requerimiento adicional de la vía canónica dado por el bloqueo de la aHR. Una posible explicación de este fenómeno es que los mecanismos alternos de recombinación homóloga bajo ciertas condiciones como son la ausencia de una cHR funcional reparen los DSB de manera errónea y participen en la formación de figuras radiales al igual que la cNHEJ, sin embargo a la fecha no existen reportes que apoyen esta hipótesis. Por otra parte, también es posible que aquellos DSB procesados por exonucleasas y en los que se imposibilita la reparación por cNHEJ se reparen principalmente por un mecanismo RAD51 dependiente pero independiente de la vía FA/BRCA y tras el bloqueo de RAD51 la célula no sea capaz de reparar la mayor parte del daño por algún otro mecanismo conduciendo a muerte celular antes de la formación de gran número de figuras radiales, esta hipótesis es compatible con el modelo de árbol de decisiones ya que tras la resección de los extremos del DSB la célula es capaz de reparar el daño por mecanismos de HR si RAD51 funciona apropiadamente o por SSA o aNHEJ si RAD51 no funciona apropiadamente, lo que sugiere que estas dos últimas no son capaces de reparar todo el daño que repara la aHR.

Para demostrar la hipótesis generada en el modelo booleano (Rodríguez et al. 2012) respecto a un mecanismo de recombinación homóloga dependiente del complejo MRN cuando las vías canónicas están ausentes nuestro grupo se inhibió a MRE11 con mirina componente de este complejo, se utilizaron 2 líneas celulares una silvestre NL53 y la línea VU817 mutante para *FANCA* las cuales se trataron con MMC durante 24 horas y con mirina a una concentración del 10 $\mu\text{M}/\text{mL}$ durante 6 o 18 horas antes de la cosecha a 24 horas y se analizó la frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas así como la distribución a lo largo del ciclo celular. Los resultados obtenidos mostraron que la inhibición de MRE11 no incrementa de manera significativa la frecuencia de aberraciones cromosómicas ni tampoco existe diferencia en la frecuencia de figuras radiales en ninguna de las líneas celulares ya sea en tratamiento solo o combinado con MMC, tampoco se encontraron diferencias significativas en la dinámica del ciclo celular inducidas por el tratamiento con mirina ya sea en tratamiento solo o combinado con MMC. Estos resultados no fueron concluyentes probablemente a que el complejo MRN se encuentra involucrado en diferentes mecanismos de reparación como la cHR, cNHEJ y la aNHEJ e incluso antes de la elección del mecanismo para reparar las DSB, los resultados sugieren que el complejo MRN no es esencial para llevar a cabo ninguno de los mecanismos de reparación mencionados (Fiesco Roa 2015).

Existe evidencia contradictoria referente al efecto que tiene la inhibición de la cNHEJ en las células AF, algunos estudios sugieren que la pérdida de la cNHEJ podría restaurar el fenotipo de las células AF (Adamo et al. 2010; Pace et al. 2010), mientras que en otros no se observa esta recuperación tras el bloqueo de la cNHEJ (Bunting et al. 2012; Pace et al. 2010; Thongthip et al. 2017).

Para observar el comportamiento ante la inhibición de la cNHEJ del modelo de nuestro grupo se utilizaron dos líneas celulares linfoblastoides NL49 y VU817 y se trataron con un inhibidor de la DNA-PKcs, NU7026 es un inhibidor ATP competitivo específico para DNA-PKcs y se indujo daño con MMC, los cultivos se cosecharon 48 horas para análisis de aberraciones cromosómicas y viabilidad, se determinó las condiciones de trabajo con una concentración de 50 μM con 18 horas de exposición antes de la cosecha a

las 48 horas. Los resultados obtenidos mostraron que en las células NL53 y VU817 la frecuencia rupturas no reunidas aumenta sin embargo la frecuencia de figuras radiales no muestra diferencias significativas, lo que sugiere que las células AF en efecto son hiperdependientes de la cNHEJ para reparar DSB. Debido a que el mecanismo de acción del inhibidor NU7026 evita la fosforilación por parte de DNA-PKcs de sus blancos entre ellos, así mismo es posible que se impida su disociación de los DSB y esto bloquee la reparación de los DSB por la aHR además de impedir la reparación por cNHEJ, lo que sugiere que la aNHEJ puede desempeñar un papel más relevante (Rodríguez Soto 2015), además la frecuencia de figuras radiales sugiere que existen mecanismos adicionales a la cNHEJ que son capaces de generar figuras radiales, probablemente la cNHEJ.

Existe evidencia que sugiere la competencia entre los distintos mecanismos de reparación de DSB, tal es el caso de la cNHEJ y la cHR donde el trabajo de diversos grupos apunta a una competencia entre ambas vías (Delacôte et al. 2002; Essers 2000; Pierce et al. 2001; Takata et al. 1998). Se reportó que en líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) cuando se inhibe a DNA-PKcs por medio del inhibidor IC86621 hay reducción de la actividad de la cNHEJ y de la cHR lo que probablemente se debe a que la falta de autofosforilación en ciertos dominios impide la disociación de DNA-PKcs del DNA lo cual a su vez evita la unión de proteínas de otros mecanismos de reparación como la cHR (Allen, Halbrook, y Nickoloff, 2003). De igual manera se piensa que la unión temprana del dímero Ku70/80 a los DSB impediría la resección de los extremos bloqueando así las vías dependientes de este evento como son la aHR, la cHR y la aNHEJ (McVey y Lee, 2008).

Nuestros resultados no mostraron modificación en la frecuencia de figuras radiales al inhibir la aNHEJ en las células AF por lo que no es claro si la vía alterna puede denerar figuras radiales, si fuese el caso el bloqueo simultaneo de ambas vías de NHEJ debería disminuir de manera importante la frecuencia de las figuras radiales.

VII.V. La inhibición de PARP1 no altera la dinámica del ciclo celular

El tratamiento con el inhibidor de PARP1 no generó cambios en las fases del ciclo celular tanto en células proficientes o no para la vía FA/BRCA, este resultado correlaciona con lo encontrado en los ensayos de viabilidad y proliferación así como con el análisis de aberraciones cromosómicas; estos datos en conjunto sugieren que la aNHEJ no es un mecanismo indispensable para la reparación de DSB en las células AF con mutaciones río arriba.

Se ha reportado que la aNHEJ funciona durante la fase S del ciclo celular debido a que esta vía depende de la resección llevada a cabo por Mre11 en líneas celulares de osteosarcoma humano (U2OS) y de glioblastoma (T98G) y su uso es solamente de un 10-20% en comparación con la cHR, así este trabajo sugiere que la aNHEJ podría tener no solo una función de soporte de la cNHEJ en los DSB que no pueda reparar sino que actúa de manera independiente aunque en menor grado (Truong et al., 2013).

Es probable que la aNHEJ actúe de manera preferente en entornos celulares donde no es posible reparar por las vías canónicas, además se sabe que las células tumorales deficientes en la cHR son sensibles a la inhibición de PARP1 o POL θ , además se sabe que esta polimerasa interacciona con RAD51 lo que sugiere que podría estar inhibiendo la actividad de la cHR en estas células tumorales (Ceccaldi et al. 2015).

VII.VI. La inhibición de RAD51 induce arresto en las fases G₂/M y S en las células AF

Cuando se analizó la dinámica del ciclo celular tras la inhibición química de RAD51 se obtuvieron resultados inesperados para ambas líneas celulares. Respecto a la línea NL53 de acuerdo con los resultados obtenidos de los experimentos de proliferación así como el análisis de aberraciones cromosómicas se esperaba aumento en las células en G₂/M, sin embargo, no se mostró el arresto aunque sí aumento en las células muertas por apoptosis (Fase Sub G₁), por lo que es posible que las células en G₂/M entren en apoptosis ante la gran cantidad de daño que no se puede reparar por la cNHEJ u otras vías alternas, además estos datos correlacionan con los observados con lo encontrado en el análisis de viabilidad en los que se observó incremento de células muertas proporcional a la concentración del inhibidor de RAD51. El mecanismo de acción del inhibidor B02 (dado por la unión a la hebra 3' saliente de DNA impidiendo la unión de RAD51

así como de otras proteínas involucradas en vías como la cHR o la aHR) es similar a lo encontrado en el paciente reportado por Ameziane y colaboradores cuyo producto traduccional derivado del alelo mutado de *RAD51* afectó los mecanismos de HR (Ameziane et al. 2015).

En la línea celular VU817 si se observó el arresto en G_2/M característico de las células AF y además de un segundo arresto en fase S así como aumento en las células en Sub G_1 . Estos resultados sugieren que en las células AF tras el bloqueo de la aHR aquellas células en fase S se arrestan al no poder utilizar recombinación homóloga buscan otros mecanismos para reparar los DSB como la cNHEJ o aNHEJ, posiblemente aquellos que han sido procesados por nucleasas traten de repararse por aNHEJ o SSA, sin embargo, si el daño es excesivo estos mecanismos no sean suficientes conduciendo a muerte celular.

Por otra parte los pacientes con mutaciones en *FANCR* descritos hasta ahora presentan un patrón de herencia autosómico dominante, muy probablemente por que la pérdida de la función de ambos alelos sea letal (Ameziane et al. 2015; Wang et al. 2015), lo que se puede mimetizar con concentraciones altas del inhibidor de RAD51.

Tsuzuki y colaboradores realizaron entrecruzamientos de ratones heterocigotos para una mutación nula de Rad51 (Rad51+/-) de cuya descendencia no pudieron recuperar progenie homocigota (Rad51-/-) ambos alelos mutados sino únicamente unos pocos embriones en estadios tempranos lo cual sugiere que la perdida completa de Rad51 conlleva a letalidad embrionaria.

VII.VII. la inhibición de RAD51 incrementa ligeramente el reclutamiento de PARP1 a los sitios de DSB

Los ensayos de inmunolocalización mostraron incremento del número de *foci* de H2AX al tratarse con MMC o el inhibidor de RAD51, sin embargo, el tratamiento combinado los incrementó aún mas, este fenómeno se observó para ambas líneas celulares y en los tres grupos de marcajes.

Tal como se esperaba el número de *foci* de PARP1 no fue muy alto pero mostró ligero incremento tras la inhibición de RAD51, además se observó que la inhibición de RAD51 estimuló la colocalización de PARP1 con la H2AX, estos resultados fortalecen la hipótesis que sugiere que la ausencia de mecanismos de

recombinación homóloga hiperactiva la aNHEJ aunque el alcance de esta vía no sea suficiente para permitir la sobrevivencia de las células AF al daño.

A pesar de que no es del todo claro el papel que desempeña la aNHEJ en la reparación de los DSB se ha reportado su sobreactivación en distintos tipos tumorales (Hanlon Newell et al., 2008). Cabe destacar el hecho de que en células tumorales con defectos en *BRCA1/FANCS* o *BRCA2/FANCD1* al ser tratadas con inhibidores de PARP1 se sensibilizan de manera aguda (Bryant et al., 2005). Además el grupo de Farmer encontró que en células madre embrionarias con defectos en *BRCA1* o *BRCA2* se sensibilizan de manera profunda a inhibidores de PARP1, lo que provoca inestabilidad cromosómica, arresto del ciclo celular y finalmente muerte celular por apoptosis (Farmer et al., 2005).

Kim y colaboradores describieron que en líneas celulares de fibroblastos provenientes de 7 pacientes de AF (FA-A, FA-L, FA-D2, FA-I, FA-J, FA-D1 y FA-P) así como una línea silvestre que al someterlos a inhibidores de PARP1 o camptotecina las líneas con mutaciones del *core* o en *FANCD2* o *FANCI* no presentaron sensibilidad a ninguno de los dos compuestos, mientras que aquellas con mutaciones río abajo fueron sensibles a ambos (Kim et al., 2013).

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos están de acuerdo con los de estos investigadores por lo que se apoya la idea de la hiperactivación de la aNHEJ como mecanismo de emergencia ante la pérdida de los mecanismos de recombinación homóloga.

VII.VIII. La inhibición de RAD51 disminuye su reclutamiento a los sitios de DSB

En los ensayos de inmunolocalización se observó drástica disminución del número de *foci* de RAD51 así como su colocalización con la γ H2AX tras inhibir a RAD51 lo que en primer lugar corrobora el correcto funcionamiento del inhibidor empleado y en segundo lugar es compatible con todos los experimentos anteriores realizados con el inhibidor B02, por lo que se sugiere que la pérdida de RAD51 compromete de manera importante la reparación de los DSB reseccionados dirigiendo su reparación a mecanismos menos robustos como aNHEJ o SSA que no son capaces de lidiar con gran cantidad de daño por lo que las células

se arrestan durante la fase S o G2 en busca de reparar dicho daño o en caso de no poder repararlo se dirige a muerte celular.

Estos resultados proponen que la aHR resulta de vital importancia en las células AF al ser el único mecanismo de recombinación homóloga al que las células tienen acceso y el probablemente el mecanismo más adecuado para reparar los DSB que la cNHEJ no puede.

VII.IX. La inhibición de RAD51 facilita la unión de KU80 en los sitios de DSB

Los ensayos de inmunolocalización mostraron que el número de *foci* de KU80 se incrementó con el inhibidor de RAD51 en ambas líneas celulares, este resultado es esperado en las células NL53 pues se sabe que en las células AF existe hiperactivación de la cNHEJ, estos datos sugieren que en las células NL53 cuando se inhibe a RAD51 y además se induce daño al DNA en forma de ICL con MMC incrementan la expresión de la cNHEJ siendo éste el principal mecanismo de reparación utilizado para hacer frente a este tipo de daño utilizando como vía de apoyo la aNHEJ y alguna vía de recombinación homóloga en menor medida.

Por otra parte, en la línea celular VU817 aumentó la cantidad de *foci* de KU80, los resultados de los ensayos de inmunolocalización sugieren que en las células VU817 a las cuales se les inhibe RAD51 y se someten a daño con MMC se mantiene la sobre activación de la cNHEJ y además hay aumento en el uso de la aNHEJ, esto último concuerda con el modelo de Scully y colaboradores, el cual propone que una vez que se llevó a cabo la resección del DSB, se desplazó a KU 70/80 pero se encuentra impedida la función de RAD51 el DSB puede optar por la SSA o la aNHEJ (Scully et al. 2019). Nuestros resultados sugieren que al menos una de estas vías podría activarse, no obstante en este trabajo no se evaluó a la SSA por lo cual no conocemos si la ausencia de los mecanismos de HR dependientes de RAD51 también hiperactiven éste mecanismo de reparación, sin embargo estas vías son mecanismos de respaldo u oportunistas por lo cual su sobre activación podría no compensar totalmente la ausencia de un mecanismo canónico como la cHR.

Además se observó que prácticamente todos los *foci* de KU80 colocalizaron con la H2AX, lo cual se debe a la alta afinidad de KU80 por los DSB así como al hecho de que es una de las proteínas más abundantes

en el núcleo, por lo que se recluta en los sitios de daño aún antes de la elección del mecanismo que se empleará para reparar un determinado DSB, sin embargo, cuando se elige la cNHEJ su localización resulta esencial (Scully et al. 2019).

VIII. CONCLUSIONES

- En células deficientes en la vía FA/BRCA los mecanismos de recombinación homóloga (cHR o aHR) son indispensables en la reparación de DSB para la supervivencia celular.
- En células deficientes en la vía FA/BRCA la aNHEJ no es indispensable durante la reparación de los DSB.
- En células deficientes en la vía FA/BRCA es probable que los mecanismos empleados para reparar los DSB sean la cNHEJ de manera principal y la aHR de manera secundaria.

IX. PERSPECTIVAS

Los hallazgos encontrados con el presente trabajo servirán como punto de partida para estudiar más a fondo los mecanismos responsables de reparar los DSB en las células AF. Resultaría de utilidad inhibir los mecanismos de reparación por medio de siRNA para corroborar los resultados obtenidos y encontrar nuevos datos que permitan determinar la relevancia de cada uno de los mecanismos evaluados además de explorar el impacto de otras vías de reparación capaces de reparar DSB o inclusive SSB.

X. LITERATURA CITADA.

- Adamo, Adele et al. 2010. "Preventing Nonhomologous End Joining Suppresses DNA Repair Defects of Fanconi Anemia." *Molecular Cell* 39(1):25–35. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.026>).
- Aguilar-Quesada, Rocío et al. 2007. "Interaction between ATM and PARP-1 in Response to DNA Damage and Sensitization of ATM Deficient Cells through PARP Inhibition." *BMC Molecular Biology* 8:1–8.
- Alagpulinsa, David A., Srinivas Ayyadevara, and Robert Joseph Shmookler Reis. 2014. "A Small-Molecule Inhibitor of RAD51 Reduces Homologous Recombination and Sensitizes Multiple Myeloma Cells to Doxorubicin." *Frontiers in Oncology* 4(October):1–11. Retrieved (<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00289/abstract>).
- Allen, Chris, James Halbrook, and Jac A. Nickoloff. 2003. "Interactive Competition Between Homologous Recombination and Non-Homologous End Joining." *Molecular Cancer Research* 1(October):913–20.
- Ameziane, Najim et al. 2015. "A Novel Fanconi Anaemia Subtype Associated with a Dominant-Negative Mutation in RAD51." *Nature Communications* 6(May):1–11. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9829>).
- Apostolou, Sinoula et al. 1996. "© 199 6 Nature Publishing Group [Http://Www.Nature.Com/NatureWhitmoregenetics](http://www.nature.com/naturewhitmoregenetics)." *Nat Genet.* 14(3):353–56.
- Auerbach, Arleen D. 2003. "Diagnosis of Fanconi Anemia by Diepoxybutane Analysis." P. 8.7.1-8.7.15 in *Current Protocols in Human Genetics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Retrieved June 6, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1002/0471142905.hg0807s37>).
- Bast, Robert C., Bryan Hennessy, and Gordon B. Mills. 2009. "The Biology of Ovarian Cancer: New Opportunities for Translation." *Nature Reviews Cancer* 9(6):415–28. Retrieved October 23, 2018 (<http://www.nature.com/articles/nrc2644>).
- Bennardo, Nicole, Anita Cheng, Nick Huang, and Jeremy M. Stark. 2008. "Alternative-NHEJ Is a

- Mechanistically Distinct Pathway of Mammalian Chromosome Break Repair." *PLoS Genetics* 4(6).
- Billardon, B. and E. Moustacchi. 1986. "Comparison of the Sensitivity of Fanconi's Anemia and Normal Fibroblasts to the Induction of Sister-Chromatid Exchanges by Photoaddition of Mono- and Bi-Functional Psoralens." *Mutation Research Letters* 174(3):241–46.
- Bluteau, Dominique et al. 2016. "Biallelic Inactivation of REV7 Is Associated with Fanconi Anemia." *Journal of Clinical Investigation* 126(9):3580–84.
- Bogliolo, Massimo et al. 2013. "Mutations in ERCC4, Encoding the DNA-Repair Endonuclease XPF, Cause Fanconi Anemia." *American Journal of Human Genetics* 92(5):800–806.
- Bogliolo, Massimo and Jordi Surrallés. 2015. "Fanconi Anemia: A Model Disease for Studies on Human Genetics and Advanced Therapeutics." *Current Opinion in Genetics & Development* 33:32–40. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959437X15000775>).
- Bradner, W. T. 2001. "Mitomycin C: A Clinical Update." *Cancer Treatment Reviews* 27(1):35–50.
- Bryant, Helen E. et al. 2005. "Specific Killing of BRCA2-Deficient Tumours with Inhibitors of Poly(ADP-Ribose) Polymerase." *Nature* 434(7035):913–17. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature03443>).
- Bunting, Samuel F. et al. 2010. "53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks." *Cell* 141(2):243–54.
- Bunting, Samuel F. et al. 2012. "BRCA1 Functions Independently of Homologous Recombination in DNA Interstrand Crosslink Repair." *Molecular Cell* 46(2):125–35.
- Burma, Sandeep, Benjamin P. Chen, Michael Murphy, Akihiro Kurimasa, and David J. Chen. 2001. "ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-Strand Breaks." *Journal of Biological Chemistry* 276(45):42462–67.
- Butturini, a et al. 1994. "Hematologic Abnormalities in Fanconi Anemia: An International Fanconi Anemia Registry Study." *Blood* 84(5):1650–55.

- Castella, Maria et al. 2015. "FANCI Regulates Recruitment of the FA Core Complex at Sites of DNA Damage Independently of FANCD2." *PLoS Genetics* 11(10):1–27.
- Caulfield, Jennifer L., John S. Wishnok, and Steven R. Tannenbaum. 2003. "Nitric Oxide-Induced Interstrand Cross-Links in DNA." *Chemical Research in Toxicology* 16(5):571–74. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1021/tx020117w>).
- Ceccaldi, Raphael et al. 2015. "Homologous-Recombination-Deficient Tumours Are Dependent on Pol θ - Mediated Repair." *Nature* 518(7538):258–62. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nature14184>).
- Ceccaldi, Raphael, Beatrice Rondinelli, and Alan D. D'Andrea. 2016. "Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break." *Trends in Cell Biology* 26(1):52–64. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>).
- Clauson, C., O. D. Scharer, and L. Niedernhofer. 2013. "Advances in Understanding the Complex Mechanisms of DNA Interstrand Cross-Link Repair." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5(10):a012732–a012732. Retrieved (<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a012732>).
- Cruet-Hennequart, Séverine, Macdara T. Glynn, Laura S. Murillo, Seamus Coyne, and Michael P. Carty. 2008. "Enhanced DNA-PK-Mediated RPA2 Hyperphosphorylation in DNA Polymerase δ -Deficient Human Cells Treated with Cisplatin and Oxaliplatin." *DNA Repair* 7(4):582–96.
- Cummings, J., V. J. Spanswick, M. Tomasz, and J. F. Smyth. 1998. "Enzymology of Mitomycin C Metabolic Activation in Tumour Tissue: Implications for Enzyme-Directed Bio-reductive Drug Development." *Biochemical Pharmacology* 56(4):405–14. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9763215>).
- Curtin, Nicola J. 2017. "PARP Inhibitors for Cancer Therapy." *Cell* 169(2):183.
- Davis, Anthony J. and David J. Chen. 2010. "A Role for ATM Kinase Activity and Mre11 in Microhomology-Mediated End-Joining." *Cell Cycle* 9(16):3147–48.

- Deans, Andrew J. and Stephen C. West. 2011. "DNA Interstrand Crosslink Repair and Cancer." *Nature Reviews Cancer* 11(7):467–80. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc3088>).
- Delacôte, Fabien, Mingguang Han, Thomas D. Stamato, Maria Jasin, and Bernard S. Lopez. 2002. "An Xrcc4 Defect or Wortmannin Stimulates Homologous Recombination Specifically Induced by Double-Strand Breaks in Mammalian Cells." *Nucleic Acids Research* 30(15):3454–63. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12140331><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC137076>).
- Deriano, Ludovic, Travis H. Stracker, Annalee Baker, John H. J. Petrini, and David B. Roth. 2009. "Roles for NBS1 in Alternative Nonhomologous End-Joining of V(D)J Recombination Intermediates." *Molecular Cell* 34(1):13–25. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.03.009>).
- Digweed, Martin et al. 2002. "Attenuation of the Formation of DNA-Repair Foci Containing RAD51 in Fanconi Anaemia." *Carcinogenesis* 23(7):1121–26.
- Dorsman, Josephine C. et al. 2007. "Identification of the Fanconi Anemia Complementation Group I Gene, FANCI." *Cellular Oncology : The Official Journal of the International Society for Cellular Oncology* 29(3):211–18.
- Dronkert, Mies L. ... and Roland Kanaar. 2001. *Repair of DNA Interstrand Cross-Links*. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921877701000921>).
- Essers, J. 2000. "Homologous and Non-Homologous Recombination Differentially Affect DNA Damage Repair in Mice." *The EMBO Journal* 19(7):1703–10. Retrieved (<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/19.7.1703>).
- Farmer, Hannah et al. 2005. "Targeting the DNA Repair Defect in BRCA Mutant Cells as a Therapeutic Strategy." *Nature* 434(7035):917–21. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature03445>).
- Feldmann, Elke, Viola Schmiemann, Wolfgang Goedecke, Susanne Reichenberger, and Petra Pfeiffer.

2000. "DNA Double-Strand Break Repair in Cell-Free Extracts from Ku80-Deficient Cells: Implications for Ku Serving as an Alignment Factor in Non-Homologous DNA End Joining." *Nucleic Acids Research* 28(13):2585–96.
- Fiesco Roa, Moisés Óscar. 2015. "EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR AL USO DEL INHIBIDOR DEL COMPLEJO MRN SOBRE CÉLULAS DE ANEMIA DE FANCONI." UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
- Ten Foe, Jerome R. L. et al. 1996. "Expression Cloning of a Cdna for the Major Fanconi Anaemia Gene, FAA." *Nature Genetics* 14(3):320–23.
- Garaycochea, Juan I. et al. 2012. "Genotoxic Consequences of Endogenous Aldehydes on Mouse Haematopoietic Stem Cell Function." *Nature* 489(7417):571–75. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature11368>).
- Gebhart, E., D. Kysela, H. Matthee, and M. Nikol. 1985. "Cytogenetic Analyses Utilizing Various Clastogens in Two Sibs with Fanconi Anemia, Their Relatives, and Control Individuals." *Hum Genet* 69(4):309–15. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3921453>).
- Giri, Neelam, Dalia L. Batista, Blanche P. Alter, and Constantine A. Stratakis. 2007. "Endocrine Abnormalities in Patients with Fanconi Anemia." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92(7):2624–31.
- Godthelp, Barbara C. et al. 2006. "Cellular Characterization of Cells from the Fanconi Anemia Complementation Group, FA-D1/BRCA2." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 601(1–2):191–201.
- Godthelp, Barbara C., Fré Artwert, Hans Joenje, and Małgorzata Z. Zdzienicka. 2002. "Impaired DNA Damage-Induced Nuclear Rad51 Foci Formation Uniquely Characterizes Fanconi Anemia Group D1." *Oncogene* 21(32):5002–5. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.onc.1205656>).
- Guervilly, Jean Hugues, Gaëtane Macé-Aimé, and Filippo Rosselli. 2008. "Loss of CHK1 Function Impedes

- DNA Damage-Induced FANCD2 Monoubiquitination but Normalizes the Abnormal G2 Arrest in Fanconi Anemia." *Human Molecular Genetics* 17(5):679–89.
- Guo, Caixia, Eiichiro Sonoda, et al. 2006. "REV1 Protein Interacts with PCNA: Significance of the REV1 BRCT Domain In Vitro and In Vivo." *Molecular Cell* 23(2):265–71.
- Guo, Caixia, Tie-Shan Tang, et al. 2006. "Ubiquitin-Binding Motifs in REV1 Protein Are Required for Its Role in the Tolerance of DNA Damage." *Molecular and Cellular Biology* 26(23):8892–8900.
- Retrieved
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1636806&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Hanlon Newell, A. E. et al. 2008. "Loss of Homologous Recombination or Non-Homologous End-Joining Leads to Radial Formation Following DNA Interstrand Crosslink Damage." *Cytogenetic and Genome Research* 121(3–4):174–80.
- Howlett, Niall G. et al. 2002. "Biallelic Inactivation of BRCA2 in Fanconi Anemia." *Science* 297(5581):606 LP-609. Retrieved (<http://science.sciencemag.org/content/297/5581/606.abstract>).
- Huang, Fei et al. 2011. "Identification of Specific Inhibitors of Human RAD51 Recombinase Using High-Throughput Screening." *ACS Chemical Biology* 6(6):628–35. Retrieved February 8, 2019 (<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/cb100428c>).
- Huang, Fei, Olga M. Mazina, Isaac J. Zentner, Simon Cocklin, and Alexander V. Mazin. 2012. "Inhibition of Homologous Recombination in Human Cells by Targeting RAD51 Recombinase." *Journal of Medicinal Chemistry* 55(7):3011–20.
- Imlay, James A. 2003. "Pathways of Oxidative Damage." *Annual Review of Microbiology* 57(1):395–418. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.57.030502.090938>).
- Ishiai, Masamichi et al. 2008. "FANCI Phosphorylation Functions as a Molecular Switch to Turn on the Fanconi Anemia Pathway." *Nature Structural & Molecular Biology* 15(11):1138–46. Retrieved

- (<http://www.nature.com/nsmb/journal/v15/n11/abs/nsmb.1504.html%5Cnpapers3://publication/doi/10.1038/nsmb.1504%5Cnhttp://www.nature.com/doi/10.1038/nsmb.1504>).
- Joenje, Hans et al. 1997. "Evidence for at Least Eight Fanconi Anemia Genes." *The American Journal of Human Genetics* 61(4):940–44. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707642049>).
- Kamal, Ahmed, Narasimha Rao Bolla, Pandala Sindayla Srikanth, and Ajay Kumar Srivastava. 2013. "Naphthalimide Derivatives with Therapeutic Characteristics: A Patent Review." *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 23(3):299–317. Retrieved (<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543776.2013.746313>).
- Kee, Younghoon and Alan D. D'Andrea. 2010. "Expanded Roles of the Fanconi Anemia Pathway in Preserving Genomic Stability." *Genes and Development* 24(16):1680–94.
- Kennedy, Katherine A., Alan C. Sartorelli, and Sara Rockwell. 1980. "Preferential Activation of Mitomycin c to Cytotoxic Metabolites by Hypoxic Tumor Cells." *Cancer Research* 40(7):2356–60.
- Kim, Hyungjin and Alan D'Andrea. 2012. "Pathway Regulation of DNA Cross-Link Repair by the Fanconi Anemia / BRCA Pathway." *Genes & Development* (1d):1393–1408.
- Kim, Tae Moon et al. 2015. "RECQL5 and BLM Exhibit Divergent Functions in Cells Defective for the Fanconi Anemia Pathway." *Nucleic Acids Research* 43(2):893–903.
- Kim, Yonghwan et al. 2011. "Mutations of the SLX4 Gene in Fanconi Anemia." *Nature Genetics* 43(2):142–46.
- Kim, Yonghwan et al. 2013. "Regulation of Multiple DNA Repair Pathways by the Fanconi Anemia Protein." *Blood Journal* 121(1):54–63.
- Knies, Kerstin et al. 2017. "Biallelic Mutations in the Ubiquitin Ligase RFW3 Cause Fanconi Anemia." *Journal of Clinical Investigation* 2:1–15.
- Kumar, Gopinatha Suresh, Roselyn Lipman, Jeffrey Cummings, and Maria Tomasz. 1997. "Mitomycin C-

- DNA Adducts Generated by DT-Diaphorase. Revised Mechanism of the Enzymatic Reductive Activation of Mitomycin C." *Biochemistry* 36(46):14128–36.
- Lans, Hannes, Jurgen A. Marteijn, and Wim Vermeulen. 2012. "ATP-Dependent Chromatin Remodeling in the DNA-Damage Response." *Epigenetics & Chromatin* 5(1):4. Retrieved (<http://epigeneticsandchromatin.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-8935-5-4>).
- Latt, S. A., G. Stetten, L. A. Juergens, G. R. Buchanan, and P. S. Gerald. 1975. "Induction by Alkylating Agents of Sister Chromatid Exchanges and Chromatid Breaks in Fanconi's Anemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(10):4066–70. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1060089><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC433139>).
- Van Der Lelij, Petra, Anneke B. Oostra, Martin A. Rooimans, Hans Joenje, and Johan P. De Winter. 2010. "Diagnostic Overlap between Fanconi Anemia and the Cohesinopathies: Roberts Syndrome and Warsaw Breakage Syndrome." *Anemia* 2010.
- Levitus, Marieke et al. 2005. "The DNA Helicase BRIP1 Is Defective in Fanconi Anemia Complementation Group J." *Nature Genetics* 37(9):934–35.
- Levran, Orna et al. 2005. "The BRCA1-Interacting Helicase BRIP1 Is Deficient in Fanconi Anemia." *Nature Genetics* 37(9):931–33.
- Li, Yang, Qing-ying Luo, Jian-jun Deng, and Zun-zhen Zhang. 2015. "[4-Amino-1,8-Naphthalimide on the Sensitive Effect of Arsenic Trioxide in Hepatocellular Carcinoma Cells]." *Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Sichuan University. Medical Science Edition* 46(2):163–68. Retrieved January 23, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25924422>).
- Litman, Rachel et al. 2005. "BACH1 Is Critical for Homologous Recombination and Appears to Be the Fanconi Anemia Gene Product FANCI." *Cancer Cell* 8(3):255–65.
- Lobitz, Stephan and Eunike Velleuer. 2006. "Guido Fanconi (1892–1979): A Jack of All Trades." *Nature*

- Reviews Cancer* 6(11):893–98. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2009>).
- Loeb, Lawrence A. 1991. “Mutator Phenotype May Be Required for Multistage Carcinogenesis.” *Cancer Research* 51(12):3075–79.
- Lopez-Martinez, David, Chih-Chao Liang, and Martin A. Cohn. 2016. “Cellular Response to DNA Interstrand Crosslinks: The Fanconi Anemia Pathway.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(16):3097–3114. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s00018-016-2218-x>).
- Luo, Qingying, Yang Li, Yanhao Lai, and Zunzhen Zhang. 2015. “The Role of NF- κ B in PARP-Inhibitor-Mediated Sensitization and Detoxification of Arsenic Trioxide in Hepatocellular Carcinoma Cells.” *The Journal of Toxicological Sciences* 40(3):349–63. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25972196>).
- Ma, Wenjian, Christopher J. Halweg, Daniel Menendez, and Michael a Resnick. 2012. “Differential Effects of Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibition on DNA Break Repair in Human Cells Are Revealed with Epstein – Barr Virus.” *PNAS* 109(17):6590–95.
- Malinge, Jean Marc, Marie Josèphe Giraud-Panis, and Marc Leng. 1999. “Interstrand Cross-Links of Cisplatin Induce Striking Distortions in DNA.” *Journal of Inorganic Biochemistry* 77(1–2):23–29.
- Marteijn, Jurgen A., Hannes Lans, Wim Vermeulen, and Jan H. J. Hoeijmakers. 2014. “Understanding Nucleotide Excision Repair and Its Roles in Cancer and Ageing.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(7):465–81. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm3822>).
- McVey, Mitch and Sang Eun Lee. 2008. “MMEJ Repair of Double-Strand Breaks (Director’s Cut): Deleted Sequences and Alternative Endings.” *Trends in Genetics* 24(11):529–38.
- Meek, Katheryn. 2009. “New Targets to Translate DNA-PK Signals.” *Cell Cycle* 8(23):3809.
- Meetei, Amom Ruhikanta et al. 2003. “A Novel Ubiquitin Ligase Is Deficient in Fanconi Anemia.” *Nature Genetics* 35(2):165–70.
- Meetei, Amom Ruhikanta et al. 2004. “X-Linked Inheritance of Fanconi Anemia Complementation Group

- B." *Nature Genetics* 36(11):1219–24.
- Meetei, Amom Ruhikanta et al. 2005. "A Human Ortholog of Archaeal DNA Repair Protein Hef Is Defective in Fanconi Anemia Complementation Group M." *Nature Genetics* 37(9):958–63.
- Mehta, Anuja and James E. Haber. 2014. "Sources of DNA Double-Strand Breaks and Models of Rec." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6:1–19.
- Milligan, Jamie R. et al. 1995. "DNA Repair by Thiols in Air Shows Two Radicals Make a Double-Strand Break." *Radiation Research* 143(3):273. Retrieved June 6, 2017 (<http://www.jstor.org/stable/3579213?origin=crossref>).
- Miura, Kunihiko, Kanehisa Morimoto, and Akira Koizumi. 1983. "Proliferative Kinetics and Mitomycin C-Induced Chromosome Damage in Fanconi's Anemia Lymphocytes." *Human Genetics* 63(1):19–23.
- Mladenov, Emil and George Iliakis. 2011. "Induction and Repair of DNA Double Strand Breaks: The Increasing Spectrum of Non-Homologous End Joining Pathways." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711(1–2):61–72. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.02.005>).
- Mladenov, Emil, Simon Magin, Aashish Soni, and George Iliakis. 2013. "DNA Double-Strand Break Repair as Determinant of Cellular Radiosensitivity to Killing and Target in Radiation Therapy." *Frontiers in Oncology* 3(May):1–18. Retrieved (<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2013.00113/abstract>).
- Mozdarani, Hossein. 2016. "Breast Cancer and Paradigm of Genomic Instability." 3(4):102–5.
- Negrini, Simona, Vassilis G. Gorgoulis, and Thanos D. Halazonetis. 2010. "Genomic Instability--an Evolving Hallmark of Cancer." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11(3):220–28. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20177397>).
- Niedernhofer, Laura J., Astrid S. Lalai, and J. H. J. Hoeijmakers. 2005. "Fanconi Anemia (Cross)Linked to DNA Repair." *Cell* 123(7):1191–98.

- Noël, Georges, Camille Godon, Marie Fernet, and Nicole Giocanti. 2006. "Radiosensitization by the Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor 4-Amino-1 , 8-Naphthalimide Is Specific of the S Phase of the Cell Cycle and Involves Arrest of DNA Synthesis." 564–75.
- Norman, D. et al. 1990. "NMR and Computational Characterization of Mitomycin Cross-Linked to Adjacent Deoxyguanosines in the Minor Groove of the d(T-A-C-G-T-A).d(T-A-C-G-T-A) Duplex." *Biochemistry* 29(11):2861–75. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=2346750).
- Nowell, PC. 1976. "The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations." *Science* 194(4260). Retrieved June 6, 2017 (<http://science.sciencemag.org/content/194/4260/23/tab-pdf>).
- Oostra, Anneke B., Aggie W. M. Nieuwint, Hans Joenje, and Johan P. De Winter. 2012. "Diagnosis of Fanconi Anemia: Chromosomal Breakage Analysis." *Anemia* 2012.
- Otsuki, Makoto et al. 2007. "WRN Counteracts the NHEJ Pathway upon Camptothecin Exposure." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355(2):477–82.
- Pace, Paul; et al. 2010. "Ku70 Corrupts DNA Repair in the Absence of the Fanconi Anemia Pathway." *Science* 329(July):219–23.
- Pang, Qishen and Paul R. Andreassen. 2009. "Fanconi Anemia Proteins and Endogenous Stresses." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 668(1–2):42–53.
- Park, Jung-Young et al. 2016. "Complementation of Hypersensitivity to DNA Interstrand Crosslinking Agents Demonstrates That XRCC2 Is a Fanconi Anaemia Gene." *Journal of Medical Genetics* 53(10):672–80. Retrieved (<http://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmedgenet-2016-103847>).
- Pierce, A. J., P. Hu, M. Han, N. Ellis, and M. Jasin. 2001. "Ku DNA End-Binding Protein Modulates Homologous Repair of Double-Strand Breaks in Mammalian Cells." *Genes and Development* 15(24):3237–42.

- Porfirio, B., B. Dallapiccola, V. Mokini, Giuliana Alimena, and E. Gandini. 1983. "Failure of Diepoxybutane to Enhance Sister Chromatid Exchange Levels in Fanconi's Anemia Patients and Heterozygotes." *Human Genetics* 63(2):117–20.
- Prado, Félix and Andrés Aguilera. 2005. "Impairment of Replication Fork Progression Mediates RNA PolII Transcription-Associated Recombination." *The EMBO Journal* 24(6):1267–76. Retrieved (<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7600602>).
- Rahal, Elias A. et al. 2010. "ATM Regulates Mre11-Dependent DNA End-Degradation and Microhomology-Mediated End Joining." *Cell Cycle* 9(14):2866–77.
- Rass, Emilie et al. 2009. "Role of Mre11 in Chromosomal Nonhomologous End Joining in Mammalian Cells." *Nature Structural and Molecular Biology* 16(8):819–24. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1641>).
- Reid, Sarah et al. 2007. "Biallelic Mutations in PALB2 Cause Fanconi Anemia Subtype FA-N and Predispose to Childhood Cancer." *Nature Genetics* 39(2):162–64.
- Rink, Stacia M. and Paul B. Hopkins. 1995. "A Mechlorethamine-Induced DNA Interstrand Cross-Link Bends Duplex DNA." *Biochemistry* 34(4):1439–45. Retrieved (<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00004a039>).
- Rodríguez, Alfredo et al. 2012. "A Boolean Network Model of the FA/BRCA Pathway." *Bioinformatics* 28(6):858–66.
- Rodríguez, Alfredo et al. 2015. "Fanconi Anemia Cells with Unrepaired DNA Damage Activate Components of the Checkpoint Recovery Process." *Theoretical Biology and Medical Modelling* 12(1):1–22. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1186/s12976-015-0011-4>).
- Rodríguez, Alfredo and Alan D'Andrea. 2017. "Fanconi Anemia Pathway." *Current Biology* 27(18):R986–88.
- Rodríguez Soto, Rebeca. 2015. "Inhibición de La Cinasa DNA-PKCs En Una Línea Celular AF-A: Evaluación

Citogenética.” Universidad Nacional Autónoma de México.

- Roos, Wynand P. and Bernd Kaina. 2013. “DNA Damage-Induced Cell Death: From Specific DNA Lesions to the DNA Damage Response and Apoptosis.” *Cancer Letters* 332(2):237–48. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.007>).
- Rosenberg, Philip S., Hannah Tamary, and Blanche P. Alter. 2011. “How High Are Carrier Frequencies of Rare Recessive Syndromes? Contemporary Estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel.” *American Journal of Medical Genetics, Part A* 155(8):1877–83.
- Rosidi, Bustanur et al. 2018. “Histone H1 Functions as a Stimulatory Factor in Backup Pathways of NHEJ.” *36(5):1610–23*.
- Sallmyr, Annahita, Alan E. Tomkinson, and Feyruz V Rassool. 2018. “Up-Regulation of WRN and DNA Ligase III in Chronic Myeloid Leukemia : Consequences for the Repair of DNA Double-Strand Breaks.” *112(4):1413–24*.
- San Filippo, Joseph, Patrick Sung, and Hannah Klein. 2008. “Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination.” *Annual Review of Biochemistry* 77(1):229–57. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.77.061306.125255>).
- Sawyer, Sarah L. et al. 2015. “Biallelic Mutations in BRCA1 Cause a New Fanconi Anemia Subtype.” *Cancer Discovery* 5(2):135–42.
- Schwartz, Robert S. and Alan D. D’Andrea. 2010. “Susceptibility Pathways in Fanconi’s Anemia and Breast Cancer.” *New England Journal of Medicine* 362(20):1909–19. Retrieved (<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra0809889>).
- Schwertman, P., S. Bekker-Jensen, and N. Mailand. 2016. “Regulation of DNA Double-Strand Break Repair by Ubiquitin and Ubiquitin-like Modifiers.” *Nat Rev Mol Cell Biol* 17(6):379–94. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27211488>).
- Scully, Ralph, Arvind Panday, Rajula Elango, and Nicholas A. Willis. 2019. “DNA Double-Strand Break

- Repair-Pathway Choice in Somatic Mammalian Cells." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Retrieved (<http://www.nature.com/articles/s41580-019-0152-0>).
- Sevilla-Montoya, Rosalba et al. 2017. "Heterogeneous Diagnoses Underlying Radial Ray Anomalies." *Indian Journal of Pediatrics* 84(3):200–205.
- Sims, Ashley E. et al. 2007. "FANCI Is a Second Monoubiquitinated Member of the Fanconi Anemia Pathway." *Nature Structural and Molecular Biology* 14(6):564–67.
- Smogorzewska, Agata et al. 2007. "Identification of the Fanconi Anemia (FANC) I Protein, a Monoubiquitinated FANCD2 Paralog Required for Crosslink Repair." *Cell* 129(2):289–301.
- Soubeyrand, Sébastien et al. 2006. "Artemis Phosphorylated by DNA-Dependent Protein Kinase Associates Preferentially with Discrete Regions of Chromatin." *Journal of Molecular Biology* 358(5):1200–1211.
- Soulas-Sprauel, P. et al. 2007. "V(D)J and Immunoglobulin Class Switch Recombinations: A Paradigm to Study the Regulation of DNA End-Joining." *Oncogene* 26(56):7780–91. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.onc.1210875>).
- Stecklein, Shane R. and Roy A. Jensen. 2012. "Identifying and Exploiting Defects in the Fanconi Anemia/BRCA Pathway in Oncology." *Translational Research* 160(3):178–97. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2012.01.022>).
- Stoepker, Chantal et al. 2011. "SLX4, a Coordinator of Structure-Specific Endonucleases, Is Mutated in a New Fanconi Anemia Subtype." *Nature Genetics* 43(2):138–41.
- Strathdee, Craig A., Alessandra M. V. Duncan, and Manuel Buchwald. 1992. "Evidence for at Least Four Fanconi Anaemia Genes Including FACC on Chromosome 9." *Nature Genetics* 1:196–98.
- Takata, Minoru et al. 1998. "Homologous Recombination and Non-Homologous End-Joining Pathways of DNA Double-Strand Break Repair Have Overlapping Roles in the Maintenance of Chromosomal Integrity in Vertebrate Cells." *EMBO Journal* 17(18):5497–5508.

- Thompson, Larry H. 2012. "Recognition, Signaling, and Repair of DNA Double-Strand Breaks Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: The Molecular Choreography." *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 751(2):158–246. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.06.002>).
- Thompson, Larry H. and John M. Hinz. 2009. "Cellular and Molecular Consequences of Defective Fanconi Anemia Proteins in Replication-Coupled DNA Repair: Mechanistic Insights." *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 668(1–2):54–72.
- Thongthip, Supawat, Brooke A. Conti, Francis P. Lanch, and Agata Smogorzewska. 2017. "Suppression of Non-Homologous End Joining Does Not Rescue DNA Repair Defects in Fanconi Anemia Patient Cells." *Biorxiv* 1–14.
- Timmers, Cynthia et al. 2001. "Positional Cloning of a Novel Fanconi Anemia Gene, FANCD2." *Molecular Cell* 7(2):241–48.
- Tomasz, Maria. 1995. "Mitomycin C: Small, Fast and Deadly (but Very Selective)." *Chemistry and Biology* 2(9):575–79.
- Truong, L. N. et al. 2013. "Microhomology-Mediated End Joining and Homologous Recombination Share the Initial End Resection Step to Repair DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(19):7720–25. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1213431110>).
- Unno, Junya et al. 2014. "FANCD2 Binds CtIP and Regulates DNA-End Resection during DNA Interstrand Crosslink Repair." *Cell Reports* 7(4):1039–47. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.005>).
- Vaz, Fiona et al. 2010. "Mutation of the RAD51C Gene in a Fanconi Anemia-like Disorder." *Nature Genetics* 42(5):406–9.
- Vermeij, Wilbert P., Jan H. J. Hoeijmakers, and Joris Pothof. 2016. "Genome Integrity in Aging: Human Syndromes, Mouse Models, and Therapeutic Options." *Annual Review of Pharmacology and*

- Toxicology* 56(1):427–45. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124316>).
- Vijg, Jan and Yousin Suh. 2013. “Genome Instability and Aging.” *Annual Review of Physiology* 75(1):645–68. Retrieved (<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-030212-183715>).
- Vilenchik, M. M. and A. G. Knudson. 2003. “Endogenous DNA Double-Strand Breaks: Production, Fidelity of Repair, and Induction of Cancer.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(22):12871–76. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2135498100>).
- Vinayak, Shaveta and James M. Ford. 2012. “PARP Inhibitors for the Treatment and Prevention of Breast Cancer.” *Curr Breast Cancer Rep* 2(4):190–97.
- Virts, Elizabeth L. et al. 2015. “AluY-Mediated Germline Deletion, Duplication and Somatic Stem Cell Reversion in UBE2T Defines a New Subtype of Fanconi Anemia.” *Human Molecular Genetics* 24(18):5093–5108.
- Vodenicharov, M.D., Sallmann, F.R., Satoh, M.S. and Poirier, G. G. 2000. “Base Excision Repair Is Efficient in Cells Lacking Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1.” *Nucleic Acids Res.* 28:3887–3896.
- Wajnrajch, Michael P. et al. 2001. “Evaluation of Growth and Hormonal Status in Patients Referred to the International Fanconi Anemia Registry.” *Pediatrics* 107(4). Retrieved June 30, 2017 (http://pediatrics.aappublications.org/content/107/4/744?sso=1&sso_redirect_count=1&nfstatus=401&nftoken=00000000-0000-0000-0000-000000000000&nfstatusdescription=ERROR%3A+No+local+token).
- Wang, Anderson T. et al. 2015. “A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination.” *Molecular Cell* 59(3):478–90. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.009>).
- Wang, H., Z. C. Zeng, T. A. Bui, et al. 2001. “Efficient Rejoining of Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks in Vertebrate Cells Deficient in Genes of the RAD52 Epistasis Group.” *Oncogene*

- 20(18):2212–24. Retrieved
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11402316<http://www.nature.com/onc/journal/v20/n18/pdf/1204350a.pdf>).
- Wang, H., Z. C. Zeng, a R. Perrault, et al. 2001. “Genetic Evidence for the Involvement of DNA Ligase IV in the DNA-PK-Dependent Pathway of Non-Homologous End Joining in Mammalian Cells.” *Nucleic Acids Research* 29(8):1653–60.
- Ward, J. F. 1994. “The Complexity of DNA Damage: Relevance to Biological Consequences.” *International Journal of Radiation Biology* 66(5):427–32. Retrieved June 6, 2017
(<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09553009414551401>).
- Warren, Amy J., Alexander E. Maccubbin, and Joshua W. Hamilton. 1998. “Detection of Mitomycin C-DNA Adducts in Vivo by 32P-Postlabeling: Time Course for Formation and Removal of Adducts and Biochemical Modulation.” *Cancer Research* 58(3):453–61.
- Wen, Ying et al. 2011. “Diepoxybutane Induces the Formation of DNA-DNA Rather than DNA-Protein Cross-Links, and Single-Strand Breaks and Alkali-Labile Sites in Human Hepatocyte L02 Cells.” *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 716(1–2):84–91.
Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.08.007>).
- de Winter, Johan P. et al. 2000. “The Fanconi Anemia Gene FANCF Encodes a Novel Protein with Homology to ROM.” *Nature Genetics* 24(january):15–16.
- de Winter, Johan P. et al. 2000. “Isolation of a CDNA Representing the Fanconi Anemia Complementation Group E Gene.” *American Journal of Human Genetics* 67(5):1306–8.
- Wu, Zhan-He. 2016. “Phenotypes and Genotypes of the Chromosomal Instability Syndromes.” *Translational Pediatrics* 5(2):79–83. Retrieved
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186524><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4855194>).

- Xie, Anyong, Amy Kwok, and Ralph Scully. 2009. "Role of Mammalian Mre11 in Classical and Alternative Nonhomologous End Joining." *Nature Structural and Molecular Biology* 16(8):814–18. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1640>).
- Yu, Hsu-Sheng et al. 2012. "The Effect of Ethanol on the Formation of N^2 -Ethylidene-DG Adducts in Mice: Implications for Alcohol-Related Carcinogenicity of the Oral Cavity and Esophagus." *Biomarkers* 17(3):269–74. Retrieved June 6, 2017 (<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1354750X.2012.666675>).
- Yu, Rui et al. 2015. "Formation, Accumulation, and Hydrolysis of Endogenous and Exogenous Formaldehyde-Induced DNA Damage." *Toxicological Sciences* 146(1):170–82.
- Yu, Yaping et al. 2008. "DNA-PK and ATM Phosphorylation Sites in XLF/Cernunnos Are Not Required for Repair of DNA Double Strand Breaks." *DNA Repair* 7(10):1680–92.
- Yukawa, Y. et al. 2014. "Impairment of Aldehyde Dehydrogenase 2 Increases Accumulation of Acetaldehyde-Derived DNA Damage in the Esophagus after Ethanol Ingestion." *Am J Cancer Res* 4(3):279–84. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24959382>).
- Zhou, Bin-bing S. and Stephen J. Elledge. 2000. "Checkpoints in Perspective." *Nature* 408(November):433–39.
- Zwet, Maria Kraakman-van Der et al. 2002. "Brca2 (XRCC11) Deficiency Results in Radioresistant DNA Synthesis and a Higher Frequency of Spontaneous Deletions Brca2 (XRCC11) Deficiency Results in Radioresistant DNA Synthesis and a Higher Frequency of Spontaneous Deletions." *Molecular and Cellular Biology* 2(2):669–79.