



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Decisión entre supervivencia y apoptosis
en la Anemia de Fanconi: Una
aproximación por biología de sistemas.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

PABLO SILICEO PORTUGAL



DIRECTOR DE TESIS:
**DR. ALFREDO DE JESÚS RODRÍGUEZ
GÓMEZ**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mi hermana Marina, por permitirme compartir una vida contigo y enseñarme a ser una mejor persona.

A mi abuela Ángela, por enseñarme el indiscutible valor del conocimiento y la dedicación.

Y a mi madre Verónica, por absolutamente todo. Sin ti nada de esto habría sido posible.

Agradecimientos académicos

A mi tutor, pero sobre todo mi amigo, el Dr. Alfredo Rodríguez Gómez, por realizar este proyecto conmigo y ser una fuente inagotable de inspiración, enseñanza y apoyo. Por confiar en mi potencial, permitirme hacer ciencia y disfrutar de ello.

A la Dra. Sara Frías Vázquez, por ser un inmenso ejemplo a seguir, por cultivar mi pasión por la ciencia y darme la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación.

Al resto de mis sinodales, el Dr. Eugenio Azpeitia Espinosa, la Dra. Leda Carolina Torres Maldonado y la Dra. Elisa Domínguez Hüttinger, por su contribución e involucramiento en la mejora de este trabajo.

A la Dra. Anniina Färkkilä, la Dra. Julia Casado, Ada Junquera, Angela Szabo y Fernando Pérez en la Universidad de Helsinki. Por recibirme en su laboratorio, apoyarme con la realización de la t-CyCIF y enseñarme todo lo relacionado con el análisis de imagen.

Al Dr. Hugo Tovar y la Dra. Laura Gómez en el INMEGEN, por ayudarme con el análisis de correlación génica de los datos de secuenciación de ARN.

A mis alumnas Punya Gupta y Paulina Bermejo, por haber aprendido junto a mí y convertirse en una parte crucial en el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Ulises Ehátl Juárez Figueroa, por la disposición y apoyo con todo lo relacionado con el análisis bioinformático.

A mi familia del laboratorio, Blanca, Ceci, Luis Ángel, Mariana, Miguel, Rocío y Paula, por su fundamental retroalimentación y constante apoyo. Por crear un increíble ambiente en el cual trabajar y darme el honor de trabajar a su lado.

A la M. en C. Bertha Molina, por ser una increíble profesora y preocuparse por mi desarrollo académico y personal.

Al la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme tantas oportunidades de crecimiento personal, académico y profesional.

Y finalmente, a los proyectos PAPIIT IN205120 “Búsqueda de alteraciones genómicas y epigenéticas relacionadas con envejecimiento celular en pacientes con anemia de Fanconi”, PAPIIT IA205022 “Destino celular en síndromes hereditarios de falla medular: búsqueda de mecanismos compartidos” y CONACYT 319344 “Delineamiento de perfiles pre-leucémicos en síndromes de falla medular utilizando inteligencia artificial” por brindar apoyo para la realización de este trabajo.

Agradecimientos personales

A mi padre Óscar, por tu amor incondicional, motivarme en todo momento, nunca dudar de mí y alentarme a cumplir mis metas.

A Mike y Ever, por ser y dejarme ser, por su invaluable amistad y todo lo que me ha dado.

A Roberto y Omar, por formar parte del inicio de todo y recordarme como valió la pena.

A Ismael, Alina, Bernadett, Laëtitia y Pierre, por hacerme sentir en casa cuando estaba lejos de ella.

Y a Berman, Abel y Valeria, por haber estado siempre presentes.

Índice

1. LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
2. RESUMEN.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	10
3.1. La respuesta al daño en el ADN	10
3.2. Checkpoint y Checkpoint recovery	10
3.3. Reparación de rupturas de doble hebra y de enlaces covalentes cruzados en el ADN	13
3.4. La anemia de Fanconi	17
3.5. El fenotipo AF: Entre la atrofia tisular y la carcinogénesis.....	20
3.6. La dicotomía p53 vs cMyc	22
3.7. Técnicas de resolución unicelular	25
3.8. Biología de sistemas	29
4. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	33
4.1. La toma de decisiones en los tejidos AF: cMyc vs p53.....	33
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
6. JUSTIFICACIÓN	35
7. HIPÓTESIS	36
8. OBJETIVOS	36
8.1. Objetivo general.....	36
8.2. Objetivos particulares.....	36
9. METODOLOGÍA	37
9.1. Métodos experimentales	37
9.1.1. CyTOF en líneas celulares <i>FANCG</i> ^{-/-} tratadas con MMC	37
9.1.2. t-CyCIF en muestras de tumores de células escamosas de pacientes con AF.....	37
9.2. Métodos bioinformáticos.....	39
9.2.1. Preprocesamiento de los datos obtenidos de la CyTOF	39
9.2.2. Preprocesamiento de las imágenes obtenidas con t-CyCIF.....	39
9.2.3. Procesamiento y control de calidad de los datos e imágenes obtenidos con t-CyCIF	41
9.2.4. Identificación de tipos celulares en imágenes obtenidas con t-CyCIF.....	41
9.3. Modelo matemático	43
9.3.1. Reconstrucción de la red regulatoria detrás de la toma de decisión del destino celular frente a daño en el ADN a través de una revisión bibliográfica	43
9.3.2. Inferencia e integración de reguladores adicionales a través de datos de secuenciación unicelular de ARN	46
9.3.3. Construcción de la red regulatoria y sus funciones lógicas	47
9.3.4. Análisis del modelo.....	49
9.4. Análisis estadísticos.....	50

10. RESULTADOS	50
10.1. La decisión entre la expresión de cMyc o p53 en células AF en respuesta al daño ocurre a través del tiempo	50
10.2. Los perfiles de expresión proteica y composición celular de las muestras están estrechamente relacionados con el paciente y el tipo celular	52
10.3. Modelo Matemático	55
10.3.1. El modelo booleano es capaz de recapitular los procesos celulares que ocurren en una célula normal y de un paciente con AF al enfrentarse a un ICL.....	55
10.3.2. La activación constante de los nodos Mdm2 y TNF- α permiten que la red AF tenga un atractor de proliferación con daño.	60
10.3.3. La activación no canónica de Wip1 a través de la señalización exclusiva de TNF- α es necesaria para la supervivencia de la célula	64
11. DISCUSIÓN	68
12. CONCLUSIONES	74
13. PERSPECTIVAS.....	74
14. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA.....	75
15. REFERENCIAS.....	85

1. LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AA	Anemia aplásica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Anemia de Fanconi
ASHLAR	Alineamiento por armonización simultánea de registros de capas o adyacencias
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
CHEKREC	<i>Checkpoint recovery</i>
CytoF	Citometría de flujo por tiempo de vuelo
DDR	Respuesta al daño en el ADN
DEB	Diepoxibutano
DSB	Ruptura de doble hebra
FISH	Hibridación fluorescente in situ
FFPE	Fijada en formalina y embebida en parafina
GUI	Interfaz de usuario gráfica
HNSCC	Carcinoma de células escamosas en cabeza y cuello
HR	Recombinación homóloga
HSPC	Célula troncal y progenitora hematopoyética
H&E	Hematoxilina y eosina
ICL	Enlace covalente cruzado
LMA	Leucemia mieloide aguda
MDS	Síndrome mielodisplásico
MMC	Mitomicina C
MMEJ	Unión de extremos mediada por microhomologías
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
PR	Proficiente en la reparación
RE	Elemento responsivo
ROI	Región de interés
ROS	Especie reactiva de oxígeno
ssADN	ADN de cadena sencilla
t-CyCIF	Inmunofluorescencia cíclica múltiple en tejidos
UMAP	Proyección y aproximación de variedad uniforme para reducción de dimensiones

2. RESUMEN

La Anemia de Fanconi (AF) es el síndrome de falla medular hereditaria más común. Se caracteriza por presentar malformaciones congénitas, predisposición a falla medular, a leucemia mieloide aguda y a carcinomas de células escamosas. La AF se presenta en pacientes que heredaron variantes patogénicas bialélicas en cualquiera de los genes cuyos productos proteicos participan en la reparación de enlaces covalentes cruzados (ICL) en el ADN; por lo tanto, las células de los pacientes con AF son deficientes en la reparación del ADN y acumulan daño no reparado o reparado de manera inapropiada.

En respuesta al daño, las células de los pacientes con AF sobreexpresan al gen supresor de tumores *TP53*, el cual es un promotor de la apoptosis y por lo tanto responsable de su propensión a la falla medular. Nuestro grupo de trabajo demostró recientemente que en la médula ósea de los pacientes con AF, donde habitan las células troncales hematopoyéticas, existe secreción elevada de las citocinas proinflamatorias $TNF-\alpha$ y $TGF\beta$, así como una sobreexpresión del oncogén *MYC* (Rodríguez *et al.*, 2021); uno de los oncogenes más potentes y que estimula la proliferación celular (van Riggelen *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha comprobado que el factor de transcripción NF-kappa B, señalizador de $TNF-\alpha$, es capaz de activar a la fosfatasa Wip1 (Shen *et al.*, 2017), la cual es responsable de promover el ciclo celular inactivando la respuesta al daño en el ADN y el arresto del ciclo celular, por lo que se ha considerado como una proteína involucrada en la adaptación de las células AF al daño en el ADN (Rodríguez *et al.*, 2019).

Incluso durante el desarrollo embrionario, los ratones con AF sobreexpresan ambos genes (Rodríguez *et al.*, 2022); sin embargo, recientemente también se demostró la selección positiva de clonas malignas con deleciones de *TP53* y amplificaciones de *MYC* en los carcinomas de células escamosas de pacientes con AF (Webster *et al.*, 2023), lo cual es indicativo de que la dicotomía de estados celulares liderada por ambos factores transcripcionales es crítica en la historia natural de la AF.

¿Qué hace que una célula AF decida entre un perfil de expresión alto en p53, llevando a apoptosis y con ello a falla medular, o un perfil de expresión alto en cMyc, impulsando a las células a proliferar a expensas del daño y a acumular clonas pre-carcinogénicas? Para contestar estas preguntas se planteó estudiar los patrones de activación de p53 y cMyc en células AF utilizando datos de tecnologías de proteómica con resolución unicelular.

Se utilizaron los datos de dos tecnologías en particular para estudiar la activación de cMyc y p53 en células AF: 1) Citometría por Tiempo de Vuelo (CyTOF) en líneas celulares AF tratadas con mitomicina C, y 2) inmunofluorescencia cíclica múltiple (t-CyCIF) en muestras de carcinomas de células escamosas de pacientes con AF. Los datos de ambas metodologías se analizaron utilizando los programas Cyto, Napari, Stardist y pipelines de Python. Además,

se construyó un modelo matemático de tipo Booleano integrando los reguladores conocidos de cMyc y p53, así como nuevos reguladores, inferidos a través de datos de secuenciación unicelular de ARN.

A nivel de población celular, tanto cMyc como p53 mostraron una activación en respuesta al daño en las células AF. Algunas células co-expresaron ambas proteínas, lo cual sugeriría un punto en donde la regulación funcional de ambas proteínas entra en conflicto hasta que exista una toma de decisión entre uno de los dos destinos celulares posibles. De manera interesante, en los tumores de pacientes AF se redujo el número de células doble-positivas a expensas de un aumento en las células positivas para cMyc conforme avanza la progresión del cáncer. Finalmente, a través del modelo matemático, se lograron recapitular los fenotipos celulares previamente descritos, resaltando reguladores clave durante la toma de decisión entre supervivencia o apoptosis; entre ellos Wip1 y TNF- α .

Concluimos que cMyc y p53 son proteínas con actividades opuestas, la sobreexpresión de cMyc en la AF sería posible a través de la activación de Wip1 en contextos inflamatorios con señalización exclusiva de TNF- α , correlacionando con la supervivencia celular a expensas de la acumulación de daño genómico, así como con la presencia de células cancerosas.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. La respuesta al daño en el ADN

Constantemente las células están sometidas a múltiples tipos de lesiones. Éstas son producidas por una plétora de causas diferentes, desde errores en la duplicación del ADN, hasta agentes clastogénicos de origen exógeno que interrumpen o modifican la continuidad de la doble hélice. Afortunadamente, nuestras células cuentan con un amplio reservorio de mecanismos de reconocimiento y reparación de daño, asegurando la integridad genómica antes de la siguiente división celular.

Dentro de los mecanismos existentes, como primera línea de control, la célula debe reconocer la presencia de cualquier tipo de daño y detener su propia división hasta que éste sea atendido. La presencia de estructuras aberrantes en el ADN, principalmente causadas por daño, son suficientes para que proteínas específicas dentro de la respuesta al daño al ADN (DDR, por sus siglas en inglés) reconozcan el daño e inicien la señalización para repararlo a través de transductores de señales (Jackson y Bartek, 2009). Dentro de las primeras proteínas encargadas de transducir la señal del daño, se encuentran las cinasas ATM, ATR y DNA-PKcs. Sin embargo, son ATM/ATR las cuales abarcan la mayor cantidad de sustratos, ATM para rupturas de doble hebra y ATR para rupturas de cadena sencilla (Medema y Macurek, 2011), mientras que DNA-PKcs está mayormente restringida a sustratos involucrados en la unión de extremos no homólogos, mecanismo del cual hablaré más adelante.

Una vez reclutadas al sitio del sitio de daño, ATM/ATR se encargarán de fosforilar sustratos proteicos que desencadenan procesos como la DDR, arresto del ciclo celular y apoptosis (**Figura 1A**) (Maréchal y Zhou, 2013).

3.2. Checkpoint y Checkpoint recovery

El avance del ciclo celular eucariota está mediado en su mayoría por proteínas con expresión generalmente constante llamadas cinasas dependientes de ciclina (Cdk, por sus siglas en inglés), las cuales, al interactuar con proteínas llamadas ciclinas, cuya expresión está restringida a etapas concretas del ciclo celular, son capaces de fosforilar sustratos que desencadenan los acontecimientos del ciclo celular (Alberts, 2002). Como ya se mencionó antes, es fundamental que la detección y reparación de daño en el ADN vayan acompañados de una comunicación y regulación estricta con estas proteínas. Para esto, dentro de cada división, existen puntos de monitoreo (*checkpoints* en inglés) que se encargarán de inducir puntos de control durante el ciclo celular. En ellos, se realiza una revisión de la integridad celular, así como la de su entorno, con el fin de tomar decisiones que promuevan o prevengan la división de la célula; según sea el caso.

En el caso de la célula eucariota, se cuentan con dos principales *checkpoints* a lo largo de las fases G₁, S, G₂ y M del ciclo celular; uno entre las fases G₁-S y otro entre las fases G₂-M (Alberts, 2002). El que ocurre durante la progresión de la fase G₂ a M es particularmente importante, ya que es el evento previo a la división celular y por consiguiente previo a la posible propagación del daño no atendido. El complejo formado por la Ciclina B y Cdk1 es el que regula la entrada a mitosis al final de la fase G₂, por lo que es altamente regulado. De existir daño, éste se señala a través de la cinasa ATR/ATM, sus blancos Chk1/2 (respectivamente) y p53, proteína de la cual se hablará a fondo más adelante. Estos últimos, una vez activos, provocarán la transcripción de sus proteínas blanco; las cinasas p21, Wee1 y MYT1, las cuales bloquean la activación del complejo Ciclina B/Cdk1 y con ello la entrada a mitosis (**Figura 1A**) (Stark y Taylor, 2004). Por otro lado, este arresto no tiene que ser perpetuo, por el contrario, idealmente es momentáneo hasta que se atiende el daño en cuestión o se inhiba por procesos compensatorios alternos (Clémenson y Marsolier-Klergoat, 2009). La inactivación de los *checkpoints* a través de la inhibición de sus componentes por proteínas reguladores es lo que se conoce como *checkpoint recovery* o *CHKREC*, por sus siglas en inglés (Wang *et al.*, 2015). En el caso del *checkpoint* G₂/M, éste es inactivado en el caso de una entrada normal a la mitosis, por la familia de fosfatasas CDC25 (A, B y C), principalmente inhibidas por las cinasas Chk1/2, las cuales remueven modificaciones de tipo inhibitoras en el complejo ciclina B/Cdk1. Sin embargo, es a través de las cinasas Wip1 y Plk1 que se logra la inactivación del *checkpoint* después de ocurrir lesiones en el ADN. Mientras Wip1 desfosforila, y con ello inactiva, a blancos involucrados en la señalización del daño al ADN como ATM, Chk2 y p53. Plk1, por otro lado, al ser activado por el complejo formado por la cinasa Aurora A y su cofactor Bora, se encarga de inhibir sustratos como la claspina (cofactor de Chk1), Wee1, así como activar a las fosfatasas CDC25 (**Figura 1B**) (Medema y Macûrek, 2012). La expresión de ambas cinasas es producto de una retroalimentación negativa generada por la misma DDR y el *checkpoint* G₂/M, en donde se promueve su transcripción a la par, o por las proteínas del DDR, pero sólo se propicia su activación una vez que haya ocurrido la reparación del daño, con el objetivo de que la célula no permanezca perpetuamente en arresto (Medema y Macûrek, 2012). Es por esto, que la activación prematura por procesos externos de cualquiera de las proteínas del *CHKREC* pueden llevar a la célula a truncar el proceso de reparación y/o entrar a mitosis con daño no reparado.

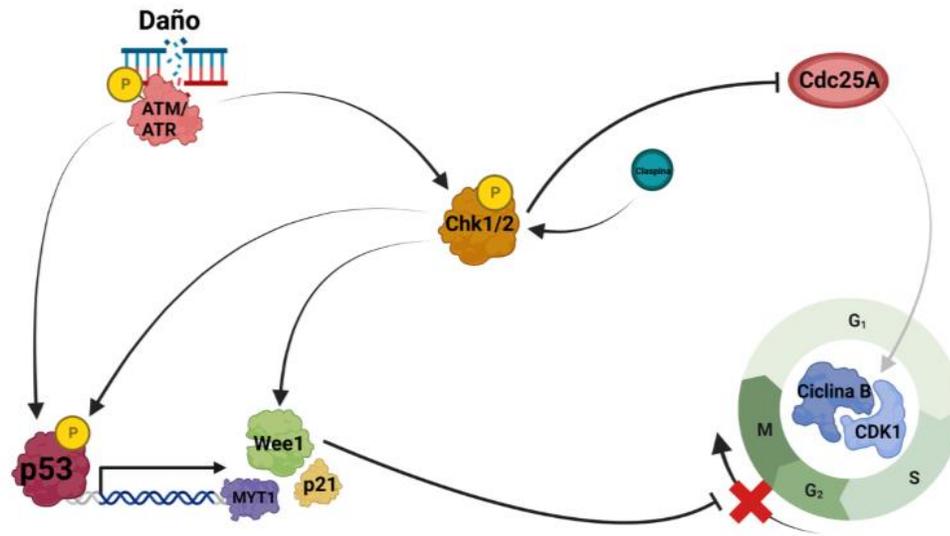
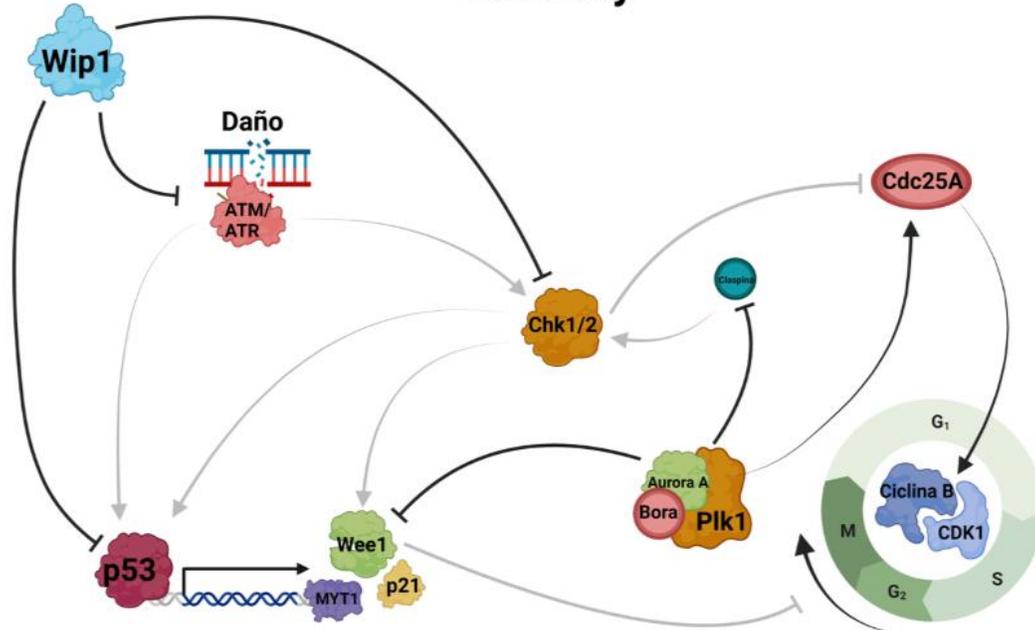
A**CHECKPOINT****B****CHECKPOINT recovery**

Figura 1. Regulación del ciclo celular frente a daño y reparación del ADN. (A) *Checkpoint G₂/M*, una vez ocurrido el daño en el ADN, este será reconocido por las cinasas ATM/ATR, las cuales fosforilan a las proteínas transductoras Chk1/2 y p53. Chk1/2 y p53 inhibirán al complejo Ciclina B/Cdk1 de manera indirecta al inhibir a Cdc25A y promover la transcripción de inhibidores del complejo Ciclina B/Cdk1, respectivamente. (B) *Checkpoint recovery*, al repararse el daño, Wip1 y Plk1 inhiben componentes del *Checkpoint G₂/M*, permitiendo la expresión del complejo Ciclina B/Cdk1. (Imagen creada en Biorender.com)

3.3. Reparación de rupturas de doble hebra y de enlaces covalentes cruzados en el ADN

Existen dos principales mecanismos a través de los cuales es reparado un tipo de daño conocido como ruptura de doble hebra (DSB, por sus siglas en inglés), el cual, como su nombre lo sugiere, consiste en una interrupción de la continuidad de ambas hebras de la doble hélice de ADN. Este tipo de daño, a pesar de que en ocasiones cobra funcionalidad en procesos como el rearrreglo génico en la producción de anticuerpos del sistema inmune (Li *et al.*, 2019), puede llegar a ser un daño espontáneo que es generado directamente, por reacciones químicas o, indirectamente, por errores replicativos y por agentes clastógenicos de origen exógeno, como la radiación utilizada en los tratamientos antineoplásicos (Kowalczykowski, 2015). Sin importar la causa, destaca por ser de los más letales para la célula, ya que, de no repararse, puede llevar a la célula a presentar aberraciones cromosómicas, entrar en arresto del ciclo celular e incluso a una muerte celular programada (Mao *et al.*, 2008). Por esta razón, la célula cuenta con más de un mecanismo a través del cual se reparan este tipo de lesiones, a modo de asegurar su procesamiento antes de divisiones celulares posteriores.

El primero de estos mecanismos y el más predominante, la unión de extremos no homólogos (NHEJ por sus siglas en inglés), es aquél que se caracteriza por no utilizar mecanismos de reparación basados en la recombinación de secuencias de alta homología, por lo que se considera un mecanismo de alta eficiencia, pero baja fidelidad. Es decir, al reparar un DSB por NHEJ, este mecanismo es propenso a cometer errores debido a que una vez reconocido el daño por el complejo KU70/80, este recluta a través de la activación de la cinasa DNA-PKcs a nucleasas como Artemis que se encargarán de degradar algunos nucleótidos de cada extremo de la hebra rota para dejar una sección de ADN de cadena sencilla (ssADN). Esto da cabida a que, a partir de la unión de dichos extremos cohesivos por polimerasas, proteínas de andamiaje y ligasas, se generen deleciones o modificaciones de la secuencia original de nucleótidos antes del daño (Zhao *et al.*, 2020). Aun así, su utilidad es masiva debido a que este mecanismo, a pesar de presentar mayor actividad en la fase G1, puede actuar en cualquier fase del ciclo celular (Li *et al.*, 2019). De igual manera existe una reparación de tipo no recombinante que difiere ligeramente de la vía canónica ya mencionada. Este mecanismo es conocido como NHEJ alternativa o unión de extremos mediada por microhomologías (MMEJ, por sus siglas en inglés) (**Figura 2B**). La diferencia radica principalmente en que este mecanismo parte de una resección de nucleótidos más larga, con el objetivo de obtener ssADN suficiente para que ocurra una búsqueda de microhomologías de 2 a 20 nucleótidos (Seol *et al.*, 2018). Posteriormente, ocurre una síntesis, a través de la polimerasa Θ , de la brecha entre el ssADN y el límite del ADN de cadena doble (dsADN) (Scully *et al.*, 2019).

Por otro lado, el mecanismo recombinante predilecto para la reparación fidedigna de DSB es el conocido como recombinación homóloga o HR por sus siglas en inglés (**Figura 2B**). Este mecanismo, a diferencia de NHEJ, al reparar el DSB reconstituye la integridad de ambas hebras sin generar modificaciones *de novo*, por lo que se le conoce como un mecanismo de reparación de alta fidelidad. En éste, también ocurre un procesamiento del DSB a extremos cohesivos como en NHEJ, solo que en este caso a través de la proteína CtIP y el complejo MRN. Éste último recluta a la cinasa ATM para activar sus blancos involucrados en la respuesta al daño, específicamente la fosforilación de la histona H2AX (conocida como γ H2AX), siendo una señal que reclute proteínas río abajo en la reparación.

Una vez hecha la resección, el ssADN generado es recubierto y protegido por la proteína RPA, para después dar paso a una resección por la endonucleasa Exo1 que alarga el fragmento de ssADN (Li *et al.*, 2019). Esto permite la sustitución de RPA por la proteína RAD51 con la ayuda de la proteína BRCA2 para poder formar un nucleofilamento de recombinación que migrará e invadirá el loci homólogo al daño en la cromátida hermana, también conocido como complejo presináptico (Kowalczykowski, 2015); la formación de dicho complejo excluye la reparación por NHEJ, por lo que se considera un punto competitivo entre ambas vías por la reparación del daño (Kass *et al.*, 2010).

Una vez que el complejo presináptico encuentra su secuencia homóloga en la cromátida hermana, éste invade la doble hélice y genera lo que se conoce como un D-loop o bucle de desplazamiento, el cual es el espacio entre la hebra invasora y la hebra opuesta a la secuencia homóloga encontrada. A partir de esta estructura ocurre una síntesis de los fragmentos perdidos en el procesamiento del DSB (resección), utilizando a la cromátida hermana como molde. Finalmente, dependiendo de la resolución de la estructura intermediaria producida, o uniones de Holliday, puede o no ocurrir una recombinación con o sin *crossing over* (Scully *et al.*, 2019). A través de este proceso se asegura una reparación que recupere fielmente la integridad del material genético en cuestión (Ceccaldi *et al.*, 2016).

Otra de las lesiones más citotóxicas que pueden generarse en la célula son aquellas conocidas como enlaces covalentes cruzados o ICL por sus siglas en inglés; fuertes uniones químicas entre ambas hebras de la doble hélice que, debido a su naturaleza covalente, representan un obstáculo total frente a las maquinarias de transcripción y replicación de la célula, deteniendo ambos procesos (Bezalel-Buch *et al.*, 2020 y McCabe *et al.*, 2009).

Los ICL pueden surgir a partir de diversas moléculas químicas de origen exógeno, así como productos del metabolismo endógeno de la célula. Endógenamente, es común que los ICL se generen a partir de subproductos de procesos metabólicos como las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en la respiración oxidativa y los aldehídos en la oxidación de alcoholes. Sea cual sea su origen; su característica y bifuncional estructura es lo que permite a ambos extremos de la molécula reticulante formar enlaces con ambas hebras del ADN. Debido a la fuerza de esta unión, el procesamiento para su remoción consiste en cortes nucleolíticos a su alrededor y no un corte en el ICL *per se* (**Figura 2A**) (Vázquez, 2010).

La vía de reparación de un ICL, conocida como la vía FA/BRCA (**Figura 2A**), comienza con la detección indirecta del ICL a través del arresto que éste causa entre ambas horquillas de replicación del ADN durante la fase S del ciclo celular. El complejo proteico FANCM (conformado por la proteína de unión a ADN FANCM, las chaperonas de histonas MHF1 y MHF2, y la proteína FAAP24) es la que reconoce el ICL al ser fosforilado por la cinasa ATM, convirtiéndose así en una estructura de andamiaje para el posicionamiento de la ubiquitina ligasa conocida como el complejo central AF (conformado por las siguientes 10 proteínas: FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCT, FAAP100 y FAAP20) y el heterodímero FANCD2-I (Rodríguez *et al.*, 2012). Una vez posicionados, el complejo central se encargará de monoubiquitinar a FANCD2-I para que éste reclute a su vez a diferentes endonucleasas que procesarán al ICL produciendo dos cortes su alrededor, generando un DSB. Esto liberará el ICL de una de las hebras parentales, mientras que permanecerá unido a la otra hebra generando un aducto; a este proceso también conocido como *unhooking* o desenganche (**Figura 2A**) (Semlow y Walter, 2021).

En el caso del aducto, sin importar su presencia, se hará una síntesis de los nucleótidos faltantes en la hebra hija. Esta elongación sólo puede ser realizada por polimerasas traslesión como REV1 y Polx, las cuales serán reclutadas al sitio del aducto a través de la forma ubiquitinada de PCNA (proteína que funge como factor de procesividad para las ADN polimerasas épsilon y delta) (Kelman, 1997). Finalmente, el aducto remanente en la hebra parental será eliminado por medio de la vía de reparación de escisión de nucleótidos (NER, por sus siglas en inglés) (**Figura 2B**).

Por otro lado, el DSB generado en el *unhooking* del ICL se reparará preferencialmente por medio de la vía de reparación por HR, debido a la manera en la que las proteínas FA/BRCA favorecen la interacción de la proteína BRCA1 y el complejo RAD51 con el DSB (Rodríguez *et al.*, 2012), factores que, como se mencionó antes, son cruciales para vías de reparación recombinantes.

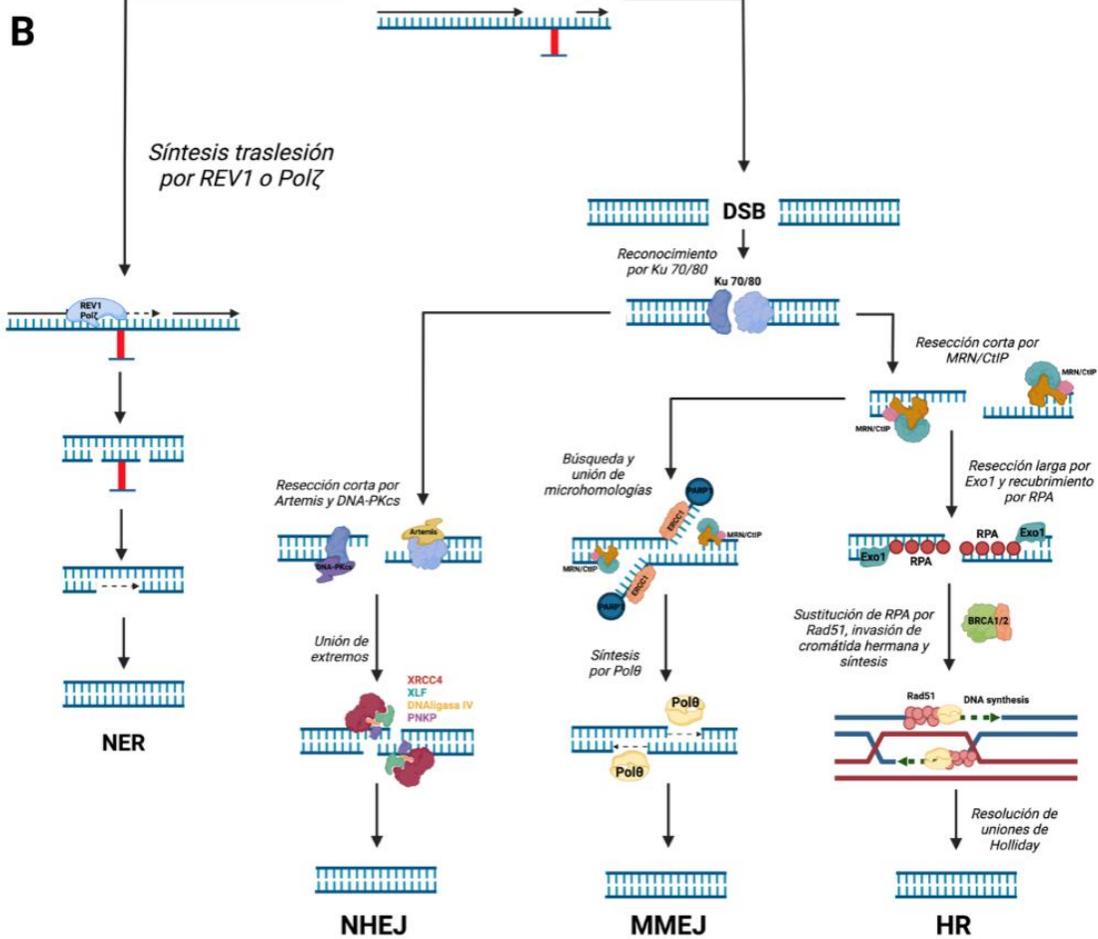
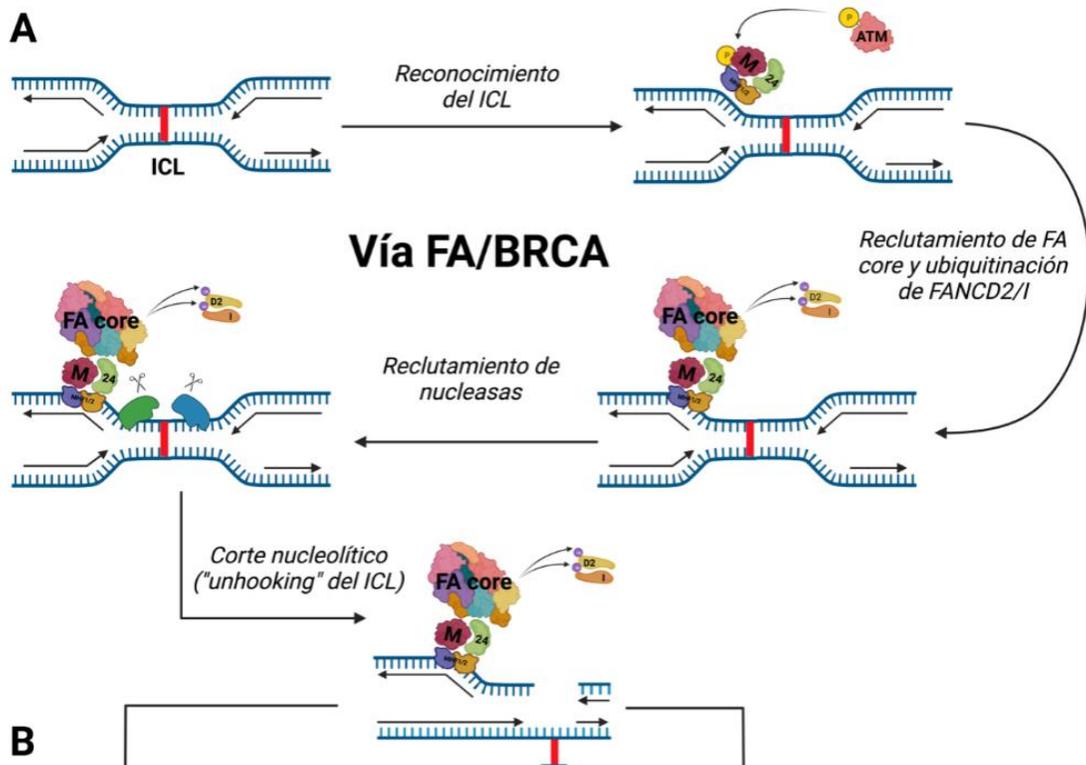


Figura 2. Reparación de ICL por la vía FA/BRCA y mecanismos de reparación. (A) Vía FA/BRCA. Primero el ICL es reconocido por ATM/ATR, reclutando al complejo FANCM y al complejo FA core. FA core ubiquitina a FANCD2/I para que este reclute a nucleasas que al hacer cortes a ambos lados del ICL lo liberarán (“unhooking”), generando un aducto y un DSB. (B) Reparación del aducto y DSB por diferentes vías de reparación. El aducto es reparado a través de una síntesis traslesión por REV1 o Pol ζ , seguido de la vía NER. El DSB es reparado preferencialmente por la vía fidedigna HR, utilizando la cromátida hermana como molde; no obstante, se cuentan con vías alternas propensas a errores como MMEJ y NHEJ.

(Imagen creada en Biorender.com)

Finalmente, una vez reparado el ICL, el complejo USP1/UAF1 se encargará de desubiquitar a FANCD2/FANCI con el objetivo de liberarlo de la cromatina y que pueda continuar el proceso de replicación (García-de-Teresa *et al.*, 2020).

Como puede imaginarse, una vía de reparación tan compleja e importante como ésta, juega un papel fundamental dentro del procesamiento de lesiones, en su mayoría letales, o con gran potencial carcinogénico. Por lo que modificaciones o deficiencias en cualquiera de las proteínas involucradas en su funcionamiento conducen al desarrollo de distintas enfermedades con deficiencias en la reparación del ADN (síndromes de inestabilidad genómica) que se caracterizan por una comprometida hematopoyesis (síndromes de falla medular) (Raess *et al.*, 2014).

3.4. La anemia de Fanconi

La enfermedad anemia de Fanconi (AF) es el ejemplo específico de lo que ocurre cuando la vía FA/BRCA no funciona de manera correcta. Ésta consiste en un síndrome de falla medular autosómico recesivo que se origina por variantes bialélicas de cualquiera de los 22 genes *FANC* (con excepción de *FANCB*, que está ligado al cromosoma X (Blanche, 2014)) (**Figura 3A**). Esto la caracteriza por ser una enfermedad con una gran heterogeneidad tanto genética como fenotípica; pese a esto, a lo largo de los años se han logrado identificar correlaciones genotipo-fenotipo que han ayudado a sentar las bases para el inicio de un diagnóstico más preciso. En general, los pacientes con AF presentan malformaciones congénitas, falla medular y predisposición a diferentes tipos de neoplasias, entre las más comunes leucemia mieloide aguda y carcinomas de células escamosas (**Figura 3B**, derecha).

En cuanto a las malformaciones congénitas, se estima que alrededor del 25% de los pacientes con AF conocidos llegan a presentar pocas o ninguna de éstas. Empero, dentro de los que sí, destacan la hipo- e hiperpigmentación de la piel, manchas café con leche, talla baja, así como anomalías en el radio, pulgares, cabeza, ojos, riñones, oídos, entre otros (Olson *et al.*, 2014).

A pesar de que el reconocimiento de estas malformaciones a través de protocolos clínicos como VACTERL-H o PHENOS (asociaciones de 3 o más fenotipos descritos en las siglas de dichos acrónimos) (**Figura 3B**, izquierda) son útiles en la orientación de un diagnóstico temprano en la AF, un diagnóstico preciso requiere de pruebas complementarias que confirmen el padecimiento de la enfermedad (Alter y Giri, 2016). Entre ellas, el estándar de oro consiste en el análisis de rupturas cromosómicas, basado en la búsqueda de aberraciones cromosómicas en muestras de sangre periférica de pacientes después de haber sido cultivadas con agentes que generen ICL, tales como la mitomicina C (MMC) o el diepoxibutano (DEB) (Mehta y Ebens, 2002). Con estos tratamientos las células son orilladas a utilizar la vía FA/BRCA para la reparación de los ICL inducidos. De padecer AF, las células del paciente, al no reparar correctamente los ICL, mostrarán distintos tipos de aberraciones cromosómicas reconocibles, como rupturas cromatídicas, rupturas cromosómicas, o rearrreglos complejos como las figuras radiales (**Figura 3B**, izquierda) (Olson *et al.*, 2014). Cabe recalcar que algunos pacientes pueden presentar fenotipos menos severos debido a mosaicismos (poblaciones celulares dentro del mismo individuo con composición genética diferente) por reversión de la mutación con ganancia de función en alguno de los alelos.

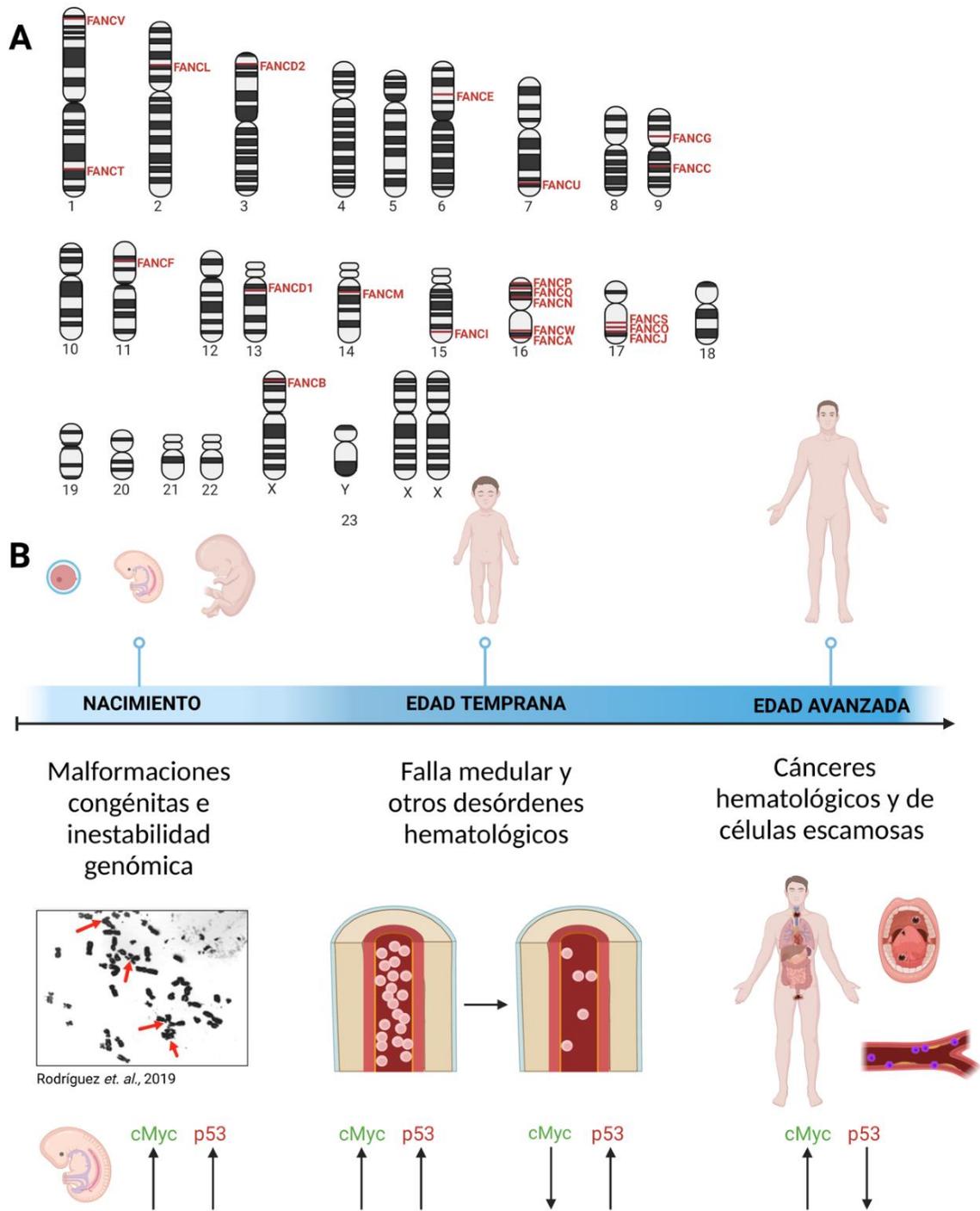


Figura 3. Resumen de características diagnósticas y clínicas de la AF. (A) Ubicación de los genes *FANCA* en los cromosomas humanos. (B) Los pacientes con AF presentan inestabilidad cromosómica desde su concepción y muchos de ellos nacen con malformaciones congénitas, la mayor parte de los pacientes desarrolla falla medular durante la infancia y tienen predisposición a cáncer, como leucemia mieloide aguda durante su adolescencia, o carcinomas de células escamosas como adultos jóvenes. Existe una sobreexpresión de cMyc y p53 en las células de los pacientes con AF desde la embriogénesis, cambiando a una sobreexpresión de Myc y de p53 en células de la médula ósea, lo que conduce a falla medular, y sobreexpresión de cMyc en tumores de células escamosas. (Imagen creada en Biorender.com)

Hecho esto, el siguiente paso consiste en identificar las variantes patogénicas (VP) causantes de la enfermedad. De acuerdo con las correlaciones del fenotipo particular del paciente con genotipos previamente descritos, se acostumbra, a través de secuenciación de nueva generación, la búsqueda de mutaciones particulares dentro de paneles específicos de genes; disminuyendo costos y esfuerzo experimental (Olson *et al.*, 2014).

Finalmente, a través de técnicas como el análisis de bandeos G, hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés) y microarreglos genómicos, es que se pueden identificar anomalías cromosómicas en células de la médula ósea y con ello prevenir el desarrollo de enfermedades hematológicas o cáncer.

3.5. El fenotipo AF: Entre la atrofia tisular y la carcinogénesis

Uno de los procesos más importantes dentro del funcionamiento del cuerpo humano es aquél donde se producen y maduran todos los diferentes linajes celulares sanguíneos; un proceso conocido como hematopoyesis. A través de ella, es que dentro de un acervo relativamente reducido de células troncales dentro de la médula ósea ocurren dos fundamentales procesos: su propia renovación, generando copias de sí mismas, y su diferenciación, dando lugar a los diferentes tipos celulares dentro del compartimento sanguíneo (Hoggat *et al.*, 2015). Para que las células troncales puedan completar ambos procesos, es necesario orquestar una minuciosa regulación a partir de una amplia gama de genes y moléculas señalizadoras (Raess *et al.*, 2014). Así, dentro de contextos espaciotemporales precisos, es que, en conjunto, estos programas de diferenciación llevan a la célula a enfrentarse a eventos tanto instructivos como estocásticos que decidirán su destino dentro de los diferentes linajes posibles (Hoggat *et al.*, 2015).

El mantenimiento postnatal de la hematopoyesis es un proceso de suma importancia, ya que concatena con las diferentes demandas y necesidades diarias del cuerpo; desde su correcta oxigenación hasta la defensa inmunológica contra patógenos e infecciones. Sin un desarrollo hematopoyético correcto, nuestro cuerpo carece de la cabalidad fisiológica necesaria para funcionar óptimamente. De manera tal, que a lo largo de los años se han reconocido y estudiado desórdenes hematológicos relacionados con deficiencias en la hematopoyesis, tales como la leucemia y distintos síndromes de falla medular (Raess *et al.*, 2014).

Debido a que la diferenciación hematopoyética es un proceso que no sólo involucra desarrollo morfológico de las células sino también una gran demanda replicativa, es crucial que todos los procesos involucrados en la división celular ocurran de manera correcta, particularmente la duplicación del material genético. Cualquier error que ocurra a lo largo de las divisiones celulares de las células troncales y progenitoras hematopoyéticas (HSPC, por

sus siglas en inglés), de no ser atendido, comprometerá por completo a todo el desarrollo hematopoyético que dicha célula anteceda.

En la AF es común que se presenten este tipo de complicaciones dentro de la primera década de vida del paciente y varían desde moderadas citopenias, hasta el desarrollo de anemia aplásica (AA) y síndromes mielodisplásicos (MDS, por sus siglas en inglés) y leucemia mieloide aguda (LMA) (**Figura 3B**, centro). Esto sucede debido a la hipersensibilidad inherente que existe en las HSPC a agentes genotóxicos, estrés oxidativo y citocinas proinflamatorias (Briot *et al.*, 2008); causando una acumulación de ICL no resueltos durante la replicación celular. Esto puede conducir a la célula a desarrollar aberraciones cromosómicas como rupturas cromatídicas, deleciones, duplicaciones, translocaciones simples, o aberraciones más complejas como cromosomas dicéntricos, figuras radiales e incluso aneuploidias (García-de-Teresa *et al.*, 2020) (**Figura 3B**, izquierda). En la mayoría de los casos, éstas son suficientes para que la célula hiperactive *checkpoints* del ciclo celular. En células de pacientes con AF, se han identificado defectos en la regulación del *checkpoint* en fase S, permitiendo que las células progresen a la fase G2 y permanezcan arrestadas en ella, con daño no resuelto, hasta tomar la decisión de comprometerse a mecanismos de muerte celular programada o apoptosis (**Figura 4**), mientras que por otro lado se puede llegar al escape de células AF con aberraciones cromosómicas no reparadas o con cariotipos alterados. Razón por la cual, la identificación de poblaciones celulares con anomalías genéticas es especialmente importante. Ya que, tomando en cuenta que la hematopoyesis es un proceso policlonal, cualquier alteración genética en una célula progenitora de la médula ósea, o cualquier célula de hecho, producto de la reparación deficiente de ICL, podría llegar a conferir una ventaja adaptativa que, combinada con una presión de selección por parte del microambiente en cuestión, promueva el establecimiento y dominancia de clones de la misma (Lensch *et al.*, 1999) (**Figura 4**).

Es común que los pacientes lleguen a presentar el desarrollo de tumores sólidos en cabeza, cuello y ano, originados a partir de células epiteliales escamosas (Olson *et al.*, 2014) (**Figura 3B**, derecha). Los pacientes con anemia de Fanconi se les ha atribuido un fenotipo “mutador”, en donde, debido a la inherente deficiencia en la reparación del daño y la inestabilidad genómica que esto representa, la cantidad de variantes que se producen en genes, muchos de ellos oncogenes o genes supresores de tumores, en comparación con individuos sanos es una diferencia suficiente para propiciar la transformación carcinogénica de manera prematura y acelerada (Nepal *et al.*, 2017). De manera interesante, dentro de los cánceres más comunes en los pacientes con AF destacan los tumores en la cavidad oral (**Figura 3B**, derecha), algunos autores atribuyéndola a la facilidad que tiene esta zona a sufrir lesiones, así como estar expuesta a factores ambientales transformantes externos como bacterias y virus (Furquim *et al.*, 2018).

¿Cuál es la razón que permite la existencia de dos destinos celulares dentro de la misma población celular? Por un lado, células AF que proliferan a pesar del daño, desarrollando cáncer; mientras que, por otro, células que entran en arresto del ciclo celular y apoptosis, generando atrofia del tejido (**Figura 4**).

3.6. La dicotomía p53 vs cMyc

p53 es una proteína multifuncional cuya actividad está cuidadosamente regulada debido a la importancia que tiene en la vigilancia de la integridad genómica al promover la transcripción de proteínas involucradas en el arresto del ciclo celular, senescencia y apoptosis (**Figura 4**). Si bien la expresión de esta proteína es relativamente baja en células sanas, ésta es constante. Ya que, al ser traducida, p53 promueve la transcripción de su propio regulador negativo, Mdm2. Mdm2 es una E3 ubiquitín ligasa que al oligomerizarse, promueve la degradación de p53 y, con ello, mantiene bajo control las vías de regulación que esta proteína promueve (Attardi y Boutelle, 2022). En cambio, cuando la célula es sometida a cualquier tipo de estrés celular, distintos tipos de proteínas señalizadoras realizarán modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, acetilación, metilación, ubiquitinación y sumoilación, tanto en p53 como en sus reguladores, con el fin de transmitir la señal del daño en cuestión y promover la correspondiente función de p53 (Harris y Levine, 2005).

En el caso de un DSB, la señalización inicia con la cinasa ATM, que con Chk2, transmiten la señal de daño a través de la fosforilación de p53 y MDM2 (**Figura 1**). Este proceso no sólo aumenta la actividad de p53 al ser fosforilada, sino que también aumenta radicalmente su expresión en la célula. La fosforilación de Mdm2 evita su oligomerización y así, su capacidad de poliubiquitar, y en el proceso degradar, a p53 (Meng *et al.*, 2014). Una vez activa, p53 reconoce y se une a secuencias específicas de ADN (conocidas como elementos responsivos a p53, o RE, por sus siglas en inglés) dentro de genes blanco, promoviendo así su transcripción.

Estudios previos han identificado una relación entre la dinámica de expresión de p53, sus modificaciones postraduccionales, los blancos que éste activa, y el destino celular. Frente al daño, patrones de expresión oscilatorios de p53, es decir incrementos y decrementos cíclicos los niveles de proteína y ARN, concuerdan con la activación de blancos involucrados en arresto del ciclo celular como p21; mientras que patrones de expresión continuos, u oscilaciones más prolongadas, promueven la expresión de genes apoptóticos como *BID*, *PUMA*, *BAX* y *BAD* (Purvis *et al.*, 2012). Además, p53 también ha sido reportado como un regulador transcripcional positivo de genes con funciones anti-apoptóticas como *BCL-2*, *MCL-2* y *A1* (Carrington *et al.*, 2017).

Estas dinámicas de expresión han sido atribuidas al tipo de estímulo en cuestión, habilitando una amplia, flexible y mecánica activación de p53, así como sus blancos, a través de un sistema que transmite información que, aunque venga de la expresión de una sola proteína,

es distinguible (Porter *et al.*, 2016). La plasticidad de este sistema permite que la célula pase de un perfil de expresión a otro, dependiendo del contexto en cuestión, logrando respuestas transitorias (arresto celular) o definitivas (apoptosis) de acuerdo con el estado del daño en la célula.

Para el caso de arresto del ciclo celular, se encuentra el gen del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1 o *CDKN1A*, que codifica para la proteína p21. Al inhibir las Cdk E/A-CDK2 y D-CDK4/6, p21 previene la hiperfosforilación de p107 y p130. En su forma hipofosforilada, estas proteínas promueven, a expensas del desplazamiento del complejo de activación transcripcional FOXM1-MMB y el heterodímero E2F1-3/DP, la reestructuración del complejo proteico MuvB a una configuración donde se ancle el complejo de represión transcripcional DREAM (Engeland, 2018). Esto provoca una represión transcripcional de genes asociados al progreso del ciclo celular, llevando a un arresto en la fase G1 del ciclo celular (**Figura 1**).

Si el daño no es reparado o es letal para la célula, entonces ésta se comprometerá a la apoptosis intrínseca. Para que este proceso inicie, p53 induce la transcripción de los genes de la familia BCL-2, los cuales tienen funciones tanto pro-apoptóticas como anti-apoptóticas (Warren *et al.*, 2019). Los genes de la familia BCL-2 con funciones pro-apoptóticas, conocidos como BH3-únicos, entonces, se encargarán de inhibir a los reguladores anti-apoptóticos de la familia BCL-2, que reprimen a los coordinadores de muerte celular BAX y BAK. Estos últimos, una vez activos, llevarán a cabo la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria. Este proceso marca el punto a partir del cual la célula se ha comprometido irreversiblemente a la apoptosis. La permeabilización de la membrana permitirá la liberación del citocromo C al citoplasma, induciendo la formación del complejo proteico apoptosoma. Este complejo, conformado por la oligomerización de APAF-1, activará a la proteasa de cisteínas Caspasa-9, que a su vez activará a las caspasas 3 y 7 (Aubrey *et al.*, 2018). Éstas últimas se encargarán de degradar los componentes celulares, sellando el destino de la célula.

Contrariamente, al oncogen *MYC* se le atribuye la proliferación aberrante de las HSPC con AF (Rodríguez *et al.*, 2020) (**Figura 4**), así como encontrarse sobreexpresado en los principales tipos de cáncer en humanos (Dhanasekaran *et al.*, 2022). Este gen codifica para la proteína MYC o cMyc, la cual, al formar heterodímeros con la proteína Max, es capaz de unirse a secuencias de ADN de tipo E-box para promover la transcripción de genes asociados a la proliferación y progresión del ciclo celular (Bretones *et al.*, 2015) durante procesos como la hematopoyesis y el desarrollo embrionario (Schmidt, 1999). De igual manera, se ha descrito que la función de cMyc también consta aliviar, de manera no específica, la elongación transcripcional de genes que ya tienen una expresión basal en la célula pero que se encuentran en un estado con polimerasas de ARN en pausa (Stine *et al.*, 2015). Por lo que, dependiendo del estado celular, la presencia o no de sus reguladores, y la accesibilidad

cromatínica que exista en la célula en cuestión, será el tipo de activación transcripcional que tenga cMyc sobre sus genes blanco, cumpliendo con el modelo de “amplificación general” de Nie y colaboradores (2012). Como ya se mencionó antes, la mayoría de estos genes corresponden a proliferación celular (ciclinas, Cdk y factores transcripcionales como E2F); sin embargo, es también sabido que cMyc comparte blancos en genes involucrados en metabolismo celular (glucólisis y glutaminólisis), síntesis de macromoléculas (nucleótidos y lípidos), así como biogénesis de organelos (ribosomas y mitocondrias) (van Riggelen *et al.*, 2010).

Finalmente, el papel de cMyc como represor radica en la inhibición de la proteína p21 a un nivel transcripcional, promoviendo la transcripción de represores transcripcionales como Miz-1 y AP4 (Bretones *et al.*, 2015), o epigénético, al interactuar con la desmetilasa de histonas KDM5B y el factor de transcripción TFAP2C (Wong *et al.*, 2012).

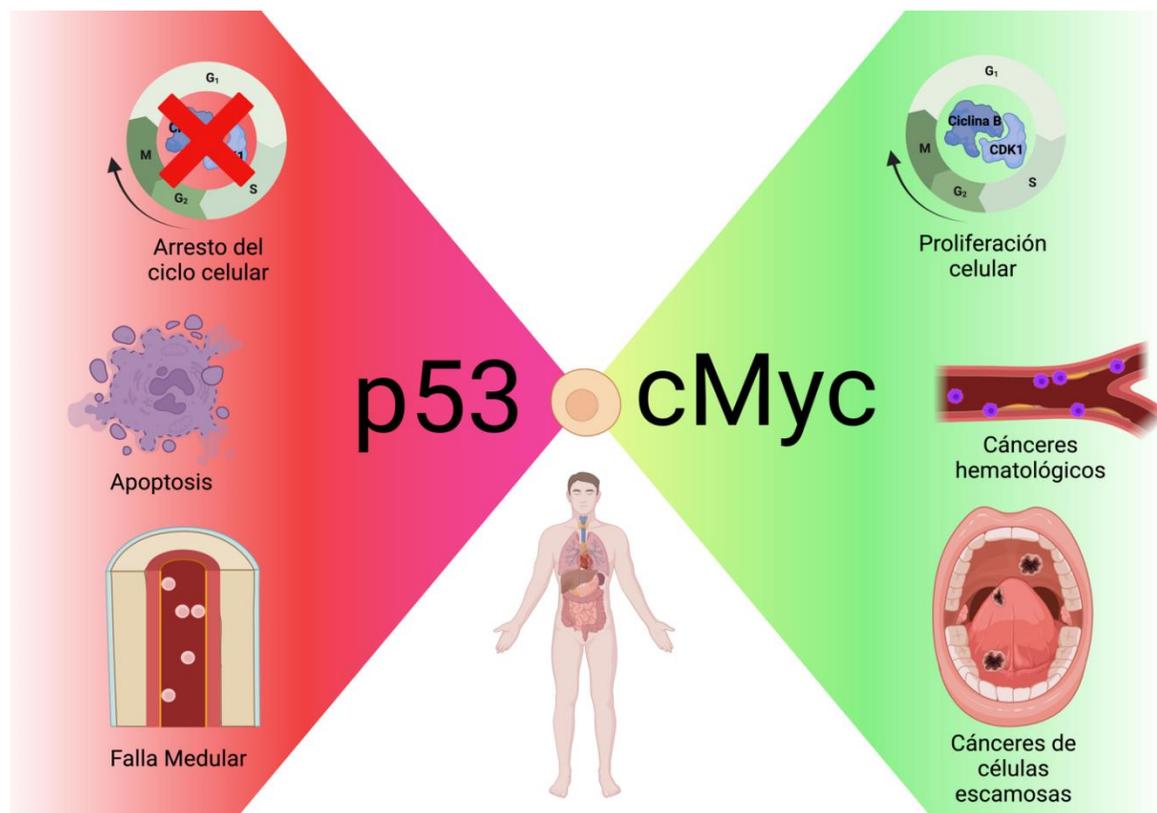


Figura 4. Consecuencias de la hiperactivación de cMyc y p53 en pacientes con anemia de Fanconi. (Izquierda) La hiperactivación de p53 causa el arresto del ciclo celular y apoptosis, exceso de activación de p53 puede generar una atrofia en el tejido en cuestión, en los pacientes con AF esto suele traducirse en falla medular. (Derecha) Por otro lado, la hiperactivación de cMyc empuja a las células a la proliferación a expensas del daño en el ADN, generando clonas con variantes que a largo plazo pueden establecer diferentes tipos de neoplasias en el paciente. (Imagen creada en Biorender.com)

3.7. Técnicas de resolución unicelular

Elucidar con minucia los distintos perfiles transcripcionales y proteicos dentro de una población celular, es algo que permite el análisis de cambios dinámicos, así como la detección de propiedades emergentes, en un sistema biológico heterogéneo. Algo que, a través de tecnologías con resolución poblacional o *bulk*, sería complicado, o incluso imposible.

Recientemente, las tecnologías de análisis con resolución unicelular han permitido la obtención e integración de información a múltiples dimensiones celulares, mejorando así el entendimiento de procesos que ocurren durante el desarrollo, establecimiento y progresión de enfermedades en distintos organismos (Ma *et al.*, 2013). Particularmente la proteómica con resolución unicelular ha demostrado ser una perspectiva experimental de gran utilidad dentro del estudio y caracterización de perfiles de expresión inmiscuidos en poblaciones celulares complejas. A través de la inmunodetección de proteínas de interés, es posible caracterizar tipos y estados celulares en contextos espacio-temporales concretos, dando pie a la detección de estados de transición o poblaciones particulares con propiedades de interés (Stein *et al.*, 2021).

La técnica más reconocida dentro de la proteómica unicelular, la citometría de flujo (**Figura 5**). Es una metodología que, partiendo del flujo de células en suspensión a través de un láser, es capaz de detectar por medio de un receptor dos diferentes tipos de información sobre las células: su características fluorescentes, consistiendo en las emisiones fotónicas de fluorocromos acoplados a anticuerpos previamente incubados contra las proteínas intracelulares y de superficie de las células; así como las características ópticas, asociando la refracción y reflexión del láser con el tamaño y granularidad de las células (Adan *et al.*, 2016).

Aun cuando la accesibilidad de esta técnica la ha convertido en una opción popular dentro de la proteómica actual, existen ciertas limitantes técnicas que a su vez restringen el tipo de preguntas que esta metodología puede contestar. Es por esto que han surgido múltiples variantes de la misma. Una de ellas, la citometría de flujo por tiempo de vuelo (o CyTOF, por sus siglas en inglés), consiste en una variante de la citometría convencional, con la diferencia que en ésta la cuantificación de los niveles proteicos en las células no se hace con anticuerpos acoplados a fluorocromos (**Figura 5A**), sino con anticuerpos acoplados a isótopos de metales raros dentro de la serie de los lantánidos (**Figura 5B**) (Nowicka *et al.*, 2017).

La razón de esta modificación recae en que, al utilizar anticuerpos fluorocromados, éstos se detectan y diferencian a través de las emisiones que producen a diferentes longitudes de onda dentro del espectro de luz, por lo que se limitan a la gama de colores existente; dando pie a

posible solapamiento de señales entre anticuerpos en paneles amplios, también conocido como solapamiento espectral (**Figura 5A**). Además, existe una autofluorescencia natural emitida por las células, a pesar de no tener componentes unidos a los anticuerpos, lo que lleva a una señal menos limpia. El utilizar metales raros en los anticuerpos es una estrategia para eliminar estas complicaciones. Ya que, los isótopos de estos metales además de dar la posibilidad de un panel extenso de anticuerpos, también son elementos que naturalmente no existen en los seres vivos, evitando cualquier tipo de autofluorescencia y solapamiento espectral (**Figura 5B**). Debido a que los anticuerpos conjugados son detectados y diferenciados a través del tiempo de vuelo que cada isótopo ionizado tiene al pasar por el detector, es necesario que éstos, y sólo éstos, pasen por el detector. Esto implica una lisis celular previa, con el fin de liberar los componentes celulares y después un proceso donde se ionizan y filtran aquellos elementos acoplados a un anticuerpo (Nowicka *et al.*, 2017). La desventaja de esta metodología es que es un método destructivo; es decir, no es posible recuperar las células analizadas, algo que en la citometría convencional sí.

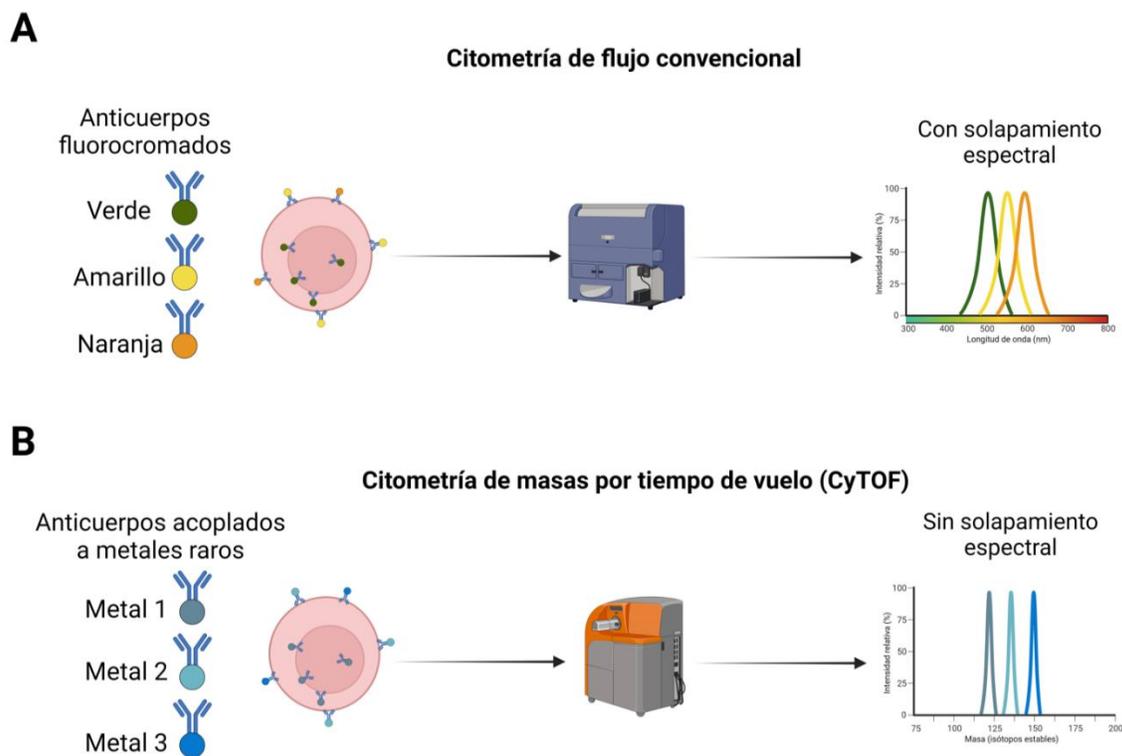


Figura 5. Diferencia entre CyTOF y citometría convencional. (A) La citometría convencional utiliza anticuerpos fluorocromados para la detección de proteínas de interés, la señal emitida por estos se restringe al espectro de luz visible, por lo que existe solapamiento de señales (espectral) al cuantificarse. Por otro lado, (B) la CyTOF utiliza anticuerpos acoplados a metales raros no presentes en los seres vivos, por lo que su señal es mucho más precisa, evitando solapamiento con otros anticuerpos y ampliando el número que puede utilizarse.

(Imagen creada en Biorender.com)

Por otro lado, una de las técnicas fundamentales dentro del estudio de la proteómica es, y ha sido, la utilización de anticuerpos fluorocromados para la tinción de cualquier cultivo, suspensión celular o muestra de tejido; es decir, la tinción inmunofluorescente. No obstante, el número de marcadores que pueden utilizarse en la tinción de una muestra al mismo tiempo es restringido, debido al solapamiento espectral ya mencionado y a la reactividad que los anticuerpos pueden tener con zonas no específicas o entre ellos (Im *et al.*, 2019). Nuevas metodologías basadas en la tinción inmunofluorescente han probado dar la vuelta a este problema, ampliando aún más el rango de marcadores a utilizar. Específicamente, la inmunofluorescencia cíclica múltiple en tejidos, o t-CyCIF por sus siglas en inglés, es una variación de la tinción canónica, exceptuando que no sólo se realiza una sola tinción por muestra. En cambio, se realizan ciclos de tinción después de haber procesado la muestra por protocolos comúnmente utilizados antes de la tinción. Cada ciclo consiste en lo siguiente: las muestras son sometidas a una tinción con cuatro anticuerpos, tres correspondientes a las proteínas de interés, mientras que el cuarto es una tinción contra el ADN; hecho esto, las muestras son fotografiadas para cada marcador en un microscopio de alta resolución; finalmente, se realiza un blanqueamiento de los fluorocromos y un lavado para poder comenzar con otro ciclo (**Figura 6A**). A través de éstos, las muestras pueden ser teñidas y fotografiadas repetidas veces, permitiendo la adición de nuevos marcadores al surgir diferentes preguntas de investigación (<https://www.cycif.org/methods/>).

Debido a que las muestras son escaneadas con cada ciclo a través de microscopios fluorescentes de alta resolución, es necesario la unión de todas las imágenes generadas para obtener una imagen multidimensional donde sea posible visualizar virtualmente cada componente teñido (**Figura 6B**, izquierda). Si bien la información visual que uno puede obtener de la imagen es sumamente valiosa, las limitaciones asociadas a lo que nuestros ojos perciben e interpretan no dejan de existir. Es por esto que el análisis de las imágenes a través de un pipeline bioinformático es crucial.

Hay que recordar que una imagen no es más que una matriz de datos (comúnmente conocidos como píxeles) a los que, dependiendo su valor, se les asigna un tono dentro de una gama de colores específica. De este modo, se puede traducir una interpretación visual de los datos a una representación numérica de los mismos, en donde se tenga un análisis verdaderamente objetivo de lo que está representando la imagen y no una inferencia subjetiva de ellos. La imagen entendida como información numérica nos permite incorporar herramientas bioinformáticas convencionales, para lograr el reconocimiento y cuantificación de las intensidades fluorescentes de cada marcador, por cada célula dentro de la imagen (**Figura 6B**, derecha). Esto da como resultado la traducción de información visual hacia un análisis de información con resolución unicelular (**Figura 6B**, derecha); añadiendo un nivel de información más.

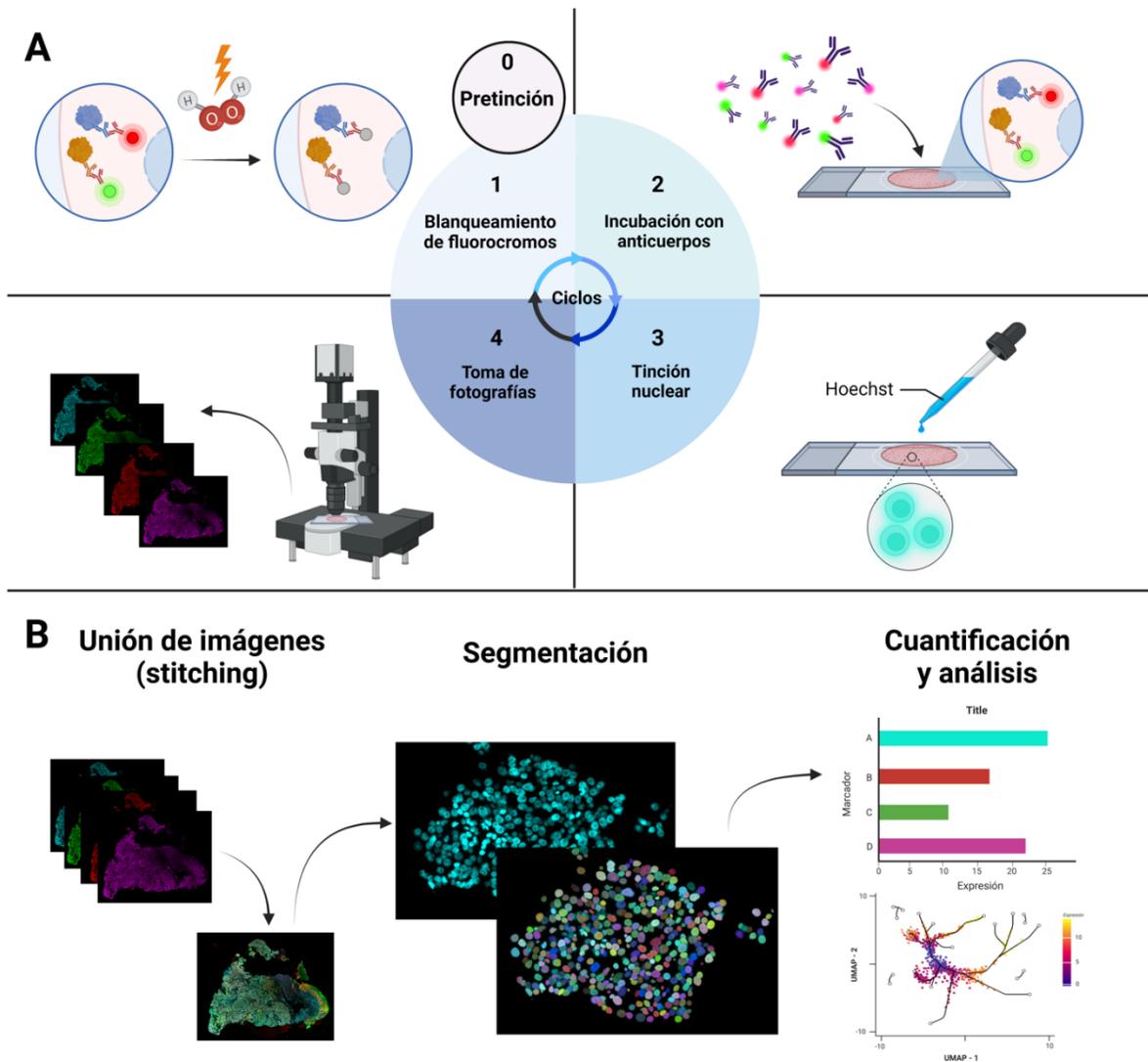


Figura 6. t-CyCIF y procesamiento de imágenes obtenidas de tejidos embebidos en parafina (FFPE). (A) Representación de t-CyCIF en FFPE, teniendo una pretinción antes del primer ciclo (0), el blanqueamiento de fluorocromos (1), tinción con anticuerpos (2) y Hoechst (3), y escaneo de la muestra (4). (B) Obtención de imagen multidimensional por *stitching* (izquierda), segmentación nuclear (centro), y cuantificación y análisis de marcadores (derecha). (Imagen creada en Biorender.com)

3.8. Biología de sistemas

Actualmente la información producida por la investigación científica ha cruzado una frontera en donde cada nuevo descubrimiento de cualquier mecanismo, propiedad o fenómeno, abre un abanico de posibilidades para generar nueva información acerca del tema. Esto ha llevado a un ciclo donde la multiplicidad del conocimiento por generar es como la paradoja de Zenón, donde por más que Aquiles avance, la tortuga siempre estará por delante de él. Por muy valiosa que esta información es y ha sido, la exponencialidad de los componentes descritos dentro de nuestros universos de investigación ha llegado a un punto en donde la suma de las partes no nos ayuda a entender el todo. Esto se debe a que el todo no funciona como la suma de sus partes, sino como una nueva cualidad de las partes y, con ello, una nueva parte a su vez. La cantidad de variables existentes dentro de un sistema tan dinámico y complejo, como lo es la célula, han logrado escapar nuestro limitado entendimiento dimensional; dejándonos con una ciencia extremadamente descriptiva y pobremente predictiva.

La biología de sistemas ha logrado ser una línea de estudio que, a través del uso de la informática y matemáticas, es capaz de dejar a un lado el reduccionismo científico y así, efectivamente integrar múltiples niveles de información para entender procesos biológicos como los sistemas dinámicos y complejos que son (Friboulet y Thomas, 2005).

La modelación matemática en la biología es una aproximación dentro de la biología de sistemas que se fundamenta y sostiene a partir de dos principales pilares. Por un lado, la generación de datos e información del sistema estudiado. Mientras que, por otro, el análisis y solución eficiente de las variables del modelo en cuestión; uno que hoy en día no sólo se ha ayudado del poder computacional, sino que se ha vuelto en cierta manera dependiente de él (Tomlin y Axelrod, 2007). La ya mencionada explosión de información generada en la biología molecular, así como los avances en el poder de procesamiento computacional y softwares bioinformáticos, han sido el semillero perfecto para comenzar a incurrir en una disciplina que ha existido desde hace décadas, pero que hoy más que nunca es sumamente necesaria.

Un modelo matemático consta de una representación abstracta, a través de una formulación matemática o ecuación, de un problema que existe en la realidad. Este modelo por ningún motivo incluye todas las variables y parámetros existentes, por lo que debe considerarse como una simplificación acertada y suficiente que logra recapitular la dinámica del sistema en cuestión. De otro modo, intentando incluir todas las variables posibles, ocurriría como en el cuento de Jorge Luis Borges “El rigor de la ciencia”, donde un cartógrafo termina creando un mapa del tamaño del territorio que desea representar. Si esto es cierto, el modelo, o en este caso el mapa, pierde toda utilidad y sentido; no representa la realidad sino la reemplaza.

Reconociendo esta simplificación, un modelo debe encontrar un balance entre la simplicidad de su formulación y su capacidad de reproducir la realidad; siendo simple dentro de su posibilidad y detallado dentro de su necesidad (Kuttler, 2009).

Existen diferentes tipos de modelos que pueden utilizarse según las preguntas que se deseen contestar y la naturaleza de lo que se desee modelar. Como primera división, existen los modelos de tipo determinista y estocásticos; diferenciándose en que los estocásticos incorporan aleatoriedad o ruido en la solución del modelo. Por lo tanto, una simulación determinada de un modelo determinista es reproducible siempre y cuando se repitan los parámetros y valores iniciales de las variables. Dentro de este tipo de modelos, existen cuatro clasificaciones más dependiendo del tratamiento que se le dé al tiempo y a las variables:

- Los modelos en tiempo discreto, en donde los cambios del estado de las variables ocurren a lo largo de unidades discretas de tiempo (e.g. 0, 1, 2, 3, etc...)
- Los modelos en tiempo continuo, en donde las variables pueden actualizar su estado en cualquier intervalo de tiempo.
- Los modelos de variable discreta, en donde el estado de las variables únicamente toma unidades discretas (e.g. 0, 1, 2, 3, etc...)
- Los modelos de variable continua, en donde los estados de las variables pueden tomar cualquier valor dentro de los números reales.

Adicionalmente, existen dos diseños metodológicos, complementarios entre sí, dentro de la construcción de cualquier tipo de modelo. La construcción de abajo hacia arriba, conocida comúnmente en inglés como *bottom-up*, la cual se hace a partir de la definición de partes o módulos concretos del sistema, a partir de evidencia experimental previa, que posteriormente se integran para construir al modelo, buscando inferir el comportamiento emergente global del sistema. Por otro lado, el método de arriba hacia abajo, o en inglés *top-down*, consta de la inferencia de un modelo, por lo general mínimo, a partir de grandes bases de datos, que derive y se ajuste a la información sobre el comportamiento global del sistema, esperando que con ello el análisis de sus componentes por separado recuperen propiedades locales (Duwal y Kelist, 2016; Crespi *et al.*, 2005).

Un modelo discreto, tanto de variable como de tiempo, sumamente empleado para el estudio de procesos biomoleculares es el que se conoce como modelo de red Booleano. Este es uno de los modelos, en su versión determinista, más simples en su formulación; a pesar de ello, han probado ser de suma utilidad para la predicción, a partir de perturbaciones en el sistema, de interacciones con importancia terapéutica o estados celulares de interés (Hickman y Hodgeman, 2019).

Partiendo de una construcción tipo *bottom-up*, la formulación de un modelo Booleano comienza por conocer, por medio de una revisión en la literatura, las variables e interacciones

presentes en el sistema a modelar (**Figura 7A**). En los modelos Booleanos las variables o nodos ($X = \{x_1, x_2, x_3, \dots, x_n\}$), que representan elementos dentro del sistema (genes, proteínas, moléculas, etc...), sólo pueden tener valores binarios de 0 y 1 (i.e., $x_i \in \mathbb{B}$, correspondiendo a estados de apagado o encendido, expresado o no expresado, activo o no activo, etc..) y las ecuaciones o funciones lógicas, que representan las interacciones existentes entre los elementos del sistema (inhibición, activación, producción, degradación, etc...), deben ser descritas a través de reglas o funciones con operadores Booleanos tipo *AND*, *OR* y *NOT* (“y”, “|” y “!”), respectivamente); describiendo lo que es o no suficiente o necesario para que una variable se encienda (**Figura 7A**). Así, su estado (0 o 1) al tiempo $t + 1$ (recordando que el paso del tiempo es discreto), estará determinado si se cumple la condición lógica definida por la función booleana al tiempo t . Puesto de otra forma, $x_i(t+1) = F_i(x_1(t), x_2(t), x_3(t), \dots, x_n(t))$, donde F_i representa el conjunto de reglas o funciones Booleanas por cada nodo en el sistema. Esto permite que, a partir de un estado inicial, se desencadene una dinámica donde, con cada actualización de tiempo, las variables se “enciendan” y “apaguen”, según sea el caso, hasta llegar a un estado donde por más que se actualice el sistema, no hay cambios en los valores de las variables, algo conocido como atractor. Estos pueden ser clasificados en atractores de tipo fijo, constando de un sólo estado, o atractores cíclicos, donde el sistema circula continuamente a lo largo de más de un atractor (**Figura 7B**).

Además, existen dos principales tipos de actualización que puede tener una red booleana determinista. Síncrona, en donde todas las funciones Booleanas son “leídas” al mismo tiempo, actualizándose todas las variables simultáneamente, o asíncrona, en donde existe la posibilidad de definir diferentes ordenes de “lectura” de las funciones Booleanas; y por lo tanto, la actualización de las variables es a diferentes tiempos. Esto permite, por ejemplo, que puedan modelarse dinámicas biológicas con diferentes escalas temporales. Esto por ningún motivo demerita el valor que tienen los modelos síncronos, ya que también son capaces de llegar a conclusiones significativas del sistema y evitan que, al realizar simulaciones del modelo, las trayectorias de éste ocurran en intervalos muy largos de tiempo (Bornholdt, 2008).

Debido a que el sistema funciona con valores binarios, existe un aumento exponencial de tipo 2^n en el número de estados posibles, de acuerdo con el incremento en el n número de nodos que componen el sistema. Sin embargo, múltiples estados iniciales pueden compartir el mismo atractor, el conjunto de ellos se les conoce como la cuenca de atracción de dicho atractor (**Figura 7B**). Entre más grande la cuenca de atracción, es más probable que el atractor sea biológicamente significativo (Schwab *et al.*, 2020).

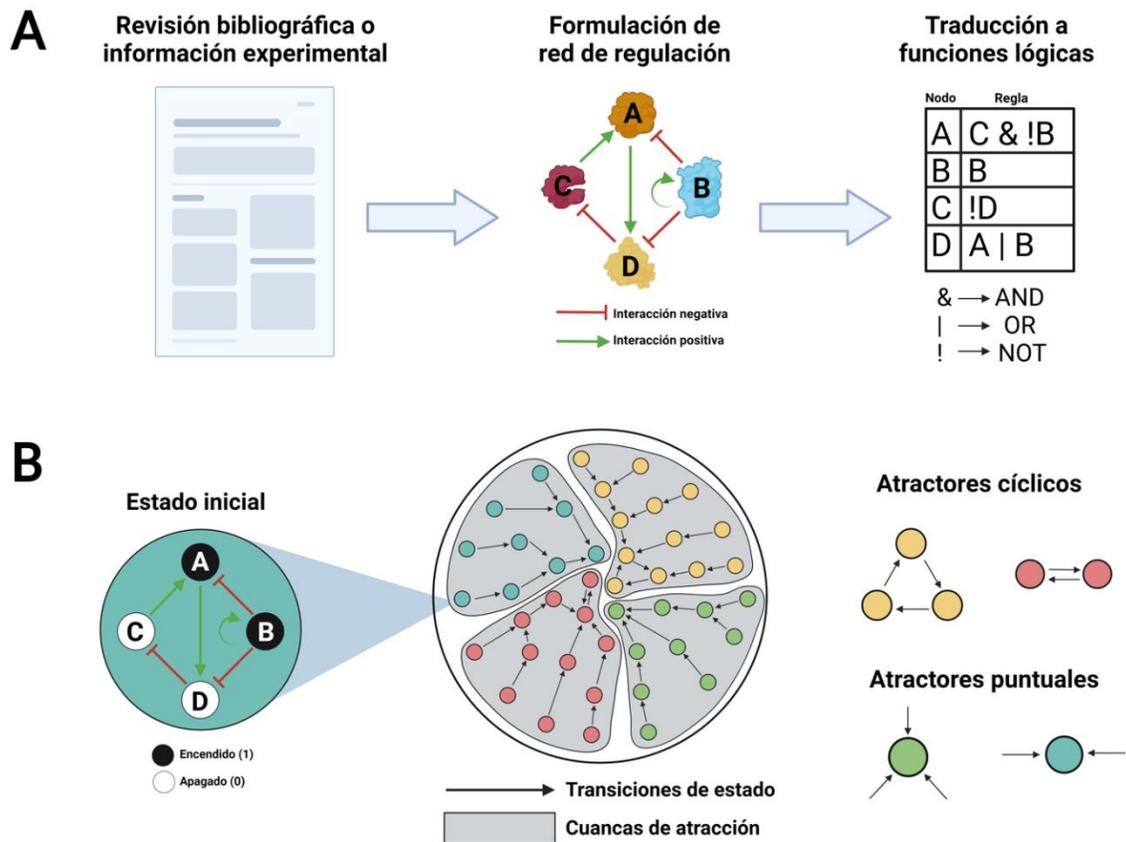


Figura 7. Generación y análisis de modelos Booleanos. (A) Generación de un modelo Booleano a través de la integración de información bibliográfica y experimental (izquierda) en una red de regulación (centro) con interacciones entre nodos que posteriormente se traducen a funciones lógicas (derecha). (B) Diferentes estados iniciales (izquierda) del modelo producen transiciones de estado que convergen en atractores (centro) de tipo puntual o cíclico (derecha). Al conjunto de estados iniciales que convergen en el mismo atractor se le llama cuenca de atracción (centro). (Imagen creada en Biorender.com)

Finalmente, existe una retroalimentación constante entre validaciones experimentales en el sistema biológico y pruebas y/o simulaciones del modelo. Dentro de las validaciones iniciales, a través de simulaciones donde se delimiten estados iniciales particulares y/o habilitando el encendido o apagado continuo de un nodo en específico (análogo a mutantes con sobreexpresión o un *knock-out* de un gen, respectivamente), debería esperarse que el modelo muestre representatividad de las cualidades y comportamientos esperados del sistema a modelar. Además, es importante que el modelo muestre robustez estructural, es decir, sea capaz de conservar cierta estabilidad ante perturbaciones en la topología estructural del modelo (Hebbar *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2015). Un ejemplo de esto se hace al provocar cambios en los operadores lógicos de las reglas del sistema y analizando los cambios cualitativos de la red. De igual manera, el modelo debe presentar plasticidad ante cambios en los parámetros del sistema, siendo capaz de cambiar sus estados estables (o atractores) ante modificaciones en los valores de las variables de estado (Hebber *et al.*, 2022). Esto no sólo permite que el modelo sea descriptivo de la realidad que modela, sino también solidifique su

valor predictivo al permitir probar hipótesis de una manera mucho menos costosa, evidenciando elementos fundamentales en la red, así como interacciones y los estados celulares asociados (Schwab *et al.*, 2020).

4. ANTECEDENTES DIRECTOS

4.1. La toma de decisiones en los tejidos AF: cMyc vs p53

Recalcando que la AF es una enfermedad genética. Podemos asumir que la hiperactivación de cMyc y de p53, como consecuencia de una reparación deficiente del ADN, ocurre durante todo el desarrollo del individuo, particularmente en tejidos o contextos con una alta tasa proliferativa. Un primer ejemplo de un proceso con altos índices de proliferación es la embriogénesis. Rodríguez *et al.* (2022) detectaron que, al no poder utilizar vías de reparación de alta fidelidad como lo es la HR, el embrión de ratón con AF activa la vía de NHEJ, la cual es propensa a errores, a través de la señalización de la vía de TGF β (Kim *et al.*, 2014). TGF β es un regulador transcripcional que, a través de proteínas señalizadoras llamadas SMADs, finge como un represor de proteínas relacionadas con la proliferación, como cMyc (Kowalik, 2002), y como un activador de proteínas con funciones supresoras de crecimiento, como p53 (Atfi y Baron, 2008, y Kawarada *et al.*, 2016); entre otras funciones. Al estudiar los perfiles de expresión de dichos embriones de ratón, Rodríguez *et al.* (2022) detectaron además la sobreexpresión simultánea tanto de *MYC* como de *TP53* (**Figura 3B**, izquierda), lo cual podría, como ya se mencionó, estar siendo controlado por TGF β . Estos datos sugieren que la co-expresión elevada de *MYC* y *TP53*, factores de transcripción con actividades enteramente opuestas, podría estar generando conflictos en la toma de decisiones celulares desde el desarrollo embrionario de los individuos con AF.

Un segundo ejemplo de proceso altamente proliferativo es la hematopoyesis. Durante ella, ocurren además otro tipo de señalizaciones que llevan a las células con AF a generar una heterogeneidad de perfiles transcripcionales, entre los cuales se han identificado perfiles de sobrevida con un riesgo carcinogénico. Con el fin de esclarecer dicha heterogeneidad antes del desarrollo del cáncer o la falla medular. Rodríguez *et al.* (2021) realizaron una secuenciación de ARN con resolución unicelular en HSPC de 7 pacientes con AF y 5 donadores sanos. Además de detectar aumentos en la concentración de citocinas proinflamatorias en la médula ósea de los pacientes, hiperactivando a receptores proinflamatorios como TNF- α , que se ha descrito como capaz de incrementar la expresión de cMyc (Zhang *et al.*, 2017), así como la activación de vías supresoras de crecimiento ya mencionados como TGF β , se encontraron múltiples subpoblaciones de HSPC de pacientes con AF que presentaban una sobreexpresión conjunta, o exclusiva, de cMyc y p53. La existencia de una población celular doble positiva para cMyc y p53 parecería indicar un punto en dónde aparentemente la célula tiene una funcionalidad contradictoria y es probable que esté tomando una “decisión” entre la sobreexpresión de uno de los dos genes (**Figura 3B**, centro, y **Figura 8**).

De manera paralela, el grupo de Webster *et al* (2023) encontró, al secuenciar el genoma y exoma completo de tumores sólidos de pacientes con AF, que el mecanismo detrás de la transformación cancerígena en las muestras analizadas es debido al efecto conjunto de una pérdida, genómica o en expresión, de *TP53* y la amplificación de oncogenes relacionados con la transformación epitelio-mesénquima y el establecimiento de cáncer de células escamosas; entre ellos *MYC* (**Figura 3B**, derecha). Esto nos lleva a pensar que, en ciertos contextos, una célula AF con daño es capaz de dividirse a pesar de las variantes estructurales que éste causa, gracias al efecto de proteínas mitogénicas como cMyc. Esto explicaría la aparición de clonas con amplificaciones de oncogenes y deleciones de genes supresores de tumores, que sean susceptibles a una selección clonal y posterior establecimiento del cáncer

De los tres contextos expuestos podemos inferir que la dicotomía de los reguladores transcripcionales maestros cMyc-p53 es crítica a lo largo de la vida de los individuos con AF.

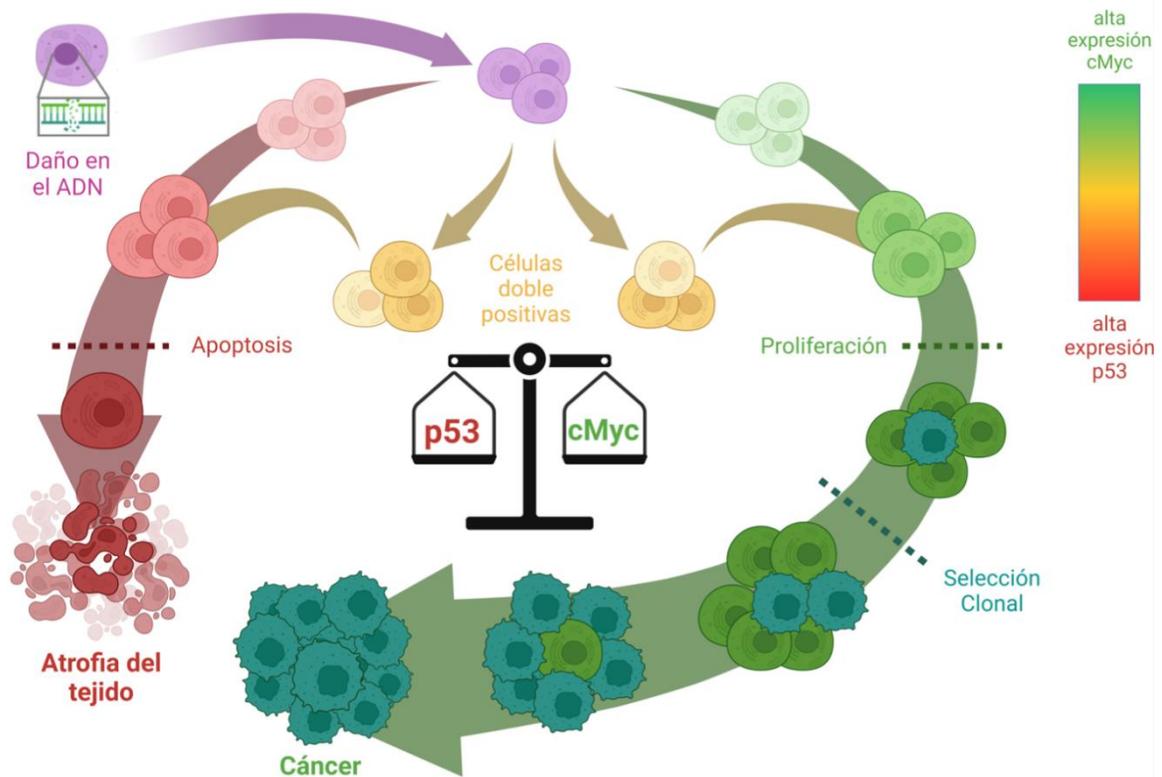


Figura 8. Proceso de decisión entre cMyc y p53. El daño en el ADN no resultado en las células AF produce una sobreexpresión de cMyc y p53 (células doble positivas) a partir de lo cual existe la posibilidad de elegir el destino mediado por p53, llevando a la apoptosis y atrofia del tejido en cuestión (izquierda); o elegir el destino celular mediado por cMyc, el cual promueve la división celular con ADN dañado, dando la posibilidad de generar variantes carcinogénicas en células que, a través de selección clonal, generen cáncer (derecha).

(Imagen creada en Biorender.com)

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde su concepción, los embriones con AF, al no ser capaces de reparar ICL por la vía FA/BRCA, deben llevar a cabo una intrincada reorganización regulatoria que permite la supervivencia celular a expensas del daño y con ello el desarrollo del embrión. Es conocido que la inherente deficiencia en la reparación en las células AF activa al gen supresor de tumores *TP53*; sin embargo, las células AF también son capaces de sobreexpresar al oncogén *MYC*. La paradoja regulatoria que esto representa podría ser consecuencia de un proceso compensatorio contra la activación de p53 y la muerte celular. Se ha observado que existen células AF que solo expresan a cMyc, células que solo expresan a p53, y células que co-expresan a ambos, lo cual nos lleva a la pregunta de si en dichas células existe un proceso de toma de decisión del destino celular entre ambos perfiles transcripcionales. Actualmente, sigue siendo desconocido como es que las células en cada uno de los tejidos de los pacientes con AF toman las decisiones ante dicha dicotomía. Es posible que la decisión por un perfil transcripcional con sobreexpresión de p53 ocurra en la médula ósea, provocando falla medular y atrofia del tejido. Mientras que la decisión de un perfil transcripcional con sobreexpresión de cMyc ocurra en el tejido epitelial, promoviendo el desarrollo de tumores sólidos. No obstante, se desconocen los factores y la regulación subyacente a este proceso debido a su gran complejidad y limitada descripción.

6. JUSTIFICACIÓN

La AF ha demostrado ser una enfermedad que, debido a su naturaleza genética, funge como un modelo *de facto* para estudiar los mecanismos de reparación del ADN y las repercusiones que existen si ocurre una reparación aberrante y una división celular a pesar de ella. El estudio de la dinámica de cMyc y p53 es uno que se beneficiaría mucho de la implementación de diferentes perspectivas experimentales como la proteómica unicelular y el modelado matemático, debido a la multidimensionalidad de sus componentes. Además, una dinámica regulatoria como ésta, no solo determina el estado funcional de múltiples tejidos en los pacientes con AF, sino que también es un modelo de estudio importante para comprender las decisiones celulares que ocurren frente a contextos adversos como es el daño en al ADN. Una serie de decisiones que, debido a la funcionalidad de cada proteína y lo que representan para el establecimiento y progresión del cáncer en los pacientes, son por mucho de vida o muerte.

7. HIPÓTESIS

La decisión entre supervivencia o apoptosis en la AF está mediada en su mayoría por la expresión de las proteínas cMyc y p53 (**Figura 4**), correspondientemente. Si la expresión es elevada en p53, las células promueven programas de arresto del ciclo celular y apoptosis, provocando atrofia en el tejido. Sin embargo, si lo contrario es cierto, la expresión elevada de cMyc orilla a las células a proliferar a pesar del daño acumulado, generando clonas pre-cancerígenas con variantes genómicas que promueven el establecimiento de cáncer (**Figura 8**).

Mediante tecnologías de proteómica unicelular en muestras de pacientes con AF, se verá representada esta dinámica proteica. Donde a través de la CyTOF en células de origen hematopoyético, se encontrarán perfiles de expresión dinámicos altos en cMyc, altos en p53, o ambos (representando un estado de “indecisión”). Mientras que a través de la t-CyCIF en muestras de tumores de células escamosas de pacientes con AF, se encontrará una mayor expresión de cMyc sobre p53 (representando la decisión de un perfil sobre otro) que corresponderá con el estado de progresión del cáncer. Dicha decisión dependerá principalmente de una red de interacciones entre cMyc, p53, así como sus respectivos reguladores. Misma que podrá ser recapitulada en motivos regulatorios concretos, que, al ser traducidos en un modelo matemático dinámico de tipo booleano, será capaz de identificar reguladores y eventos clave durante la toma de decisión del destino celular, así como elucidar las interacciones detrás de este proceso.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo general

Estudiar la regulación existente entre cMyc y p53 en las células AF, a través de biología de sistemas, con el fin de proponer mecanismos celulares que expliquen la toma de decisiones celulares entre supervivencia y apoptosis.

8.2. Objetivos particulares

Con esto en mente, los objetivos particulares derivados son los siguientes:

1. Evaluar la dinámica de expresión de cMyc y p53 en respuesta a diferentes niveles de daño genómico en células AF de origen hematopoyético.
2. Analizar los patrones de expresión de cMyc y p53 durante la progresión carcinogénica en tumores de células escamosas de pacientes con AF.

3. Identificar, a través de una revisión bibliográfica, así como del análisis de datos de secuenciación unicelular de ARN, los principales agentes celulares y procesos que regulan la expresión y actividad de cMyc y p53.
4. Construir un modelo matemático discreto que recapitule e identifique mecanismos celulares cruciales detrás del proceso de toma de decisión entre supervivencia y apoptosis mediado por cMyc y p53 en células AF.

9. METODOLOGÍA

9.1. Métodos experimentales

9.1.1. CyTOF en líneas celulares *FANCG*^{-/-} tratadas con MMC

Tomando en cuenta los antecedentes directos ya mencionados y los objetivos propuestos, para lograr el primer objetivo, primero se hizo uso de la CyTOF. Esto se llevó a cabo tratando 6, 12 y 48 horas con 10ng/ml de MMC a líneas celulares de linfoblastoides mutantes para el *FANCG* (*FANCG*^{-/-}), y su contraparte corregida con un plásmido con el gen faltante (*FANCG*^{+/+}). Una vez terminado el tratamiento, ambas líneas celulares fueron incubadas con anticuerpos, previamente conjugados a metales raros, contra cMyc y p53. Finalmente, las muestras fueron analizadas con un citómetro de masas (Helios, Fluidigm) donde se cuantificaron las señales de cada anticuerpo a una resolución unicelular, obteniendo archivos tipo “.fcs”.

9.1.2. t-CyCIF en muestras de tumores de células escamosas de pacientes con AF

Para alcanzar el segundo objetivo, se realizó una t-CyCIF en tumores sólidos de pacientes con AF (**Figura 9A**), la cual constó de 7 ciclos y en donde se utilizó un panel de 20 anticuerpos de caracterización inmune y tumoral, entre ellos cMyc y p53 (**Figura 9B**). Ésta fue hecha en biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) de tumores de células escamosas de hipofaringe, cavidad oral y lengua de pacientes con anemia de Fanconi (**Figura 9A**) en colaboración con el Departamento de Citopatología, de la Universidad Heinrich Heine, Düsseldorf, Alemania.

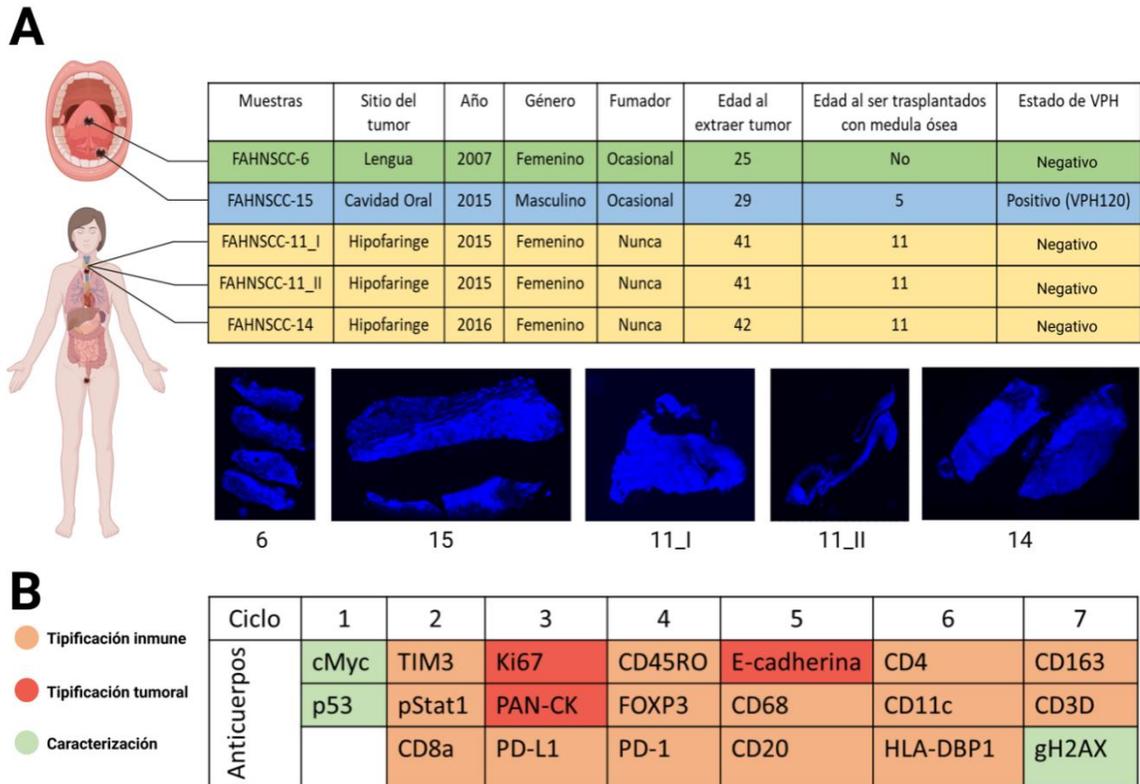


Figura 9. Resumen de muestras de t-CyCIF. (A) Características clínicas de 5 muestras de tumores sólidos de células escamosas de pacientes con AF utilizadas en t-CyCIF (las muestras marcadas con amarillo provienen de la misma paciente). (B) Panel de anticuerpos utilizados en la t-CyCIF. Imagen creada en Biorender.com

La t-CyCIF fue realizada por nuestros colaboradores de la Universidad de Helsinki en Finlandia. Las FFPE fueron sometidas a un preprocesamiento donde se realizó desparafinización, deshidratación y posterior rehidratación. Debido a la modificación que este preprocesamiento puede tener en la estructura de las proteínas blanco, las muestras luego fueron tratadas con un buffer de citratos. Posteriormente las muestras pasaron por una pre-tinción e inactivación de fluoróforos contra marcajes inespecíficos, en donde las muestras no se escanean y sólo se incuban con buffer bloqueador, seguido de anticuerpos secundarios y la primera tinción de ADN con Hoechst. Inactivadas las señales de marcajes inespecíficos, entonces se comienza con el ciclo 0 utilizando de nuevo anticuerpos secundarios y Hoechst. Las muestras entonces se montaron con glicerol al 70% y fueron escaneadas en un microscopio Nikon Ni-E (Nikon). En este caso, únicamente se observó la tinción del ADN, confirmando el bloqueo de la tinción anterior. Al terminar, se realizó un descubrimiento del medio de montaje e inactivación de fluoróforos.

A partir de entonces, las muestras fueron teñidas con los anticuerpos primarios del primer ciclo, seguido de anticuerpos secundarios, Hoescht, para finalmente montarse y escanearse. Este último proceso fue repetido con los siguientes ciclos.

9.2. Métodos bioinformáticos

9.2.1. Preprocesamiento de los datos obtenidos de la CyTOF

A partir del archivo tipo csv, se realizó una transformación logarítmica (\log_{1p}) de los datos para posteriormente eliminar valores atípicos con base en su valor Z. Posteriormente, utilizando la herramienta de tipificación celular del programa SCIMAP (Nirmal *et al.*, 2022), se normalizaron los datos e identificó el punto de corte óptimo con base en una función gaussiana mixta. Hecho esto, las células se clasificaron de acuerdo a su expresión de cMyc y p53, generando cuatro distintos grupos: positiva para cMyc, positiva para p53, doble positivas y doble negativas.

9.2.2. Preprocesamiento de las imágenes obtenidas con t-CyCIF

Previamente a la t-CyCIF, se realizó una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) en las muestras, donde un patólogo certificado delimitó zonas de interés (ROI, por sus siglas en inglés) correspondientes a los tumores: displasia de bajo grado, displasia de alto grado y carcinoma invasivo.

Por otro lado, al escanear las muestras con cada ciclo durante la t-CyCIF, debido a la multidimensionalidad de los marcadores, así como al gran tamaño de las imágenes obtenidas, éstas fueron registradas por el microscopio en secciones discretas o *tiles*. Es por esto que después de escanear cada muestra, los archivos obtenidos fueron ensamblados en imágenes multidimensionales a través del software de alineamiento por armonización simultánea de registros de capas o adyacencias, ASHLAR (por sus siglas en inglés) (Muhlich *et al.*, 2021).

ASHLAR es una herramienta bioinformática que utiliza un software codificado en Python llamado BioFormats (Li *et al.*, 2016); utilizado por múltiples microscopios comerciales de alta resolución. Éste es capaz de ensamblar imágenes multicanal de cualquier microscopio a través de la unión o *stitching* de los *tiles* producidos al escanear las muestras en cuestión. El *stitching* de cada *tile* se hizo a través del reconocimiento y registro de regiones de solapamiento entre *tiles*, seguido de una corrección de alineamiento entre dichas regiones. Finalmente, todas las imágenes, una por cada marcador, fueron sobrepuestas de acuerdo con una ubicación relativa, previamente registrada por el microscopio al momento de escanear, de algún marcador en específico, en este caso la tinción del núcleo con Hoescht, como es recomendado. Al momento de solaparse, el programa hizo ajustes respecto a la ubicación entre cada imagen que se alineó, con el objetivo de obtener la mayor coincidencia posible entre imágenes.

Una vez ensambladas, el programa dio como resultado una imagen multidimensional segmentada en *tiles* de tipo piramidal. Este tipo de imagen está compuesta por múltiples muestreos de la misma imagen, cada uno con un tamaño y resolución diferente con el objetivo de solamente cargar en la memoria de la computadora el muestreo con la resolución y tamaño necesarios para visualizar óptimamente la sección de la imagen que se desee, agilizando computacionalmente este proceso.

La visualización de cada imagen se hizo mediante el programa codificado en Python, Napari (Sofroniew *et al.*, 2021). Este programa habilita la visualización, anotación y etiquetado de imágenes multidimensionales a través de una interfaz de gráfica usuario (GUI, por sus siglas en inglés) amigable y ágil. Además, permite la integración de nuevos bloques de código dentro, y por detrás, de la GUI, personalizando el programa con las herramientas que deseen utilizarse dentro del procesamiento y análisis de las imágenes.

Con el objetivo de poder visualizar cada marcador por separado, en conjunto, así como seleccionar regiones de interés para posteriores análisis, se escribió un código que integrará en la GUI de Napari la opción de cargar y guardar los contrastes y colores seleccionados para cada marcador, así como las secciones delimitadas dentro de cada imagen.

Posteriormente, se hizo uso del software StarDist (Schmidt *et al.*, 2018), el cuál detecta, distingue y asigna un identificador o máscara a los núcleos de cada célula, y un radio alrededor del mismo, a través de un modelo de inteligencia artificial previamente entrenado. Este fue utilizado dentro de un script codificado en Python con el que se logró la segmentación de cada imagen de acuerdo a sus núcleos, generando una nueva imagen compuesta por las máscaras de cada núcleo, su identificador y su posición dentro de la imagen multidimensional.

Con base en la imagen segmentada y la imagen multidimensional como datos de entrada, se utilizó un script codificado en Python, en donde, se cuantificaron las intensidades fluorescentes de cada marcador por célula segmentada. Éstos se obtuvieron en la forma de un archivo tipo csv, en donde la primera columna, llamada CellID, contiene el identificador de cada célula, mientras que las demás corresponden a cada uno de los marcadores utilizados en la tinción, con su valor correspondiente. De igual manera los archivos contienen información sobre características morfológicas y técnicas de las células; su área, posición en la imagen (eje X y Y), así como la excentricidad de la misma (desviación de una forma circular, siendo 0 una circunferencia y 1 la desviación máxima).

9.2.3. Procesamiento y control de calidad de los datos e imágenes obtenidos con t-CyCIF

Primeramente, se ajustaron los contrastes y colores para cada una de las imágenes utilizando el programa Napari, permitiendo inspeccionarlas visualmente para detectar pérdidas de tejido en algún ciclo o desfase entre canales, así como para obtener todas las capturas mostradas en los resultados. Así, con base en la máscara de segmentación y la imagen de la muestra, se seleccionaron regiones correspondientes a las ROI previamente delimitadas por el patólogo en las tinciones de H&E. A partir de dichas regiones se extrajo un archivo de tipo csv con los identificadores de cada una de las células presentes, mismo que fue utilizado para etiquetar, con el nombre de la ROI en cuestión, esas mismas células en el archivo de cuantificación. Como control de calidad de los datos de la cuantificación, primero se utilizó una herramienta de CyCIFsuite (Wang, 2019) para detectar células que se hayan perdido entre cada ciclo de tinción utilizando la expresión diferencial de Hoechst entre cada ciclo como discriminador. Por último, se realizó una transformación logarítmica (\log_{1p}) para posteriormente eliminar valores atípicos con base en el valor Z de los datos.

9.2.4. Identificación de tipos celulares en imágenes obtenidas con t-CyCIF

Posterior al procesamiento de los datos, se realizó un análisis para identificar los tipos celulares dentro de las muestras con base en la expresión de los distintos marcadores. Éste se hizo a través de la misma herramienta de SCIMAP utilizada en los datos de la CyTOF, sólo que en este caso se identificaron células inmunes, no inmunes y tumorales a partir de una clave dicotómica de decisión de acuerdo con la combinación de marcadores en la **Figura 9B**. Adicionalmente, se clasificaron las células tumorales en positivas y negativas para el marcador Ki67.

El diagrama de flujo del trabajo general los datos de la CyTOF y t-CyCIF puede observarse en la **Figura 10** y la colección de todos los scripts generados se encuentran en el repositorio siguiente: <https://github.com/BMF-CP-Lab/t-CyCIF>

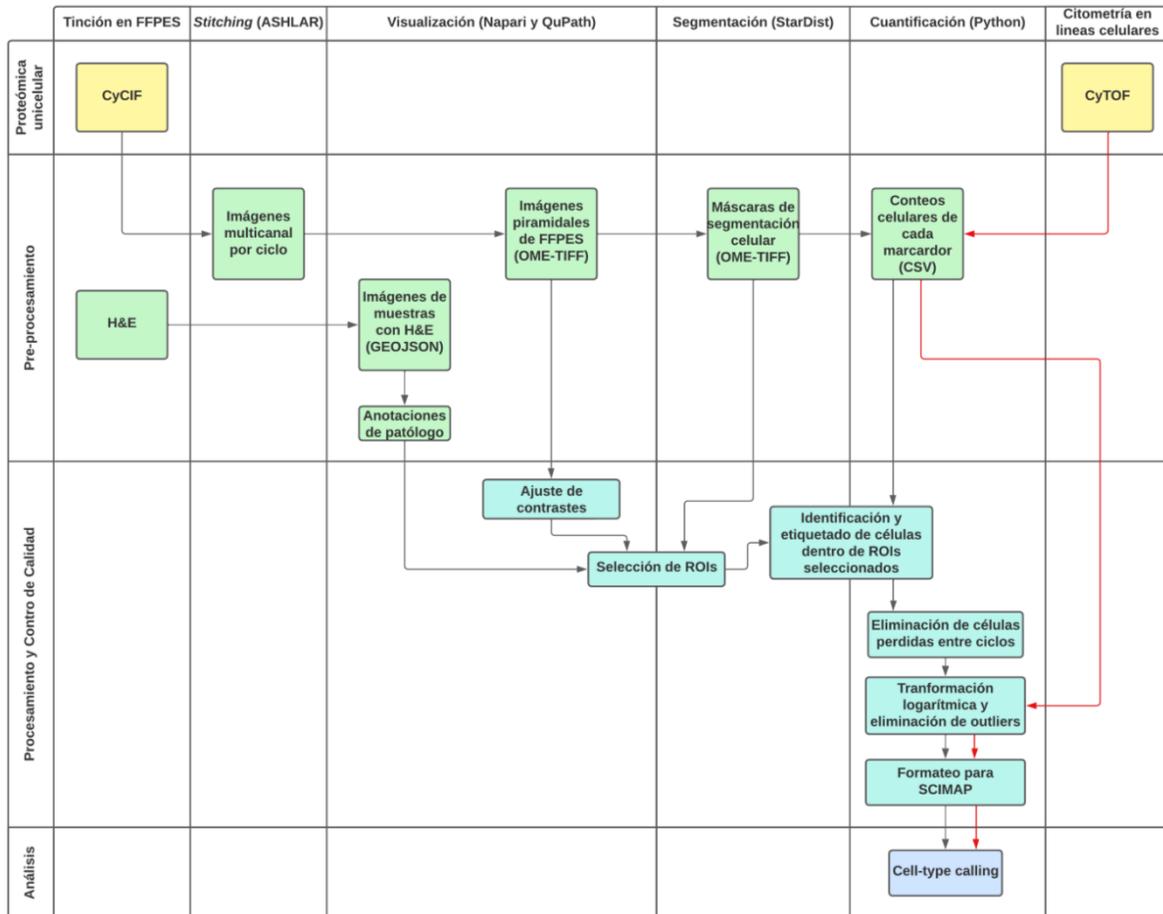


Figura 10. Diagrama de flujo de CyTOF y t-CyCIF. Las imágenes de t-CyCIF pasaron por un pre-procesamiento donde fueron ensambladas a través de ASHLAR, inspeccionadas junto con sus tinciones de H&E a través de Napari y QuPath (respectivamente), segmentadas con StarDist y cuantificadas con un script de Python. Posteriormente se procesaron las imágenes al ajustar sus contrastes (Napari), seleccionar las ROI (Napari), etiquetar las células dentro de las ROI en el archivo de cuantificación (Python) y eliminar células perdidas entre ciclos (CyCIFsuite). El procesamiento y control de calidad de los datos de t-CyCIF y CyTOF constaron en una transformación logarítmica, eliminación de outliers y formateo para el programa SCIMAP (Python). Finalmente, el análisis de los datos constó en una identificación de tipos celulares con SCIMAP de acuerdo con la expresión de marcadores en ambas metodologías. (Imagen creada en Lucidchart.com)

9.3. Modelo matemático

Finalmente, el tercer objetivo se alcanzó al construir un modelo matemático de tipo Booleano con base en una revisión bibliográfica de la regulación existente entre, y alrededor de, cMyc y p53, además de reguladores inferidos con base en datos de secuenciación de RNA.

9.3.1. **Reconstrucción de la red regulatoria detrás de la toma de decisión del destino celular frente a daño en el ADN a través de una revisión bibliográfica**

Inicialmente, siguiendo una aproximación de tipo *bottom-up*, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva de la regulación alrededor de cMyc y p53 al momento de generarse daño en el ADN de la célula; específicamente referenciando los procesos de la DDR, apoptosis, arresto del ciclo celular, *CHKREC* y la proliferación mediada por cMyc. De igual manera se consultaron modelos matemáticos previos relacionados con cualquiera de los procesos ya mencionados (Rodríguez *et al.*, 2019;).

Con base en lo anterior, se seleccionaron reguladores o procesos referenciados (**Tabla 1 y Tabla Suplementaria 1**) cuya relación entre ellos, y con cMyc y p53, fuera particularmente importante, generando así un esquema de regulación representativo de los diferentes destinos y procesos celulares posibles que ocurren cuando una célula se enfrenta a daño en el ADN (**Figura 11**).

Tabla 1. Lista de reguladores y procesos integrados en el modelo booleano. (De izquierda a derecha) Primero el elemento integrado dentro de la red de regulación planteada, luego el nombre del nodo que lo representa y finalmente su función dentro del modelo. En rojo los nodos involucrados en la apoptosis de la célula, en verde la proliferación, y en amarillo el arresto del ciclo celular.

Proceso o regulador	Nombre del nodo	Función en modelo
Enlace covalente cruzado	ICL	Daño en el ADN
Cinasas ATR y ATM	ATM_ATR	Reconocimiento y señalización de daño en el ADN
Histona H2AX fosforilada	gH2AX	Señalización de daño en el ADN
Vía de reparación FA/BRCA	via_FA_BRCA	Reparación de ICLs por la vía FA/BRCA
Cinasas Chk1 y Chk2	Chk1_2	Checkpoint G ₂ /M, activación p53
Factor de transcripción p53	p53	Transcripción genes pro-apoptosis y arresto, inhibición cMyc
Inhibidor de cinasas dependientes de ciclina p21	p21	Checkpoint G ₂ /M y arresto
Fosfatasa Wip1	Wip1	Checkpoint recovery, inhibición proteínas DDR
Ubiquitin ligasa Mdm2	Mdm2	Inhibición p53
Factor de transcripción cMyc	cMyc	Transcripción de genes de proliferación e inhibición de arresto y apoptosis
Receptor activo TNF- α	TNF α	Respuesta inflamatoria, activación NF κ B
Factor de transcripción NF-kappa B	NF κ B	Señalización TNF α , activación cMyc y Wip1
Receptor activo TGF- β	TGF β	Respuesta inflamatoria, activación Smads
Proteínas transductores de señales Smad2 y Smad3	Smad2_3	Señalización TGF β , activación p53 e inhibición cMyc
Proteína ribosomal con actividad ubiquitin ligasa RL40p	RL40p	Inhibición Mdm2 y activación p53
Genes anti-apoptóticos (BCL-2)	ANTI_ap	Inhibición apoptosis
Proteína chaperona HJURP	HJURP	Activación cMyc e inhibición arresto
Genes pro-apoptóticos (BH3)	PRO_ap	Iniciación apoptosis
Caspasa 3	Casp3	Culminación apoptosis
Complejo CiclinaB/Cdk1	CycB/Cdk1	Progresión del ciclo celular

En el modelo generado se representa lo que ocurre una vez que se produce un ICL en la célula. Primeramente, es crucial que éste sea detectado por las cinasas ATM/ATR, misma que se encargará de fosforilar, y con ello activar o inhibir, sustratos involucrados en la DDR; entre los blancos que activa se encuentra la variante de histona H2AX (gH2AX al ser fosforilada), las cinasas Chk1 y Chk2, así como a p53 (Shiloh y Ziv, 2013), mientras que ATM también fosforila a la ubiquitina ligasa de p53, Mdm2, inactivándola (Nakamura, 1998). Una vez activada, gH2AX funcionará como señalizador e intermediario para el reclutamiento de las proteínas encargadas de la reparación para finalmente procesar y reparar el ICL por la vía FA/BRCA (Lyakhovich y Surrallés, 2007). Por otro lado, la fosforilación de Chk1/Chk2, Mdm2 y p53 llevan a la activación de ésta última, la cual desencadenará los procesos de arresto del ciclo celular, al promover la transcripción de p21 (He *et al.*, 2005) el cual inhibe al complejo CyclinaB/Cdk1; la apoptosis, promoviendo la transcripción de genes pro-apoptóticos y culminando con la activación de la caspasa 3 (Shen y White, 2001); y su propia regulación negativa, al promover la transcripción de genes anti-apoptóticos como *BCL-2*, inhibiendo la apoptosis (Ladokhin, 2020). Sin embargo, también se ha descrito que p53 promueve la transcripción de dos de sus propios inhibidores, Mdm2 (Nag *et al.*, 2013) y Wip1 (Sakai *et al.*, 2014 y Fiscella *et al.*, 1997), generando así un asa de retroalimentación negativa. Wip1 es el que lleva a cabo el CHKREC, promoviendo el progreso del ciclo celular, y con ello la proliferación, al inactivar, desfosforilando, múltiples blancos involucrados en la DDR y el arresto del ciclo celular como ATM/ATR, gH2AX (Cha *et al.*, 2010), Chk1/Chk2 y p53 (Macurek *et al.*, 2013); así como activar a Mdm2 (Lu *et al.*, 2007), inhibiendo aún más a p53.

Adicionalmente, se integró dentro del modelo la señalización incidente de citocinas proinflamatorias en la célula con base en lo reportado por Rodríguez *et al.* (2021), siendo representadas por la activación de sus receptores, TNF- α y TGF β .

El receptor de TNF- α , una vez unido a su ligando, promueve la activación del factor de transcripción NF-kappa B (Liu *et al.*, 2017), éste promueve la transcripción de Wip1, el que paralelamente inhibe a NF-kappa B al impedir su interacción con proteínas activadoras (Shen *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ha descrito que NF-kappa B es capaz de inducir la transcripción del factor de transcripción cMyc (Klapproth *et al.*, 2009). Alternamente, TGF β , al activarse, comenzará una cascada de señalización a través de las proteínas Smad. Donde, Smad2 y Smad3, al asociarse con Smad4, promoverán por un lado la transcripción de su propio inhibidor, Smad7 (Lan y Chung, 2011), regulando así la respuesta inflamatoria, mientras que por otro la inhibición de cMyc (Yagi *et al.*, 2001).

Finalmente, se ha descrito que cMyc, como el potente oncogén que es, está involucrado en evitar la transcripción de p21 y promover la progresión del ciclo celular, además de promover la transcripción de genes involucrados en la respuesta antiapoptótica (Yoshida, 2018). También se ha registrado que Mdm2 es reprimido transcripcionalmente por cMyc (Faruq *et al.*, 2022).

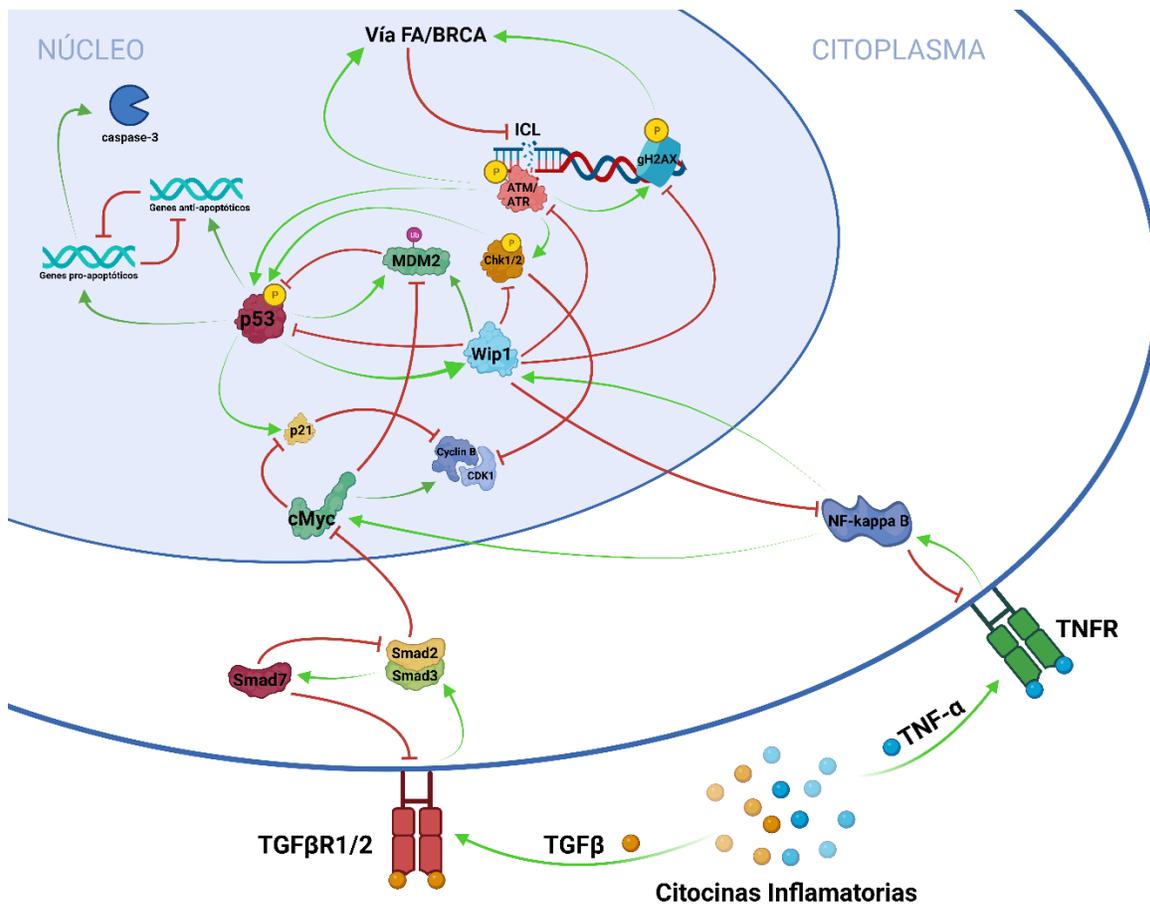


Figura 11. Resumen gráfico de regulación detrás de decisión del destino celular. Al ocurrir el daño en el ADN, la señalización de este por ATM/ATR a través de Chk1/2, p53 y gH2AX activará la vía FA/BRCA para que este sea reparado. Paralelamente p21 y Chk1/2 causaran un arresto del ciclo celular al inhibir al complejo Ciclina B/Cdk1, mismo que, al repararse el daño, será revertido por la proteína del *checkpoint recovery* Wip1 al inhibir blancos del DDR. De no repararse el daño, p53 iniciará la apoptosis al promover la transcripción de genes pro-apoptóticos, culminando en la activación de la Caspasa 3, así como su propia regulación promoviendo la transcripción de genes anti-apoptóticos, Mdm2 y Wip1. Alternamente, cMyc promoverá la división celular aberrante al activar, a pesar del daño, al complejo Ciclina B/Cdk1 e inhibir a p21 y la transcripción de genes pro-apoptóticos. Finalmente, la activación de los receptores de TNF-α y TGFβ hará que, a través de sus transductores de señal Smad2/3 y NF-kappa B, inhiban a cMyc y activen a Wip1, respectivamente. (Imagen creada en Biorender.com)

9.3.2. Inferencia e integración de reguladores adicionales a través de datos de secuenciación unicelular de ARN

Siguiendo una aproximación de tipo *top-down*, se hizo un análisis de correlación de expresión génica en colaboración con el Dr. Hugo Tovar y la Dra. Laura Gómez (INMEGEN) a partir de los perfiles transcripcionales de la secuenciación de ARN en HSPC hecha por Rodríguez *et al.* (2021). En ella, se segmentaron las células en grupos, con un mínimo de 20 unidades, con base en la expresión de *MYC* y *TP53*, individualmente. Posteriormente, utilizando la paquetería Corto de R, se generaron redes de regulación genética (correlación de Spearman),

obteniendo así una red por cada agrupación de células para *MYC* y *TP53*. Finalmente, se utilizó iRegulon (versión de Cytoscape) para filtrar aquellas interacciones de las redes generadas que estuvieran respaldadas por sitios de unión de los dos factores de transcripción. Dicho filtrado generó una lista de alrededor de 200 genes con sitios de unión para *MYC* o *TP53* y cuya expresión mostró correlación con alguno de los mismos.

Una vez obtenida la lista de genes correlacionados, se hizo una revisión bibliográfica exhaustiva de cada uno de ellos y su relación el esquema de regulación previamente descrito. Con base en su relevancia dentro del proceso de toma de decisiones frente a ICL, la cantidad de información disponible, y que tan estrechas fueran sus funciones e interacciones con los demás reguladores, se seleccionaron e integraron dentro de la red de regulación previamente establecida los productos proteicos de los genes *UBA52* y *HJURP*; siendo RL40p y HJURP, respectivamente.

HJURP es una proteína chaperona de histona comúnmente conocida por la deposición centromérica de la histona CENP-A, promoviendo la segregación cromosómica y mitosis (Wei *et al.*, 2019). Alternamente, se ha reportado la regulación positiva de cMyc sobre HJURP y la función que este último tiene en la inhibición funcional de p21 a través de su traslocación del núcleo al citoplasma (Chen *et al.*, 2018).

Por otro lado, *UBA52* es un gen híbrido compuesto por una ubiquitina y una subunidad 60S RL40p involucrada en la biogénesis ribosomal (Wang *et al.*, 2019) y que ha sido identificado como un gen desregulado en mielomas múltiples (Saadoune *et al.*, 2022) y esclerosis múltiple (Salehi *et al.*, 2021). Sin embargo, se ha descrito que RL40p es capaz de unirse a Mdm2, inhibiendo su función, así como promover su degradación por ubiquitinación, incrementando los niveles de p53 (Zhou *et al.*, 2019).

9.3.3. Construcción de la red regulatoria y sus funciones lógicas

Una vez resumido el esquema de regulación, éste fue simplificado a una red representativa con solamente los nodos de las diferentes proteínas y procesos involucrados, así como sus interacciones tanto positivas y negativas (**Figura 12**). Adicionalmente, se agregaron interacciones que, bien si no estaban explícitamente reportadas o confirmadas como una interacción factual, fueron inferidas a partir de información bibliográfica sugestiva de su existencia.

La red resultante constó de 20 nodos (**Tabla 1**), en donde se resumieron 69 interacciones; 39 positivas y 30 negativas. Dentro de todas las interacciones, 50 de ellas estaban previamente reportadas y 19 fueron inferidas (**Figura 12**).

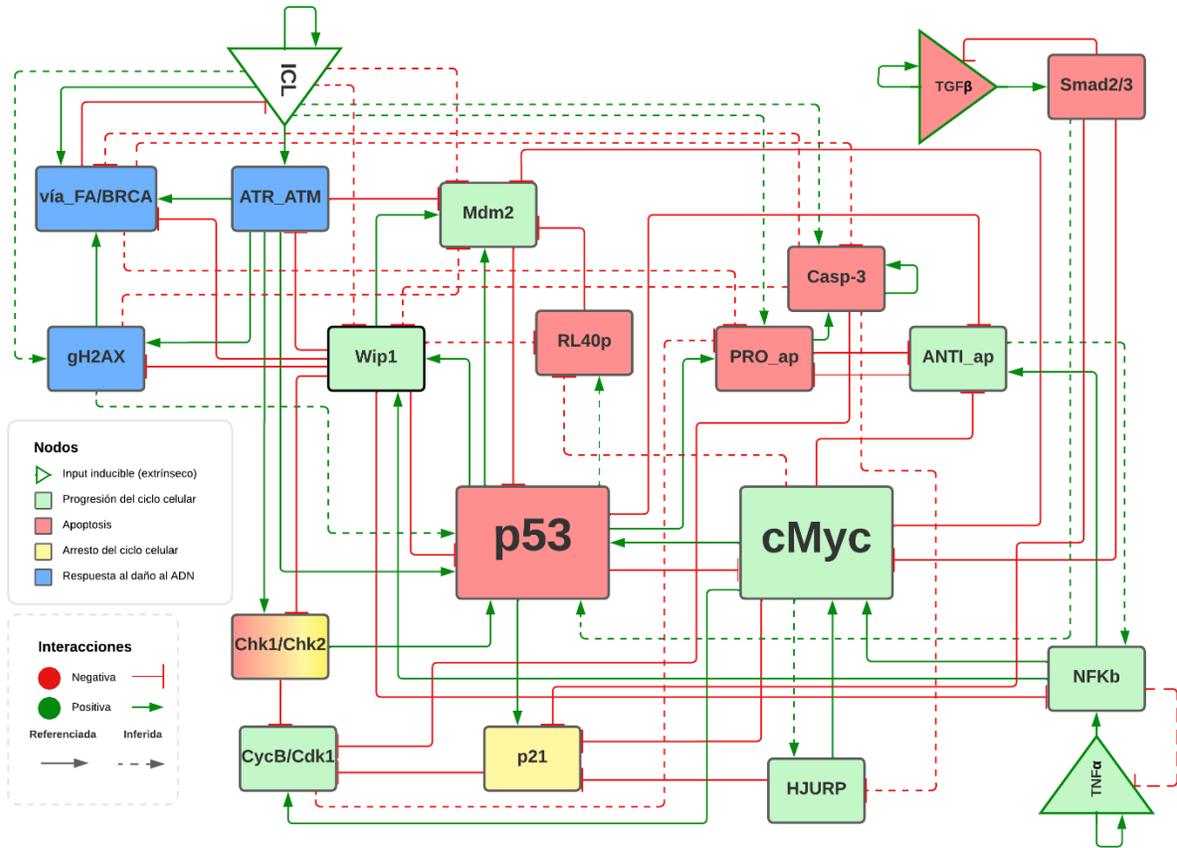


Figura 12. La red de regulación de la decisión del destino celular AF mediada por cMyc y p53. Representación gráfica de los nodos integrados en el modelo booleano con sus respectivas interacciones (inferidas, líneas punteadas; referenciadas, líneas continuas; positivas, verdes; y negativas, rojas). Se muestra el código de colores de los nodos mostrado en la figura, así como la simbología para los nodos de entrada al sistema (*inputs*). (Imagen creada en Lucidchart.com)

A partir de la red generada, todas las interacciones entre los nodos fueron descritas a partir de funciones lógicas con operadores tipo AND (y), OR (|) y NOT (!), denotando las condiciones para la activación e inactivación de los nodos del sistema (**Tabla 2**). La descripción detallada de la elección de cada regla lógica, así como las referencias que la sustentan se encuentra en la **Tabla Suplementaria 1**.

Tabla 2. Nodos y sus respectivas funciones o reglas booleanas de activación. Lista de cada uno de los nodos dentro del modelo booleano y sus respectivas funciones o reglas booleanas representativas de las interacciones previamente descritas. En rojo los nodos involucrados en la apoptosis de la célula, en verde la proliferación, y en amarillo el arresto del ciclo celular.

Nodo	Regla lógica
ICL	ICL & !via_FA/BRCA
ATM_ATR	ICL & !Wip1
gH2AX	(ATR/ATM ICL) & !Wip1
via_FA_BRCA	(gH2AX ATR/ATM) & !(Wip1 Casp3)
Chk1_2	ATR/ATM & !Wip1
p53	(Chk1_2 ATR/ATM Smad2/3 cMyc) & !(Mdm2 Wip1)
p21	(p53 Smad2/3) & !(HJURP cMyc)
Wip1	((p53 & !ICL) NFkB) & !Casp3
Mdm2	(Wip1 p53 !ICL) & !(ATR/ATM RL40p cMyc gH2AX)
cMyc	(NFkB HJURP) & !(p53 Smad2/3)
TNFa	TNFa & !NFkB
NFkB	(TNFa ANTI_ap) & !Wip1
TGFb	TGFb & !Smad2/3
Smad2_3	TGFb
RL40p	p53 & !cMyc
ANTI_ap	NFkB & !(p53 cMyc ANTI_ap)
HJURP	cMyc & !Casp3
PRO_ap	p53 & !(ANTI_ap CycB/Cdk1 via_FA/BRCA)
Casp3	((PRO_ap & ICL) Casp3) & !via_FA/BRCA
CycB/Cdk1	(cMyc !(Chk1/2 p21)) & !Casp3

9.3.4. Análisis del modelo

Todos los análisis siguientes se hicieron dentro de dos redes a partir del modelo base previamente descrito. La primera, la cual llamaré proficiente en la reparación (PR), representa una célula sana capaz de reparar un ICL por la vía FA/BRCA, por lo que consta del modelo base sin modificaciones. Por otro lado, partiendo de la misma red, se inactivó al nodo de la vía FA/BRCA con el objetivo de simular una célula con anemia de Fanconi (AF); es decir, una incapaz de reparar el ICL.

Como primer análisis, a través de la paquetería BoolNet (Muessel *et al.*, 2010) de R, se realizó un análisis de trayectoria, partiendo de un estado inicial donde se activaron los nodos del ICL, simulando la incidencia de este, y Mdm2, buscando representar una célula cuya regulación de p53 se encuentra en un contexto previo a estrés celular.

Posteriormente, se hizo un análisis, con la función “getAttractors” de BoolNet, donde se simularon todos los estados iniciales posibles (2^n) con el fin de encontrar las cuencas de atracción existentes dentro del modelo generado, así como su tamaño. Esto se hizo fijando el nodo del ICL a un valor de 1, con el objetivo de eliminar todos aquellos atractores cuyos estados iniciales partieran de contextos donde no existiera daño.

Finalmente, se realizó lo mismo para el análisis de redes alteradas o “mutantes”, en donde se alteró el estado de activación de nodos específicos para que permanecieran constitutivamente activos (1) o inactivos (0).

9.4. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos fueron hechos en el software de GraphPad Prism 7.0 (www.graphpad.com) y constaron de una prueba de t (no paramétrica) para comparaciones simples y una prueba Sidak para comparaciones múltiples, donde los valores de significancia corresponden a valores P de 0.0332 (*), 0.0021 (**), 0.0002 (***) y <0.0001 (****).

10. RESULTADOS

10.1. La decisión entre la expresión de cMyc o p53 en células AF en respuesta al daño ocurre a través del tiempo

En la CyTOF observamos que, a pesar de no ser tratadas con MMC, en ambas líneas celulares (*FANCG*^{+/+} y *FANCG*^{-/-}) existía una alta proporción de células positivas para la expresión proteica tanto de p53 como de cMyc (**Figura 13A y 13B**). Sin embargo, una vez tratadas las células y conforme aumentó el tiempo de tratamiento, lo primero que puede observarse es que en las células *FANCG*^{+/+} no se presentó un cambio significativo en la proporción de células doble positivas, sino hasta ser tratadas con MMC por 12 y 48 horas, donde ocurrió un aumento en el porcentaje de células positivas para p53 (**Figura 13B**). En el caso de las células *FANCG*^{-/-} puede observarse como desde las 6 horas de tratamiento hubo un aumento significativo en la proporción de células positivas para cMyc, luego una disminución relativa a las 12 horas, para finalmente tener un aumento a las 48 horas. En el caso de células positivas para p53, destaca que el mayor aumento ocurrió a las 12 horas, seguido de una disminución a las 48 horas, coincidiendo con la disminución y aumento vistos en células positivas para cMyc (**Figura 13B**).

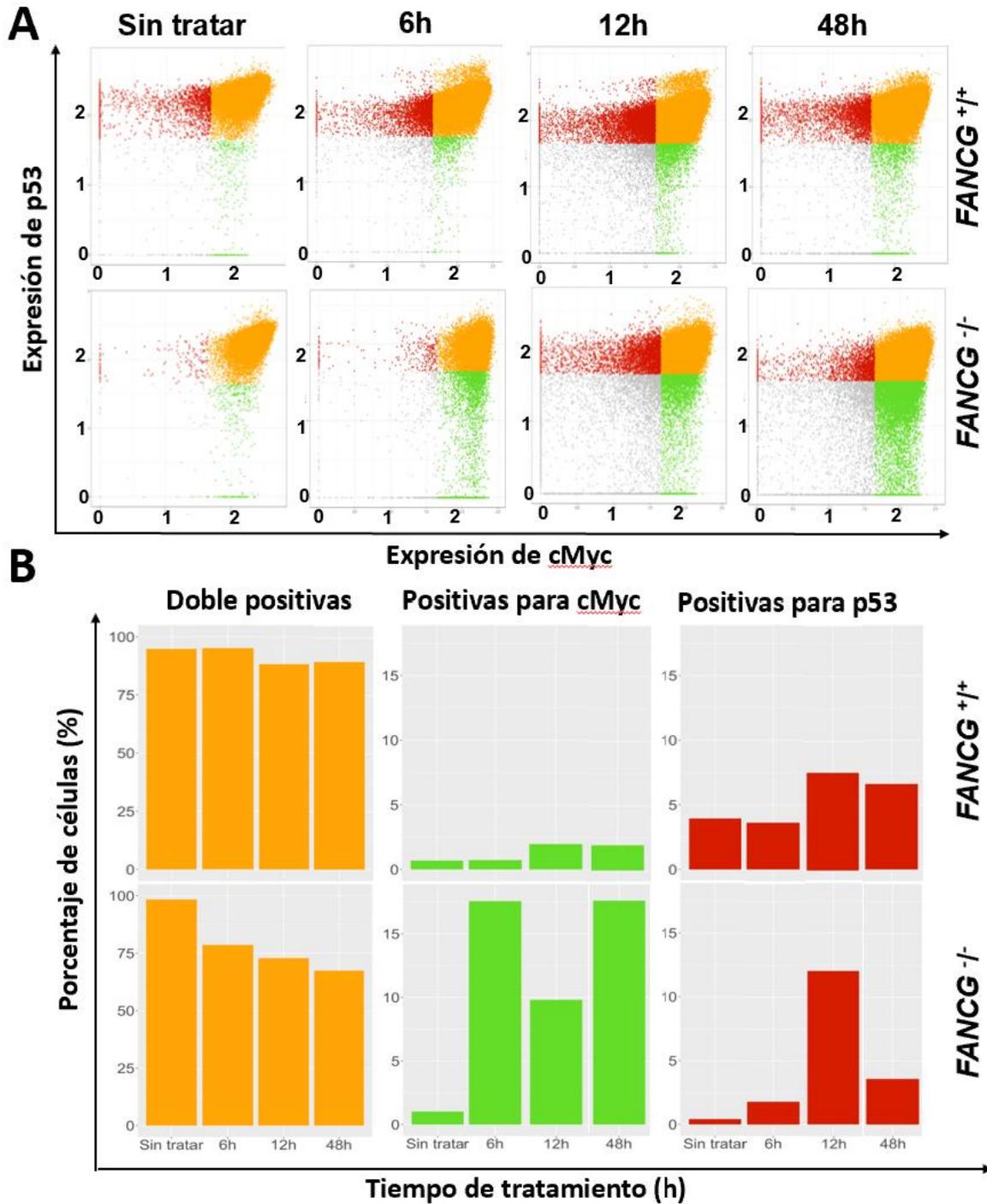


Figura 13. Dinámica de expresión de cMyc y p53 en HSPC tratadas con MMC a diferentes tiempos. (A) Niveles de expresión de cMyc y p53 por célula, en líneas celulares linfoblásticas *FANCG^{+/+}* y *FANCG^{-/-}* de acuerdo con distintos tiempos de tratamiento con MMC. (B) Porcentajes de células, cMyc positivas, p53 positivas y doble positivas en líneas celulares *FANCG^{+/+}* y *FANCG^{-/-}* de acuerdo a distintos tiempos de tratamiento con MMC.

10.2. Los perfiles de expresión proteica y composición celular de las muestras están estrechamente relacionados con el paciente y el tipo celular

Una vez compuestas las imágenes multidimensionales de t-CyCIF, éstas fueron inspeccionadas visualmente a través de Napari, en conjunto con las imágenes de las tinciones con H&E en QuPath (Bankhead *et al.*, 2017) (**Figura 14A**), para evaluar superficialmente como se encontraba la expresión de ciertas combinaciones de marcadores (**Figura 14B**, derecha). En el caso de cMyc y p53 logró observarse que la mayoría de las zonas donde había señal de cMyc correspondían a poca señal de p53 (**Figura 14C**).

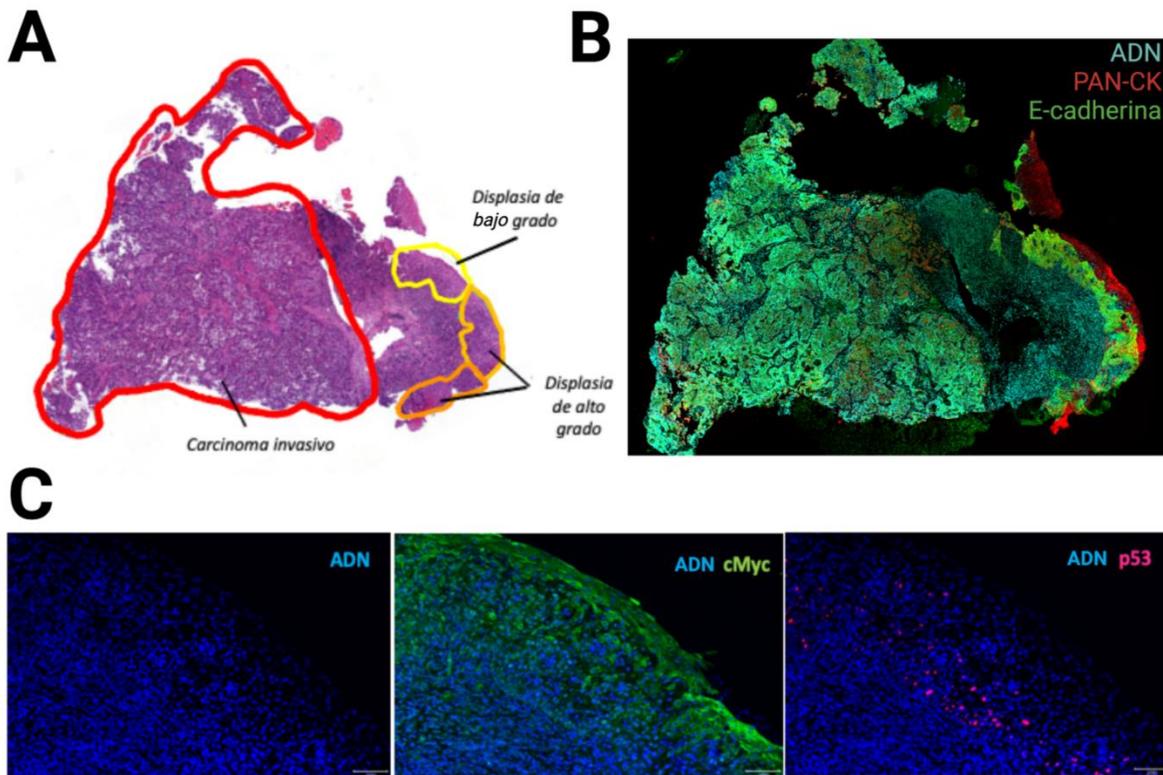


Figura 14 Ejemplo de tinción de una muestra con H&E y después de t-CyCIF, mostrando combinaciones de marcadores específicos. (A) Imagen de tinción con H&E en muestra FAHNSCC-11_I con regiones delimitadas por patólogo (Displasia de bajo grado, Displasia de alto grado y Carcinoma invasivo). (B) Imagen de la misma muestra, pero una vez hecha la t-CyCIF, se muestran los marcadores de ADN (azul), PAN-CK (rojo) y E-cadherina (verde). (C) Acercamiento a la muestra FAHNSCC-11_I mostrando los marcadores de ADN (azul) por sí solo, con cMyc (verde) y con p53 (rojo).

Para hacer un análisis más objetivo de las muestras, se utilizaron los datos cuantificados, previamente procesados, y se agruparon, de acuerdo a la expresión de los diferentes marcadores por célula utilizando el método de *k-nearest neighborhoods* ($k = 10$). Posteriormente, estos fueron graficados por la técnica de proyección y aproximación de variedad uniforme para reducción de dimensiones (UMAP, por sus siglas en inglés) usando la paquetería Scanpy (Wolf *et al.*, 2018) de Python.

Cada UMAP fue coloreado según la muestra (**Figura 15A**), sitio del tumor (**Figura 15B**), las ROI delimitadas por el patólogo (**Figura 15C**) los tipos celulares (**Figura 15D**) y la expresión normalizada de cMyc y p53 (**Figura 15E y 15F**, respectivamente).

Al observar los UMAP generados fue evidente como existe una agrupación en clusters o grupos de células de acuerdo al paciente del cual se obtuvo la muestra (**Figura 15A**). Para el caso de las muestras de la misma paciente (**Figura 9A y 15A**, FAHNSCC-14, FAHNSCC-11_I y FAHNSCC-11_II) pudo observarse como se agruparon en proximidad las obtenidas en el mismo año (**Figura 9A y 15A**, FAHNSCC-11_I y FAHNSCC-11_II) a diferencia de la restante obtenida al año siguiente. En cuanto a las ROI existe una mayor cantidad de células provenientes de la región denominada “carcinoma invasivo”, particularmente para la muestra FAHNSCC-14 y FAHNSCC-11_I, mientras que para la muestra FAHNSCC-15 lo fue la región de “displasia de alto grado”, “displasia de bajo grado” para la muestra FAHNSCC-6 y una composición heterogénea de las tres regiones para la muestra FAHNSCC.11_II (**Figura 15C**). En cuanto a la identificación de tipos celulares, al hacer el UMAP, pudo notarse como la mayoría de las células analizadas por cada muestra correspondían a células tumorales, seguidas de algunas células estromales y un grupo de células inmunes claramente formando un grupo por separado (**Figura 15D y 15G**); siendo la muestra FAHNSCC-11_I la que tenía mayor proporción de células inmunes (**Figura 15G**).

Por último, la representación de la expresión normalizada de cMyc y p53 mostró una heterogeneidad en la expresión relativa entre cMyc y p53 de acuerdo con cada muestra (**Figura 15E y 15F**).

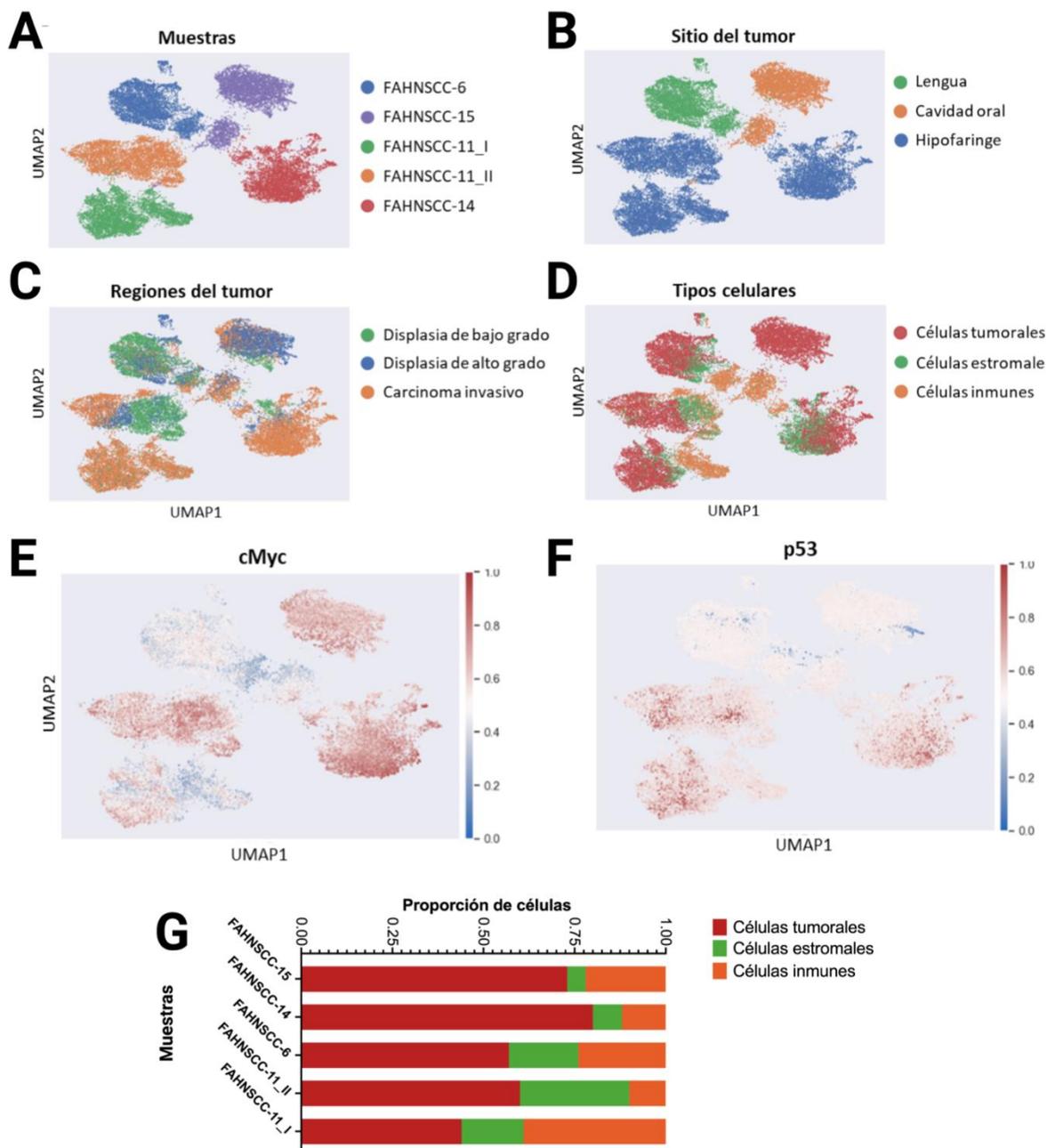


Figura 15. UMAP de muestras mostrando propiedades cualitativas, cuantitativas, composición celular y tumoral. UMAP de los datos generales clasificados por (A) muestra, (B) sitio del tumor, (C) regiones del tumor, (D) tipos celulares, y representación de la expresión normalizada de cMyc (E) y p53 (F). (G) Proporciones de tipos celulares por muestra.

Al analizar la expresión media de las muestras juntas, se encontró una mayor expresión de cMyc respecto a p53 (**Figura 16A**). No obstante, con el objetivo de sólo evaluar la expresión de cMyc y p53 en el tumor, con y sin capacidad proliferativa, y no en las células inmunes y estromales. Se calculó la expresión de cMyc y p53, pero ahora sólo en las células tumorales Ki67 positivas y negativas presentes en cada una de las ROI delimitadas por el patólogo. Se encontró que el aumento en la expresión de cMyc no solo correlaciona con las células positivas para Ki67, sino que también con la progresión del cáncer, siendo esta mayor en el

carcinoma invasivo respecto a las displasias (**Figura 16B**). En el caso de p53, al igual que en la expresión media de todas las muestras (**Figura 16A**), fue mucho menor que la de cMyc, además de que no se presentaron grandes diferencias en la expresión respecto a la región o tipo celular; con la excepción de un aumento significativo para ambos tipos celulares en el carcinoma invasivo (**Figura 16C**).

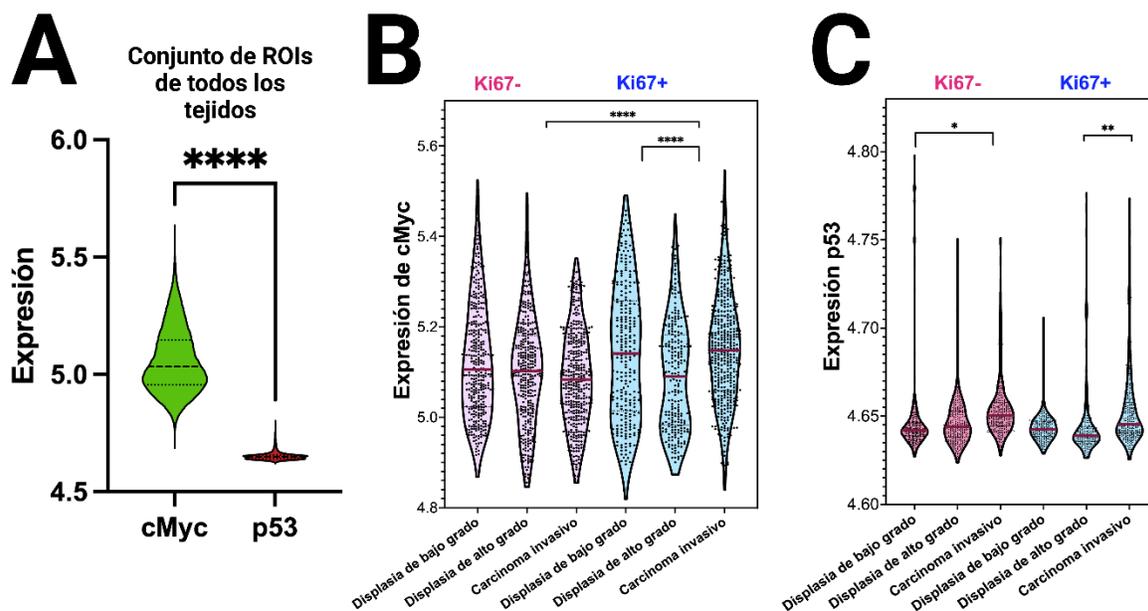


Figura 16. Expresión de cMyc y p53 por región del tumor y tipo celular (Ki67 +/-). (A) Expresión media normalizada de cMyc y p53 del conjunto de ROI de todos los tejidos. Expresión de cMyc (B) y p53 (C) por regiones de progresión del tumor (displasia de bajo grado, displasia de alto grado y carcinoma invasivo) y tipo celular de acuerdo con la expresión del marcador Ki67.

10.3. Modelo Matemático

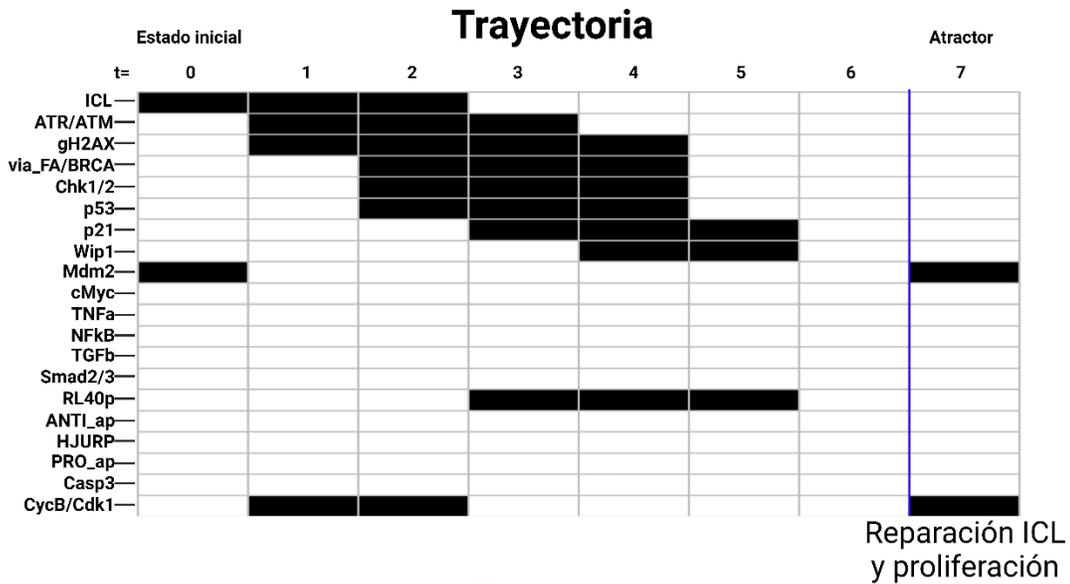
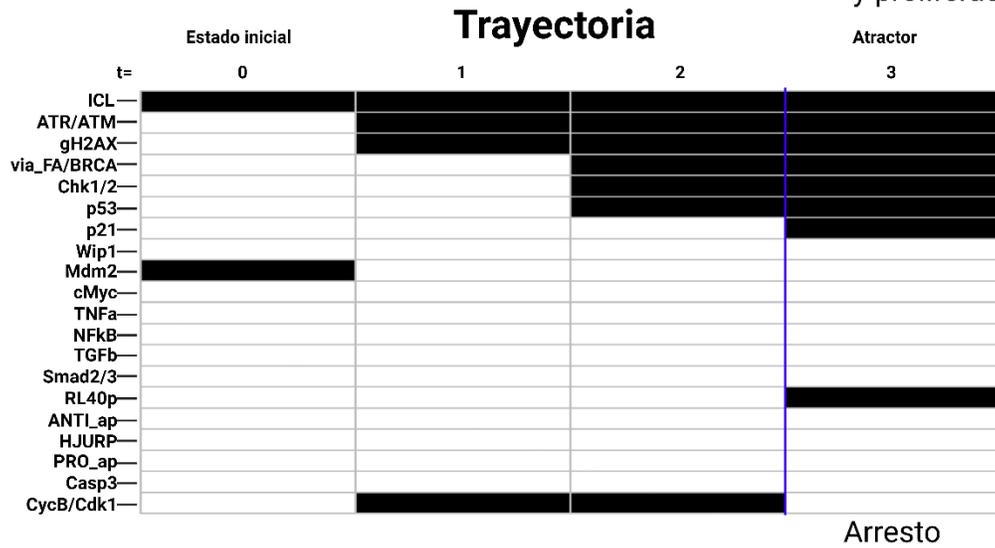
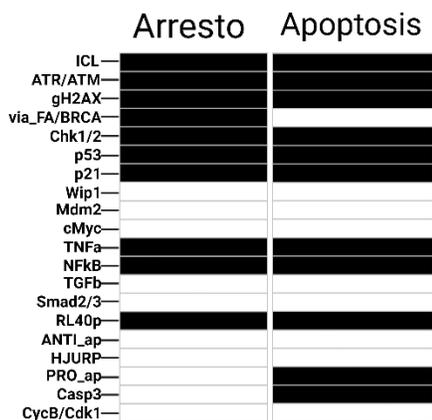
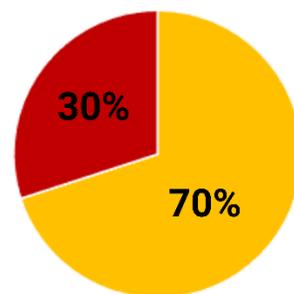
10.3.1. El modelo booleano es capaz de recapitular los procesos celulares que ocurren en una célula normal y de un paciente con AF al enfrentarse a un ICL.

Una vez completada la red regulatoria y definidas las reglas de esta, el análisis de trayectoria de la red representativa de una célula PR (proficiente en la reparación de ICL) mostro como la red es capaz de recapitular durante su trayectoria los procesos celulares involucrados en la reparación de un ICL. Tomando como estado inicial la activación del ICL y Mdm2, ya que dicha proteína está constantemente expresada en células sanas (Hou *et al.*, 2019), en los primeros 2 pasos de tiempo (**Figura 17A** $t = 0$ y 1) se puede notar como ocurre la activación de la cascada de reconocimiento y señalización del ICL por los elementos del DDR: ATR/ATM y gH2AX. Esto causa que al tiempo 2 (**Figura 17A**, $t = 2$), por un lado, se active la vía FA/BRCA, mientras que, por otro, se activen las cinasas Chk1/2. En el tiempo 3, se puede observar como el ICL se inactiva al ser reparado por la vía FA/BRCA al mismo tiempo

que la célula entra en arresto por la inactivación del complejo Ciclina B/Cdk1 (**Figura 17A**, $t = 3$). En los pasos siguientes se activará p53, seguido de sus blancos p21, RL40p y Wip1. Sin embargo, al ya no haber ICL, Wip1 se encargará de inactivar los componentes del DDR y el arresto celular para que finalmente la célula llegue a un atractor donde se reactiva el complejo Ciclina B/Cdk1 y Mdm2, continuando con la progresión del ciclo celular (**Figura 17A**, $t = 4, 5, 6$ y 7).

Adicionalmente se hizo un análisis de trayectoria para la red PR, pero con el ICL constitutivamente activo para observar que ocurría en el evento de un daño constante (**Figura 17A**). En esta, se pudo observar cómo los nodos de la DDR se encendieron, pero no pudieron inactivarse porque el ICL continuaba activo (**Figura 17B**, $t = 0, 1$ y 2), llevando a que se inactivara el complejo Ciclina B/Cdk1 y se llegara a un atractor de arresto del ciclo celular (**Figura 17B**, atractor).

Posteriormente, al hacer la búsqueda exhaustiva de las cuencas de atracción de la red dejando constitutivamente activo al ICL, esto con el fin de evitar cuencas de atracción cuyos estados iniciales no tuvieran el nodo del ICL activo (las cuales no son de interés para este modelo) se obtuvieron únicamente dos cuencas de atracción para la red PR (**Figura 17C**). La primera, en donde convergieron el 70% de los estados iniciales (**Figura 17D**), constando de un atractor puntual donde se encuentran activos los componentes del DDR, la vía FA/BRCA, el *checkpoint*, así como p53 y Wip1, pero con el complejo Ciclina B/Cdk1 inactivo, denotando un arresto en el ciclo celular (**Figura 17C**), el mismo que en el análisis de trayectoria con el ICL constitutivamente encendido (**Figura 17B**). La otra cuenca, con un 30% de los estados iniciales (**Figura 17D**), constó de otro atractor puntual similar, sólo que sin el nodo de la vía FA/BRCA encendido y con los genes pro-apoptóticos y la Caspasa 3 activos, denotando muerte celular por apoptosis (**Figura 17C**).

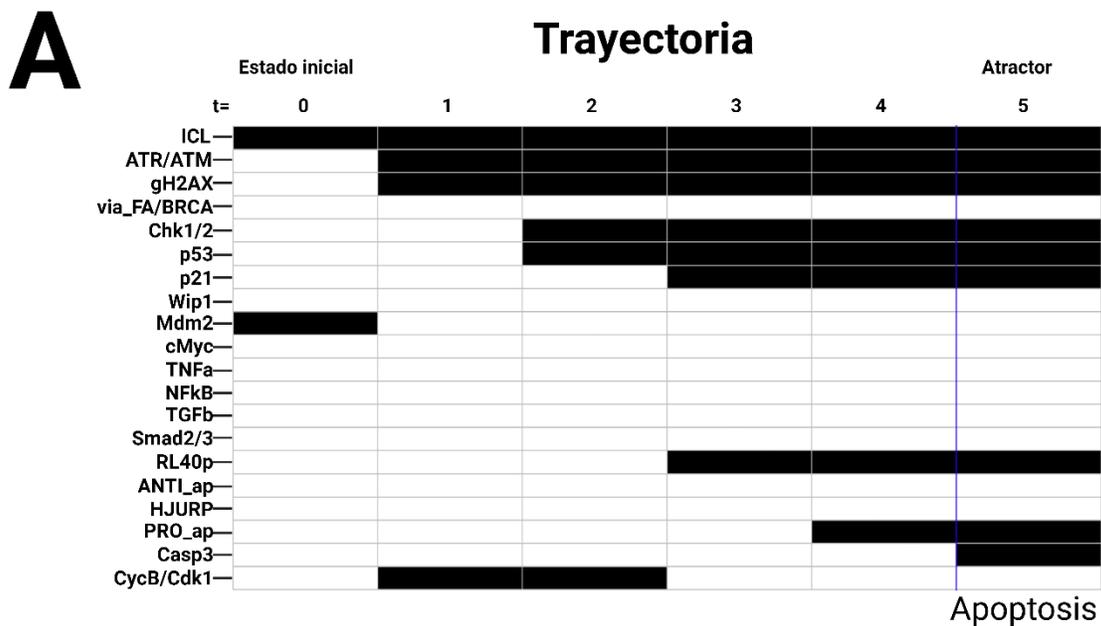
A**B****C****Atractores posibles****D****Tamaño cuencas de atracción**

● Arresto
● Apoptosis

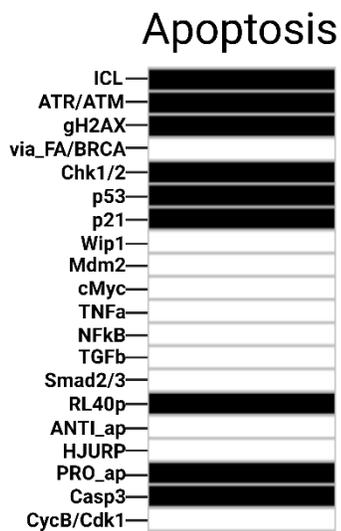
Figura 17. Análisis de red PR, capaz de reparar ICL por vía FA/BRCA. (A) Análisis de trayectoria de la red partiendo de un estado inicial con el ICL y Mdm2 activos. (B) Análisis de trayectoria de la red con el ICL constitutivamente activo, partiendo de un estado inicial con Mdm2 activo. (C) Atractores posibles a partir de búsqueda de cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo y su respectivo tamaño (D).

En el caso de la red AF (deficiente en la reparación de ICL), el análisis de trayectoria a partir del estado inicial con el ICL y Mdm2 activos mostró la misma dinámica que la red PR en los primeros pasos de tiempo (**Figura 17A y Figura 18A**, $t = 0, 1$ y 2). No obstante, ya que la red AF no es capaz de encender el nodo de la vía FA/BRCA, el ICL no es inactivado y Wip1 no inactiva sus blancos (**Figura 18A**, $t = 3$). Por lo que en los pasos siguientes se activa el nodo de los genes pro-apoptosis y la Caspasa 3, siendo este el atractor final; la apoptosis (**Figura 18A**, $t = 4$ y 5).

Este atractor resultó ser el único obtenido en la red AF al hacer la búsqueda de las cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo (**Figura 18B**), teniendo el 100% de los estados iniciales posibles (**Figura 18C**).



B Atractores posibles



C Tamaño cuencas de atracción

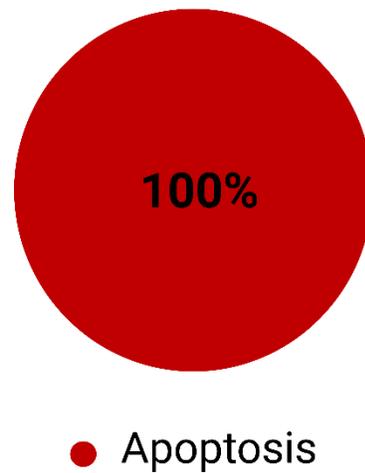


Figura 18. Análisis de red AF, incapaz de reparar ICL por vía FA/BRCA. (A) Análisis de trayectoria de la red partiendo de un estado inicial con el ICL y Mdm2 activos. (B) Atractores posibles a partir de búsqueda de cuencas de atracción y su respectivo tamaño (C).

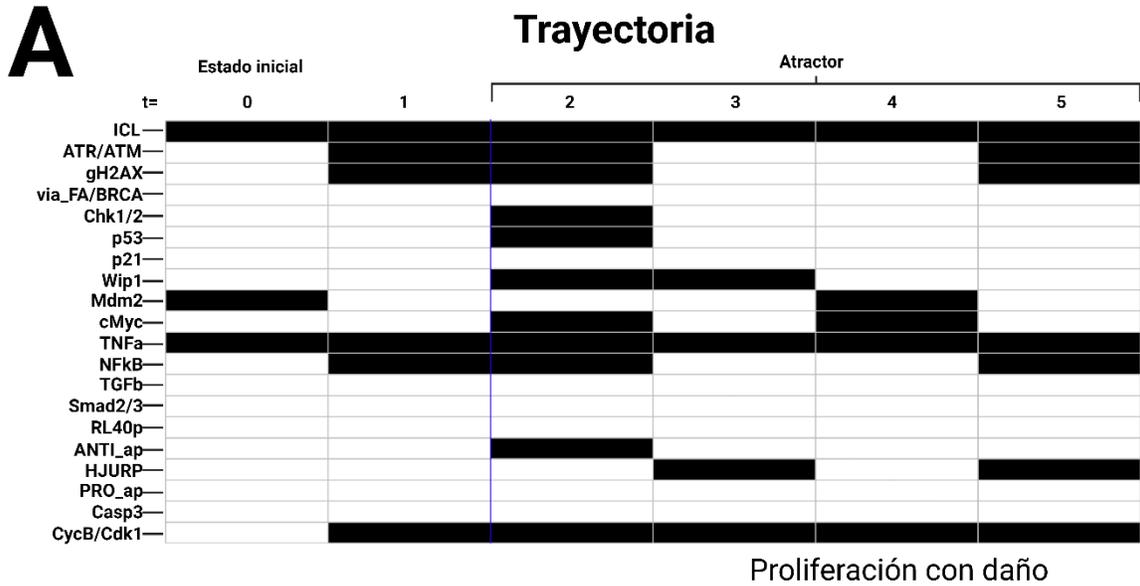
10.3.2. La activación constante de los nodos Mdm2 y TNF- α permiten que la red AF tenga un atractor de proliferación con daño.

Con el objetivo de evaluar los mecanismos a través de los cuales la célula AF es capaz de sobreexpresar a cMyc y proliferar a expensas del daño. Se analizaron las trayectorias a partir de un estado inicial con el ICL y Mdm2 activos, y se hizo la búsqueda de las cuencas de atracción de redes “mutantes” AF en donde se fijó, por separado, el valor de cada uno de los nodos a 1 (activo) o 0 (inactivo). Aparte de las mutantes donde ya se ha reportado y era esperado que hubiera una proliferación de la célula AF, destacaron dos redes donde la activación constitutiva de nodos específicos habilitó la obtención de atractores donde se presentó proliferación con el ICL activo: TNF- α y Mdm2.

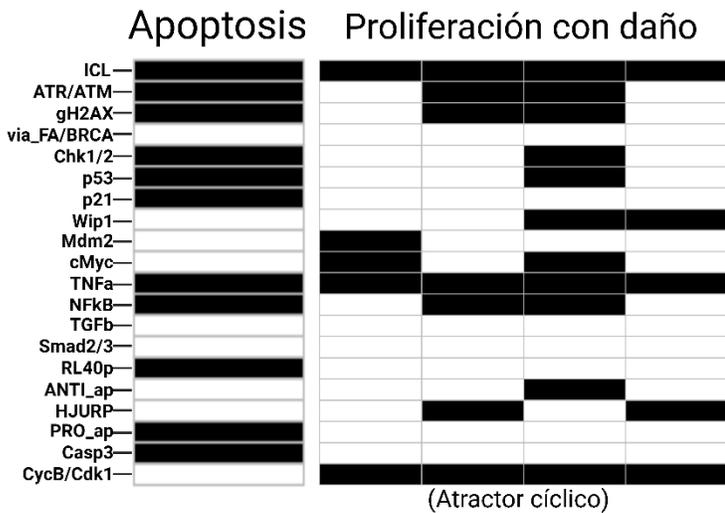
La red mutante AF donde se activó constitutivamente al nodo del receptor TNF- α , al hacer un análisis de trayectoria, se mostró comprometida la activación de los elementos del DDR, arresto y apoptosis, debido a la activación no canónica del nodo de Wip1, a través de NF-kappa B y no por haber sido reparado el ICL. Esto lleva a un atractor de tipo cíclico en donde la activación de la DDR, p53 y p21 por el ICL es impedida por la activación de Wip1 vía NF-kappa B, evitando la inhibición del complejo Ciclina B/Cdk1 y con ello la proliferación (**Figura 19A**, t = 2, 3, 4 y 5). Adicionalmente, dentro del atractor, se observó una activación intermitente del nodo de cMyc (**Figura 19A**, t = 2 y 4) que coincidía con la activación de p53 solamente en paso de tiempo (**Figura 19A**, t = 2).

En cuanto a la búsqueda de las cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo, se observaron dos atractores posibles (**Figura 19B**). El primero, con un 85% de los estados iniciales posibles, consistió en un atractor puntual con los nodos de la apoptosis activos (**Figura 19C**), mientras que el 15% de atractores posibles restantes formaron parte de la cuenca con el atractor obtenido en el análisis de trayectoria anterior, proliferación con el ICL activo (**Figura 19A**, atractor; y **Figura 19C**).

Al hacer el mismo análisis en una red PR, pero activando constitutivamente el ICL, simulando daño constante, se obtuvo la misma trayectoria (**Figura Suplementaria 1A**); sin embargo, a pesar de también obtener los mismos atractores en las cuencas de atracción, el tamaño de éstas fue distinto. En este caso, el atractor de apoptosis contenía el 30% de atractores posibles, dejando el 70% restante asociado al atractor de proliferación (**Figura Suplementaria 1B y 1C**).



B **Atractores posibles**



C **Tamaño cuencas de atracción**

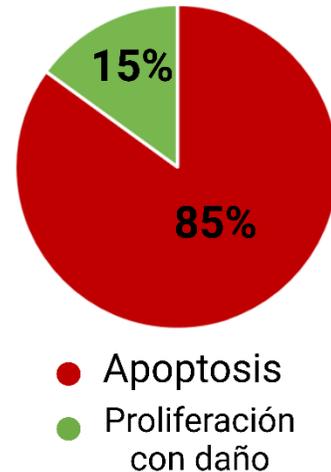


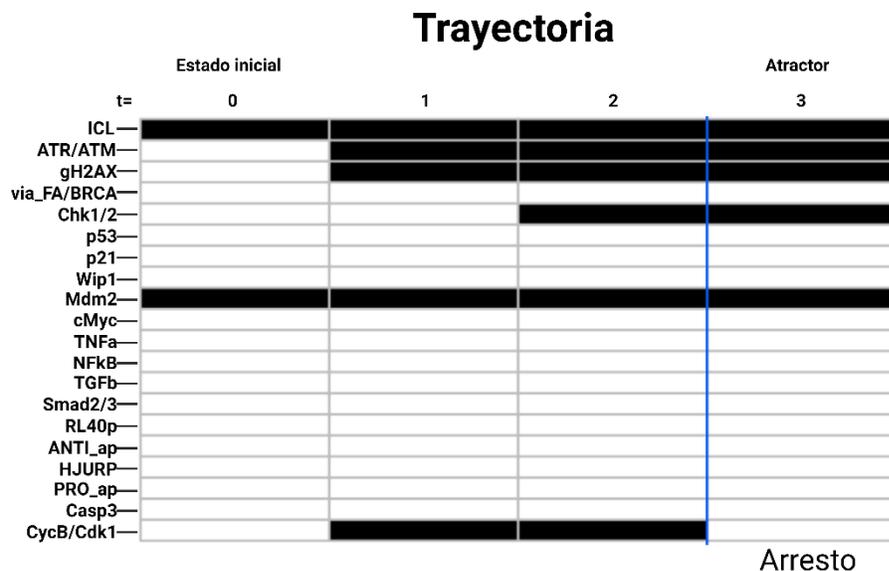
Figura 19. Análisis de red mutante AF con activación constitutiva del nodo de TNFa. (A) Análisis de trayectoria de la red partiendo de un estado inicial con el ICL y Mdm2 activos. (B) Atractores posibles a partir de búsqueda de cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo y su respectivo tamaño (C).

El mismo análisis de trayectoria, pero de la red mutante AF con activación constitutiva del nodo de Mdm2 activo mostró una trayectoria corta en donde se inhabilita la activación de p53 y con ello la posibilidad de la activación de los nodos de la apoptosis (**Figura 20A**, $t = 0, 1, 2$). No obstante, fue posible la activación del nodo de Chk1/2 por acción de ATR/ATM, evento suficiente para la inactivación del complejo Ciclina B/Cdk1, llegando a un atractor con arresto (**Figura 20A**, $t = 3$).

En la búsqueda de las cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo se obtuvieron cinco cuencas con atractores diferentes: apoptosis con 71%, el atractor de arresto visto en el análisis de trayectoria con 13%, un atractor de apoptosis cíclico de dos tiempos con activación de cMyc con 6%, un atractor cíclico de dos tiempos con activación intermitente de cMyc y CycB/Cdk1 con 5%, y un atractor puntual de proliferación con daño y cMyc y HJURP con 5% (**Figura 20B y 20C**).

De igual manera que la mutante anterior, al hacer el mismo análisis, pero en una red PR con el ICL constitutivamente activo, se obtuvo la misma trayectoria y cuencas de atracción (**Figura Suplementaria 2A y 2B**). Solo que la proporción de cada cuenca fue diferente, teniendo el 33% el atractor de arresto, 30% el de apoptosis, 17% apoptosis con cMyc activo, 11% activación intermitente de cMyc y CycB/Cdk1 y 4% proliferación con daño y cMyc y HJURP (**Figura Suplementaria 2B**).

A



B

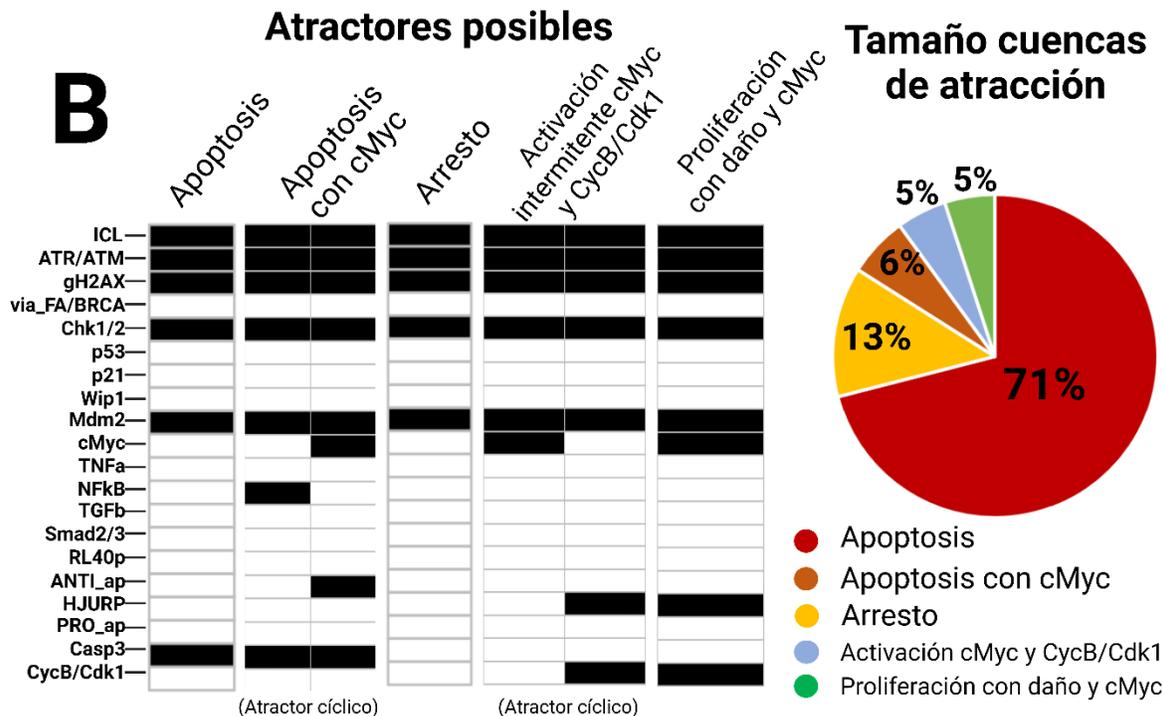
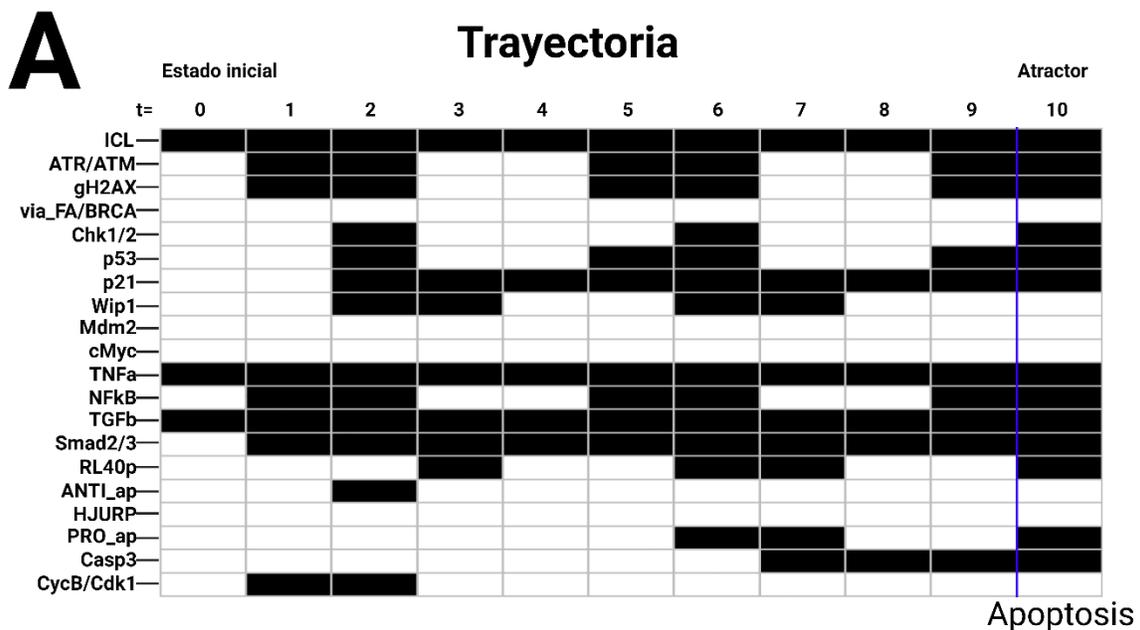


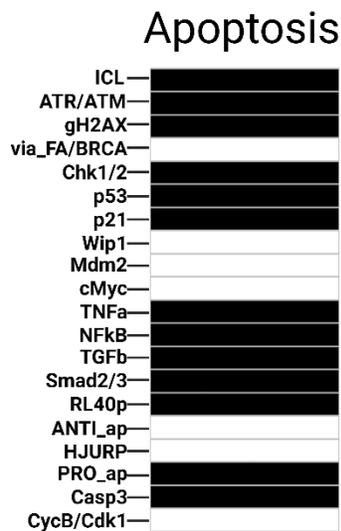
Figura 20. Análisis de red mutante AF con activación constitutiva del nodo de Mdm2. (A) Análisis de trayectoria de la red partiendo de un estado inicial con el ICL y Mdm2 activos. (B) Atractores posibles a partir de búsqueda de cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo y su respectivo tamaño (C).

10.3.3. La activación no canónica de Wip1 a través de la señalización exclusiva de TNF- α es necesaria para la supervivencia de la célula

Finalmente, debido a que la red mutante de activación constitutiva de TNF- α permitió la supervivencia de la célula, nos propusimos investigar si al tener una señalización simultánea constante de TNF- α y TGF β , como se esperaría fuera el contexto de las células AF, TNF- α aún era capaz de permitir que la célula sobreviviera. Por lo que a partir de la red AF se activaron los nodos de TNF- α y TGF β constitutivamente. Hecho esto. Al hacer el análisis de trayectoria se pudo notar como la activación de ambos receptores hace que, una vez que se tiene la DDR, la activación de p53 y la inactivación del complejo Ciclina B/Cdk1 (**Figura 21^a**, t= 0, 1 y 2) frente al daño, al paso siguiente los nodos de la DDR y p53 se inactivan a través de Wip1 (**Figura 21A**, t= 3 y 4), evitando que se activen los nodos de la apoptosis, como ocurrió con la red mutante de activación constitutiva de TNF- α donde Wip1 es activado prematuramente por NF-kappa B (**Figura 19A**, t=3 y 4). Sin embargo, al paso siguiente, volvió a ocurrir la activación de los nodos de la DDR y p53 debido a que la señalización de TGF β no solo inhibe a NF-kappa B a través de Smad2/3, inhabilitando la activación de Wip1, sino que también activa a p53 (**Figura 21A**, t=5 y 6). Esta regulación inhibitoria entre ambos receptores inflamatorios ocasionó que hubiera oscilaciones en la activación de NF-kappa B, Wip1 y con ello los nodos de la DDR y p53; no obstante, ante la segunda activación de la DDR y p53, a pesar de que volvieron a ser desactivados al paso siguiente por Wip1 (**Figura 21A**, t = 5, 6 y 7), en este caso sí se lograron activar los nodos de la apoptosis, llevando a la célula a dicho atractor (**Figura 21A**, t= 7, 8, 9 y 10). El atractor de la apoptosis resumió el 100% de los estados iniciales posibles al hacer el análisis de la búsqueda de las cuencas de atracción (**Figura 21B y Figura 21C**). Interesantemente, la misma mutante, pero a partir de la red PR, llegó a un atractor cíclico de arresto en el análisis de trayectoria. En donde, las oscilaciones de NF-kappa B, p53 y Wip1 continúan perpetuamente sin activar los nodos de la apoptosis (**Figura Suplementaria 3A**, t= 3, 4, 5 y 6). Este atractor de arresto recapitula el 70% de los estados iniciales en el análisis de búsqueda de cuencas de atracción, mientras que el otro 30% llega a un atractor de apoptosis (**Figura Suplementaria 3B y 3C**).



B Atractores posibles



C Tamaño cuencas de atracción

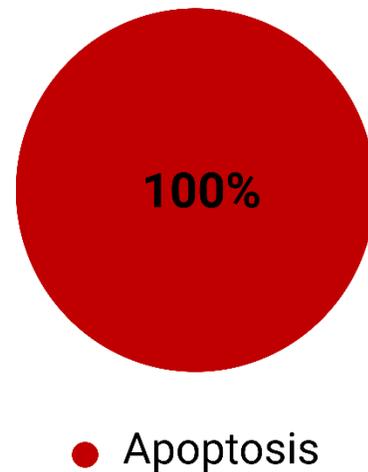
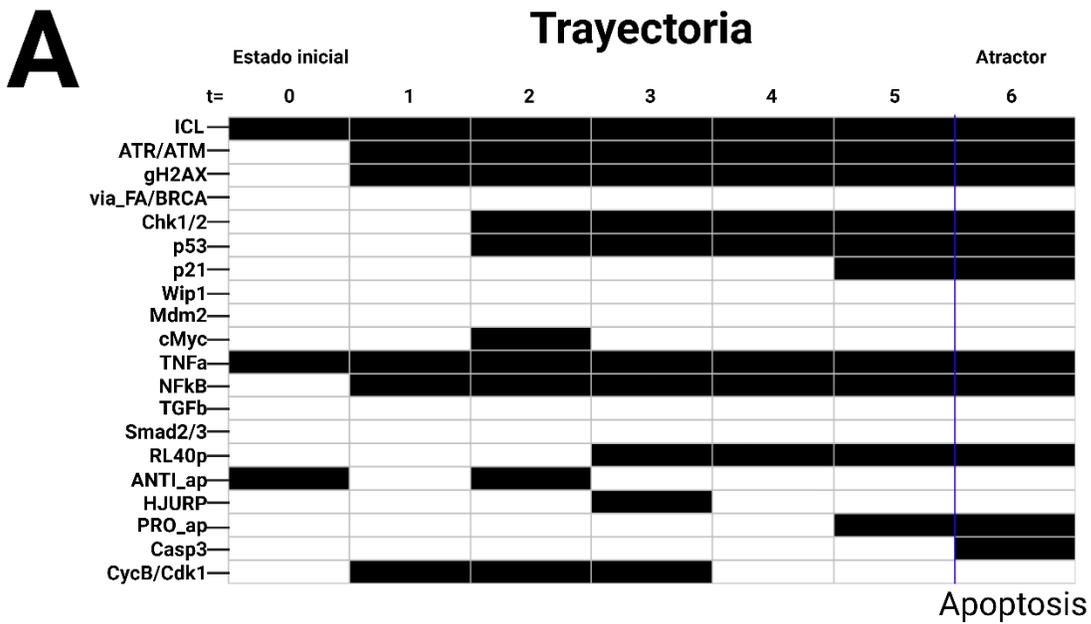


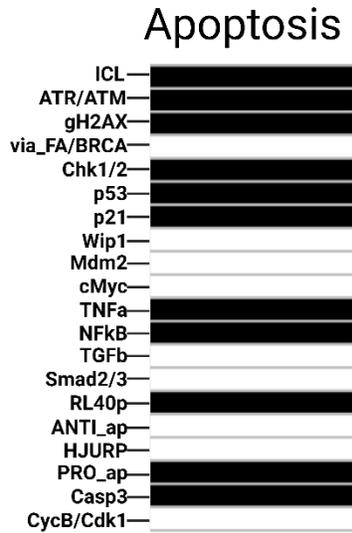
Figura 21. Análisis de red mutante doble AF con activación constitutiva del nodo de TNF- α y TGF β . (A) Análisis de trayectoria de la red partiendo de un estado inicial con el ICL y Mdm2 activos. (B) Atractores posibles a partir de búsqueda de cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo y su respectivo tamaño (C).

Finalmente, debido a que se identificó que la célula AF sobrevive a través de la activación de Wip1 vía NF-kappa B, nos propusimos comprobar si dentro de ese contexto, la ausencia de Wip1 aún permitía la supervivencia celular. Para lograr esto se generó una red mutante

doble con activación constitutiva de TNF- α e inactivación constitutiva de Wip1. En este caso, el análisis de trayectoria (**Figura 22A**) y búsqueda de cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo mostraron al mismo atractor que comprendía el 100% de los estados iniciales posible, la apoptosis (**Figura 22B y 22C**). En cambio, al generar la misma doble mutante, pero en la red RP con el ICL constitutivamente activo, el análisis de trayectoria llevó a un atractor de arresto (**Figura Suplementaria 4A**), el cual tomó el 30% de estados iniciales, mientras que el otro atractor posible, con el 70% de estados iniciales restantes, correspondió a un atractor de apoptosis (**Figura Suplementaria 4B y 4C**).



B Atractores posibles



C Tamaño cuencas de atracción

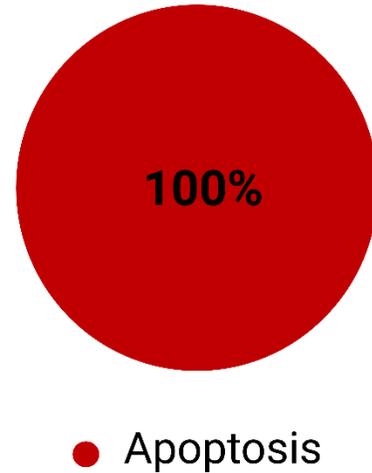


Figura 22. Análisis de red mutante doble AF con activación constitutiva del nodo de TNF- α e inactivación constitutiva de Wip1. (A) Análisis de trayectoria de la red partiendo de un estado inicial con el ICL y Mdm2 activos. (B) Atractores posibles a partir de búsqueda de cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo y su respectivo tamaño (C).

11. DISCUSIÓN

La AF es una enfermedad genética en donde las células de los pacientes que la padecen presentan una deficiencia en la reparación de ICL producto de una vía de reparación FA/BRCA comprometida. El resultado de esta deficiencia genera inestabilidad genómica y alteraciones cromosómicas que pueden ser heredadas a las células hijas con cada división celular. Llevando a las células a hiperactivar diferentes vías de estrés y reparación alterna que promueven destinos celulares como la apoptosis o la supervivencia.

La evidencia de esta reorganización regulatoria ha sido reportada en etapas tan tempranas como el embrión AF (Rodríguez *et al.*, 2022), donde al parecer se requiere de la vía de TGF β para hiperactivar la reparación por NHEJ y permitir que se complete su desarrollo. Por otro lado, durante el resto de la vida del paciente, se ha visto que los órganos con mayor tasa proliferativa parecen ser los más afectados por la deficiencia en la reparación; por ejemplo, con el desarrollo de AA en la médula ósea y carcinomas de células escamosas en cabeza y cuello (HNSCC, por sus siglas en inglés) a partir de los recubrimientos epiteliales.

Rodríguez *et al.* (2021) demostraron que las HSPC de pacientes con AF sobreexpresan a los factores transcripcionales cMyc y p53 en la médula ósea, reguladores cruciales de la apoptosis y proliferación respectivamente, y describieron el efecto que tiene la activación de las vías pro-inflamatorias de TNF- α y TGF β en la expresión de ambos reguladores. De manera paralela, Webster *et al.* (2023) encontraron amplificaciones del gen de cMyc y deleciones del gen de p53 en los HNSCC de los pacientes con AF.

En este trabajo, hipotetizamos que durante toda la vida del individuo AF, desde el cigoto hasta la adultez, sus células se ven constantemente sometidas a esta dicotomía funcional, la cual, eventualmente, y en diferentes contextos espaciotemporales de la vida del paciente, se resuelve en uno de dos destinos funcionales; la apoptosis, promovida por la hiperactivación de p53, o la supervivencia celular, promovida por la hiperactivación de cMyc. La decisión entre estos dos destinos tiene repercusiones sistémicas para el paciente, llevando a la atrofia tisular, como es visto en la falla medular, o la carcinogénesis, durante el desarrollo de HNSCC. Esto ha convertido a células AF en excelentes modelos celulares para el estudio de los mecanismos subyacentes a la tolerancia al daño en el ADN y el establecimiento del cáncer.

En este proyecto, estudiamos una línea celular derivada de tejido hematopoyético y tumores embebidos en FFPE a través de tecnologías de proteómica unicelular, con el fin de evaluar la dinámica regulatoria de cMyc y p53 durante los contextos en los cuales inferimos que está ocurriendo esta decisión.

A través de la CyTOF en HSPC tratadas con MMC, logramos detectar cómo la hiperactivación exclusiva de cMyc en las células *FANCG*^{-/-} ocurre en momentos específicos que coinciden con una disminución en la hiperactivación de p53 (**Figura 13B**), siendo estos los momentos en los cuales conjuntos reducidos de células están comprometiéndose a la toma de una decisión que promueve su proliferación a expensas del daño y que podrían en un futuro estar representando a las clonas carcinogénicas que generan leucemias en los pacientes, marcando un punto de no retorno.

A través de t-CyCIF en muestras de tumores sólidos de células escamosas de pacientes con AF, se logró comprobar a nivel proteico, la existencia de una sobreexpresión general de cMyc a expensas de una disminución en la expresión de p53 (**Figura 16A**); algo concordante con las amplificaciones génicas de *MYC* y deleciones de *TP53* reportadas por Webster *et al* (2023). Adicionalmente, y de acuerdo con la hipótesis de que la expresión de cMyc es necesaria para el establecimiento y mantenimiento del cáncer, se encontró que los niveles de cMyc aumentaron en función de la progresión del tumor y colocaliza en células en estado proliferativo (células Ki67+) (**Figura 16A y B**).

Sin embargo, la heterogeneidad particular vista en la expresión de cMyc y p53 al analizarse para cada muestra, algo que es de esperarse debido a la diferente historia natural que tuvieron cada uno de los tumores; algo que explicaría también la similitud en los perfiles de expresión para las muestras provenientes de la misma paciente (**Figura 15E**, FAHNSCC-11_I, FAHNSCC-11_II y FAHNSCC-14). Con la excepción de la baja expresión relativa de cMyc en la muestra FAHNSCC-11_I respecto a las demás, que coincidentemente es la muestra con una mayor proporción de células inmunes (**Figura 15E**), dando pie a pensar que existen mecanismos inmunes que mantienen la expresión de cMyc en niveles bajos.

Por otro lado, la particular baja expresión de cMyc y p53 en la muestra FAHNSCC-15 con respecto a las demás (**Figura 15E**) es probablemente un producto, en el caso de cMyc, de que esa muestra estaba en su mayoría conformada por células de regiones clasificadas como “displasia de bajo grado”, concordando con la hipótesis donde la expresión de cMyc aumenta en función de la progresión del cáncer. Y en el caso de p53, que esa muestra es proveniente de un tejido positivo para el virus del papiloma humano (**Figura 9A**), ya que se ha reportado que las oncoproteínas virales E6 y E7 son capaces de unirse a p53 y promover su degradación (zur Hausen, 1998).

Finalmente, debido a que la dinámica entre cMyc y p53 comprende a un motivo regulatorio particular embebido dentro de una red de regulación de la cual se ha reportado mucha información, consideramos a este proceso uno susceptible a ser modelado matemáticamente. Bien si existen múltiples modelos previos que hablan sobre la regulación de p53 (Hafner *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2020; Chong *et al.*, 2015), así como decisiones del destino celular

frente a daño (Jonak *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2015; Calzone *et al.*, 2010; Hat *et al.*, 2016), pocos se han centrado en modelar la regulación de cMyc y la relación que éste guarda con p53 y el proceso de toma de decisión del destino celular, además de integrar la señalización de los receptores TNF- α y TGF β en la AF.

Nosotros decidimos generar un modelo de tipo Booleano, ya que creemos que este es una buena primera aproximación para lograr entender y estudiar la dinámica regulatoria de cMyc y p53 en la AF.

Aun así, reconocemos las limitantes que existen dentro de la construcción de un modelo discreto como este. Dentro de las principales, la incapacidad de modular los niveles de muchos componentes dentro del sistema que, basándonos en los resultados obtenidos, sabemos tienen una dinámica cuantitativa (cantidad de daño, niveles de expresión, activación de receptores, etc...) que responderían mejor a un tipo de modelación continua o incluso la generación de un modelo multiescalar que tome en cuenta diferentes escalas temporales y de las variables de estado.

No obstante, el modelo Booleano presentado, mostró ser capaz de recapitular la dinámica de cMyc y p53, así como de evaluar procesos y reguladores cruciales durante la toma de decisión en la célula AF.

El análisis del modelo booleano propone que, para poder dividirse sin haber reparado el ICL, la célula AF requiere de la activación de vías alternativas de señalización a través de la expresión de reguladores específicos. Reconocemos que esto representa una limitante del modelo, ya que este resultado no es representativo de la diversidad fenotípica celular en la AF, ya que no todas las células se comprometen a la apoptosis. Este efecto se debe a que todos los análisis en dónde se hizo la búsqueda de las cuencas de atracción fueron hechos con el nodo del ICL constitutivamente activo, evitando atractores donde no existiera el daño, y sin considerar la reparación del ICL por vías alternativas no fidedignas como la NHEJ y MMEJ.

Sin embargo, es importante resaltar que el objetivo del presente modelo se centra en el análisis de mecanismos de supervivencia por señales extrínsecas y regulación alterna a vías de reparación, dentro del contexto de p53 y cMyc, ante la presencia de daño genómico constante. Por lo que creemos que el resultado anterior es representativo de lo que ocurría si una célula AF es incapaz de reparar daño genómico y no recibe señalización alterna que interfiera con la activación de la vía apoptótica por p53.

TNF- α y Mdm2, al activarse constitutivamente, mostraron ser los únicos reguladores capaces de permitir que la célula proliferara con daño (**Figura 19 y Figura 20**). A pesar de que en ambos casos dichos atractores representaban a las cuencas de atracción más pequeñas, es posible que este porcentaje sea similar a la frecuencia con la cual se establece una clona maligna durante la carcinogénesis, ya que, finalmente, el proceso de selección clonal en el

cáncer es un evento estadísticamente bajo (Greaves y Maley, 2012). Además de que dichos porcentajes concuerdan con los aumentos en la proporción de células positivas para cMyc (alrededor del 15%) que se observaron a través de la CyTOF en líneas celulares linfoblastoides *FANC^{-/-}* tratadas con MMC (**Figura 13B**).

También es importante recalcar como al hacer las mismas tres mutantes, pero en la red PR con el ICL constitutivamente activo, se obtuvieron las mismas cuencas de atracción, mas no sus proporciones. Al simular un daño constante en las redes mutantes PR, los porcentajes de las cuencas de atracción con un atractor de apoptosis disminuyeron considerablemente (**Figuras Suplementarias 1C, 2C, 3C y 4C**) en comparación con las mutantes de la red AF (**Figuras 19C, 20C, 21C y 22C**). Este fenómeno es representativo de como una célula sana puede comportarse como una célula con AF (presentando inestabilidad genómica, aberraciones cromosómicas e incremento en el índice de apoptosis) cuando existe una saturación de daño (Oostra *et al.*, 2012). Sin embargo, las células con AF son mucho más sensibles a presentar estas características al ser sometidas a agentes que causan daño en el ADN en comparación con las células sanas, como ocurre en la prueba diagnóstica de reto con MMC o DEB (Mehta y Ebens, 2002).

En el caso de la mutante de la red AF con activación constitutiva de Mdm2, a pesar de que la cuenca de atracción más grande estaba representada por un atractor de apoptosis, la existencia de atractores con activación de cMyc y Wip1 correlacionan con estudios donde existe una sobreexpresión general de Mdm2 en carcinomas (Deb *et al.*, 2014) y su co-regulador Mdm4 en leucemias (Serbert *et al.*, 2023). Éstos confieren resistencia quimioterapéutica en las células al desensibilizarlas de la señalización del daño (Hou *et al.*, 2019).

Por otro lado, la red mutante de la red AF con activación constitutiva de TNF- α mostró en su análisis de trayectoria y en la búsqueda de las cuencas de atracción que la supervivencia de la célula ocurría a través de la activación de NF-kappa B (Mattson *et al.*, 2006; Regula *et al.*, 2002), a su vez activando de manera no canónica a Wip1 (Bai *et al.*, 2018). Al observar la trayectoria previa al atractor mencionado, se puede notar que es la activación de Wip1 al permitir que la célula se divida con daño (**Figura 19A**, $t = 2$), ya que es a través de esta proteína que se inactivan los nodos involucrados en el arresto del ciclo celular y apoptosis. Esto fue confirmado a través de la red mutante doble de activación constitutiva de TNF- α e inactivación constitutiva de Wip1, donde, sin Wip1, la red no fue capaz de tener un atractor de sobrevivencia (**Figura 21A y Figura 21B**).

Wip1 es una fosfatasa que, al defosforilar blancos específicos como ATM, gH2AX, p53 y Chk2, es responsable de atenuar la DDR y reactivar la progresión del ciclo celular una vez reparado el daño; además de que se le ha atribuido un papel crucial durante la diferenciación hematopoyética (Uyanik *et al.*, 2017). Recientemente, también ha sido considerada como un

posible oncogén debido a que existen numerosos reportes donde el gen *PPM1D*, el cual la codifica, se encuentra amplificado en diferentes tipos de cánceres, permitiendo que las células se vuelvan tolerantes a daño en el ADN y escapen mecanismos de arresto del ciclo celular (Buvalin *et al.*, 2002; y Oghabi *et al.*, 2017).

Si bien los efectos de la activación de Wip1 han sido ampliamente reportados, las condiciones bajo las cuales esta fosfatasa es activada de manera aberrante no. A través de los resultados obtenidos con el modelo booleano, sugerimos que el evento decisivo en la supervivencia de la célula con AF es la activación de la fosfatasa Wip1; algo en concordancia con los reportes de Rodríguez *et al.* (2019).

Tomando en cuenta que las células de pacientes con AF presentan hipersecreción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α y TGF- β (Du *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2020; Rodríguez *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2016; y Vanderwerf *et al.*, 2009), proponemos que, bajo la presencia de daño no resuelto, la activación aberrante de Wip1 ocurre en contextos donde existe una señalización constante y exclusiva de TNF- α /NF-kappa B sobre TGF β /Smad2 y 3 (**Figura 23B**), y no de ambos (**Figura 23A**), como se mostró en la mutante de activación constitutiva de TNF- α y TGF β (**Figura 21A y Figura 21B**). Esto abroga los mecanismos de señalización de daño en el ADN a través de la activación de Wip1 por NF-kappa B y con ello permite la activación del oncogén *MYC* (**Figura 23B**), como reportado en Shreeram *et al.* (2006). Ambos eventos, en conjunto, explicarían la importancia de este motivo regulatorio mínimo dentro de la resolución de la dicotomía a favor de cMyc, permitiendo la existencia de poblaciones celulares con una disminución en los niveles de p53, confiriéndoles resistencia al daño y la capacidad proliferativa suficiente para dividirse a expensas del daño (**Figura 23B**).

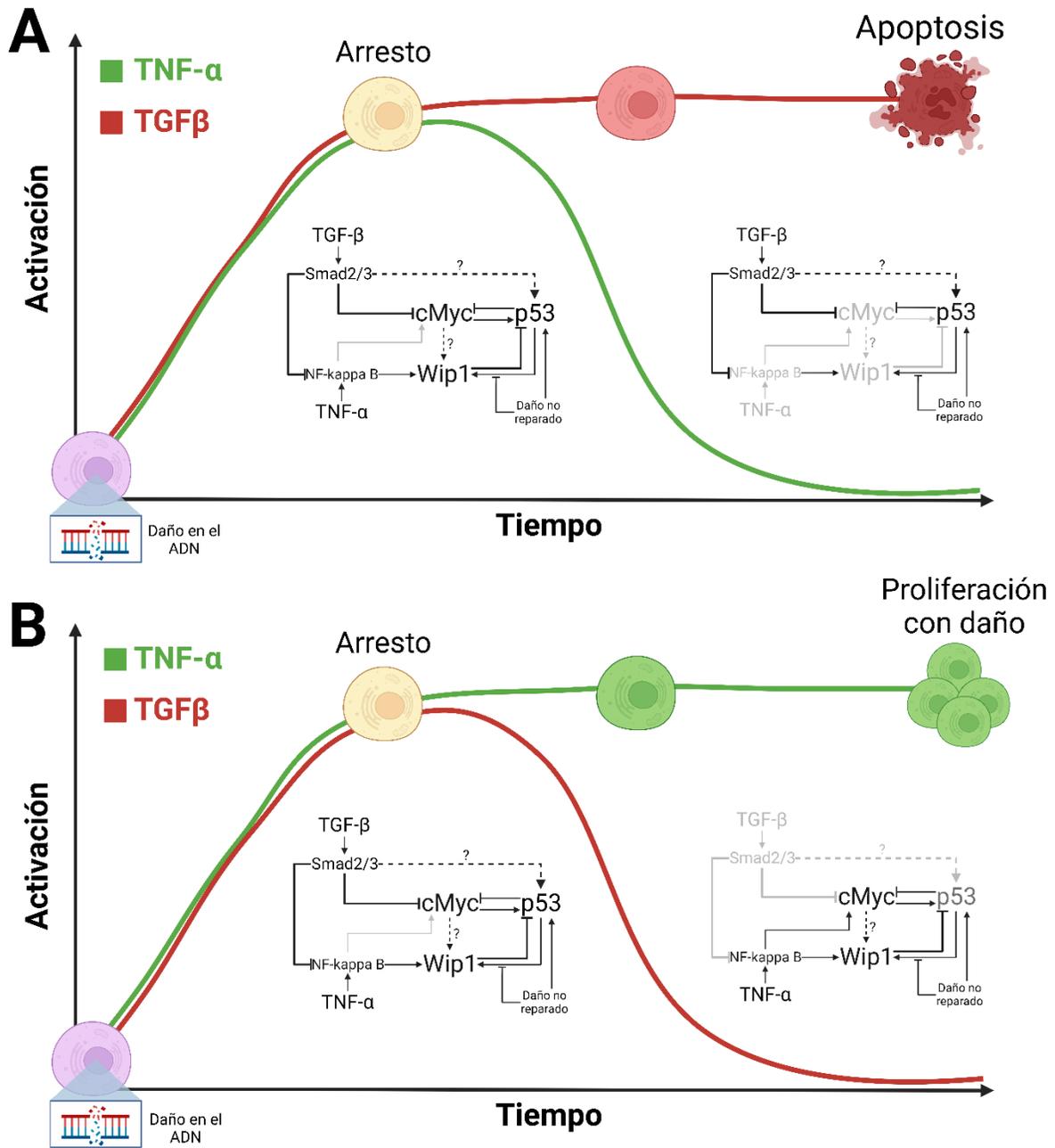


Figura 23. Propuesta de regulación detrás de la toma de decisión del destino celular en la AF. La activación simultánea de TNF- α y TGF β a lo largo del tiempo lleva a la célula AF a un arresto del ciclo celular y posterior apoptosis. (A) La activación sostenida y exclusiva de TGF β promueve una dinámica regulatoria donde p53 es activado por el daño y a través de las proteínas Smads y con ello se llega a la apoptosis. (B) La señalización sostenida y exclusiva de TNF- α a lo largo del tiempo permite la supervivencia celular a expensas del daño al transformar la dinámica regulatoria a una donde NF-kappa B activa cMyc y Wip1, y este último inactiva a p53. (Imagen creada en Biorender.com)

12. CONCLUSIONES

El estudio de la toma de decisión del destino celular en la anemia de Fanconi es uno sumamente importante, ya que no sólo es un proceso que compromete la integridad tisular, sino que también define sistémicamente el estado funcional de los pacientes y ayuda a comprender los mecanismos de tolerancia al daño en el ADN en el desarrollo de cáncer.

En este proyecto hemos estudiado la activación antagónica del motivo regulatorio de p53 y cMyc en células AF. Al estudiar *in vitro* la respuesta al daño en líneas linfoblastoides AF, observamos que, después de la exposición a MMC, sucede una coactivación tanto de cMyc como de p53. A partir de ésta, parecen existir eventos donde ocurre una toma de decisión por un perfil de expresión entre una de las dos proteínas, el cual está ligado a un destino celular en particular. Concomitantemente, el estudio de tumores derivados de pacientes con AF mostró a la carcinogénesis como un contexto espaciotemporal promovido y favorecido por la selección de la sobreexpresión de cMyc, estando éste relacionado con estados proliferativos y la progresión de la enfermedad; mientras que p53 se asoció con la condición opuesta.

Con base en el conocimiento experimental generado y previamente establecido, también se generó un modelo matemático de tipo Booleano que explora la interacción circundante de p53 y cMyc en el contexto de sus reguladores. El modelo evidenció la importancia de la expresión del receptor TNF- α y Wip1 en la reorganización regulatoria que permite la activación de cMyc y con ello la proliferación celular a pesar de tener daño no resuelto.

13. PERSPECTIVAS

Con el objetivo de complementar los objetivos propuestos en este trabajo y continuar la investigación de la toma de decisión del destino celular en la anemia de Fanconi, se plantean las siguientes perspectivas metodológicas:

- Integrar nuevos marcadores en la CyTOF de HSPC con el objetivo de evaluar la dinámica de expresión de nuevas proteínas involucradas en la toma de decisión entre la expresión de cMyc o p53.
- Identificar poblaciones celulares con perfiles proteicos únicos, a través de la incorporación de nuevos marcadores, como TNF- α y Wip1, en la CyTOF y t-CyCIF, que ayuden a identificar procesos cruciales durante la toma de decisión del destino celular.
- Investigar el microambiente e interacciones inmunes que estén influyendo en el desarrollo, regulación y progresión de los tumores procesados por la t-CyCIF a través de análisis espaciales entre conjuntos celulares (vecindarios) en las

muestras, con el fin de evaluar la influencia de la señalización de TNF- α u otros reguladores.

- Probar la robustez del modelo frente a cambios en operadores lógicos específicos, con el fin de identificar interacciones importantes en la topología del modelo.
- Evaluar la posibilidad de simplificar y traducir del modelo propuesto a uno con ecuaciones diferenciales ordinarias o incorporando diferentes escalas de tiempo, buscando una aproximación metodológica que concuerde más con la granularidad de los datos obtenidos.
- Validar experimentalmente los resultados obtenidos con las simulaciones del modelo booleano a través de un ensayo de CRISPR con resolución unicelular, en dónde se generen poblaciones celulares AF con bloqueos específicos de los genes inactivados en el modelo.

14. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Tabla Suplementaria 1. Funciones lógicas del modelo Booleano y sus referencias

Nodo	Función lógica	Sustento teórico y referencias
ICL	ICL & !via_FA/BRCA	En el caso del ICL, éste es considerado como un nodo de entrada o input de la red. Es decir, no puede ser activado por otro nodo de la red, por lo que para que éste permanezca activo, siempre y cuando no sea inhibido (reparado) por otro nodo, y no se apague al siguiente paso de tiempo, su función lógica requiere de sí mismo para continuar activo y que no esté la vía FA/BRCA, ya que ésta última es la que lo repara (Rodríguez <i>et al.</i> , 2012).
ATM/ATR	ICL & !Wip1	El procesamiento de un ICL involucra la generación de un DSB (Semlow y Walter, 2021), algo que se ha reportado ocurre en las células AF; sin embargo, la reparación del ICL no se hace de manera correcta o en lo absoluto (Castella <i>et al.</i> , 2011). Dentro de los nodos de la DDR, las cinasas ATM y ATR son capaces de detectar daño genómico como rupturas de doble hebra y hebra sencilla (Medema y Macurek, 2011), las cuales son intermediarios dentro del procesamiento de un ICL. Por lo que la función lógica del nodo ATM_ATR requiere de la presencia del ICL para su activación. Por otro lado, su inactivación es a través de la desfosforilación por Wip1 (Medema y Macurek, 2012).
gH2AX	(ATR/ATM ICL) & !Wip1	Dentro de los blancos de las cinasas ATM/ATR, se encuentra la histona H2AX, que al ser fosforilada ésta cambia a su forma activa gH2AX (Shiloh y Ziv, 2013), además de que existen otras cinasas como DNAPK que, ante la presencia de un ICL, también son capaces de fosforilarla (Yue <i>et al.</i> , 2020). Esto resulta en que su función requiera

		la presencia de ATM/ATR o el ICL per se, representando la activación alterna a ATM/ATR, para su activación. Por otro lado, al igual que ATM/ATR, su inhibición es a través de la desfosforilación Wip1 (Macurek <i>et al.</i> , 2010).
via_FA/BRCA	(gH2AX ATR/ATM) & !(Casp3** Wip1)	Para que la vía FA/BRCA funcione correctamente, es necesaria la fosforilación del complejo FANCM por ATM (Rodríguez <i>et al.</i> , 2012), al igual que se ha reportado que gH2AX juega un papel importante, más no indispensable, en el reclutamiento de FANCD2 (Bogliolo <i>et al.</i> , 2007), resultando en la presencia de cualquiera de los dos para la activación del nodo de reparación. Adicionalmente, la inhibición del nodo ocurre a través de Wip1, ya que éste se ha reportado desfosforila componentes de la vía (Rodríguez <i>et al.</i> , 2019).
Chk1_2	ATR/ATM & !Wip1	Chk1/Chk2 son fosforiladas, activándose, por ATM/ATR (Smith <i>et al.</i> , 2010), mientras Wip1 activo es capaz revertir esta fosforilación, inactivándolas (Macurek <i>et al.</i> , 2010).
p53	(Chk1_2 ATR/ATM Smad2/3 cMyc) & !(Mdm2 Wip1)	Dentro de los principales blancos de Chk1/Chk2, al igual que ATM/ATR, se encuentra el factor de transcripción p53, el cual se activa al ser fosforilado en la Ser15 o Ser20 en su dominio de transactivación (Brooks y Gu, 2010). Existe evidencia que sugiere al factor de transcripción cMyc como activador transcripcional de p53 debido que dentro del gen de p53 existen elementos responsivos a cMyc como las E-boxes (Reisman <i>et al.</i> , 1993; Nilson y Cleveland, 2003; Hoffman y Liebermann, 2008;). Adicionalmente, hay reportes de un sinergismo entre las proteínas Smads y p53 que facilita la transcripción de los genes blanco de ambos factores de transcripción (Elston y Innman, 2012; Kawarada <i>et al.</i> , 2016; Atfi y Baron, 2008; Liao <i>et al.</i> , 2017). Finalmente, los principales inhibidores de p53 son dos de sus propios blancos transcripcionales, Mdm2 y Wip. Mdm2, al ser una ubiquitina ligasa, promueve la degradación proteosomal de p53 (Nag <i>et al.</i> , 2013), mientras que Wip1 remueve las fosforilaciones hechas por ATM/ATR y Chk1/Chk1 (Shi <i>et al.</i> , 2020).
p21	(p53 Smad2/3) & !(HJURP cMyc)	p21 es de los principales blancos transcripcionales de p53 (He <i>et al.</i> , 2005; Engeland, 2022); sin embargo, también se ha descrito que la vía de TGFβ es capaz de inducir la expresión de p21 a través del complejo Smad (Ellenrieder, 2008; Pardali <i>et al.</i> , 2005). Este está involucrado en el arresto del ciclo celular, el cual es inhibido por HJURP y cMyc a través de p21; cMyc bloqueando su transcripción (Bretones <i>et al.</i> , 2015) y HJURP desestabilizándolo al promover su traslocación del núcleo al citoplasma, al igual que su degradación (Chen <i>et al.</i> , 2018)
Wip1	((p53 y !ICL) NFkB) & !Casp3**	Wip1 es uno de los blancos transcripcionales más importantes de p53 (Sakai <i>et al.</i> , 2014 y Fiscella <i>et al.</i> , 1997). Sin embargo, la activación de Wip1, una vez transcrito ha sido poco descrita. Parecería ser que Wip1, de manera canónica, comienza a desfosforilar sus blancos después de que el daño ha sido resuelto (Cha <i>et al.</i> , 2010; Macurek <i>et al.</i> , 2013), ya que su activación prematura puede convertir

		<p>desensibilizar a la célula de la señalización del daño al inactivar la DDR (Oghabi <i>et al.</i>, 2017). Debido a esto, su activación a través de p53 ocurre en un contexto en donde el daño ya haya sido resuelto, es decir, no esté activo el ICL. Por otro lado, uno de los mecanismos de activación alterna, o no canónica, de Wip1 es a través del factor de transcripción NF-kappa B durante procesos de inflamación y hematopoyesis (Uyanik <i>et al.</i>, 2017; Lowe <i>et al.</i>, 2010).</p>
Mdm2	(Wip1 p53 !ICL) & !(ATR/ATM RL40p cMyc gH2AX Casp3**)	<p>Generalmente, los niveles de Mdm2 en una célula que no presenta señalización de estrés, son bajos pero constantes (Hou <i>et al.</i>, 2019). Por lo que para su activación se consideró suficiente que no existiera el ICL en la célula.</p> <p>No obstante, la transcripción de Mdm2 es mediada principalmente por p53 (Attardi y Boutelle, 2022), además de que también se ha reportado que Wip1 es capaz de activar a Mdm2 a través de su desfosforilación en la Ser395, incrementando su afinidad por p53 (Lu <i>et al.</i>, 2007).</p> <p>Alternamente, su inhibición mayormente reside en modificaciones postraduccionales que evitan su interacción con p53; entre ellas, su fosforilación por ATM (Nakamura, 1998; Meulmeester <i>et al.</i>, 2005), la promoción de su ubiquitinación por RL40p (Zhou <i>et al.</i>, 2019), así como la inactivación transcripcional por cMyc (Feng <i>et al.</i>, 2020) o su intermediario p14ARF (Madapura <i>et al.</i>, 2016). Finalmente, se ha reportado que la presencia de daño, estrés oxidativo o estrés nucleolar es suficiente para interferir con la interacción Mdm2-p53, independientemente de la actividad de ATM/ATR (Liu <i>et al.</i>, 2016). Por lo que para ejemplificar los mecanismos alternos relacionados a estrés celular por los cuales Mdm2 es inactivado, se consideró la señalización del daño por gH2AX como un inhibidor de su actividad. Además, se considera a la Caspasa 3 como inhibidor, a modo de ejemplificar un punto de no retorno donde la célula se compromete a la apoptosis y la desintegración del núcleo, así como con el estrés nucleolar, interrumpe la interacción de Mdm2 con p53.</p>
cMyc	(NFkB HJURP) & !(p53 Smad2/3)	<p>cMyc es un factor de transcripción asociado a la proliferación celular que cobra función en procesos como la hematopoyesis y desarrollo embrionario (Yoshida, 2018). Su activación es principalmente dependiente de señales mitogénicas en la célula; sin embargo, existen múltiples mecanismos alternos que pueden inducir su activación de manera aberrante (Dhanasekaran <i>et al.</i>, 2022).</p> <p>Existe extensa evidencia de la relación entre la vía infamatoria de TNF-α y la activación de cMyc, principalmente a través del factor de transcripción y transductor de señales NF-kappa B (Wu <i>et al.</i>, 2018; Kim <i>et al.</i>, 2020; Klapproth <i>et al.</i>, 2009; Khan <i>et al.</i>, 2013). Dentro de sus blancos transcripcionales, cMyc promueve la transcripción de la chaperona de histonas HJURP, la cual se ha reportado como un posible activador transcripcional de cMyc, al estar relacionado con sus</p>

		<p>niveles de expresión, así como con la proliferación celular (Wei <i>et al.</i>, 2019; Chen <i>et al.</i>, 2018).</p> <p>La inactivación de cMyc, en cambio, se ha reportado que ocurre a través de la unión de p53 a su promotor, involucrado la desacetilación de histonas (Ho <i>et al.</i>, 2005) o a través de microARNs (Sachdeva <i>et al.</i>, 2009). Igualmente, existe evidencia de la existencia de un sitio de unión a las proteínas Smads dentro del promotor de cMyc; el cual funciona como un elemento de respuesta inhibitoria hacia cMyc (Yagi <i>et al.</i>, 2002; Kowalik, 2002).</p>
TNF α	TNF α & !NF κ B	<p>TNF-α, fue considerado como un nodo de entrada al sistema por representar un receptor inflamatorio. Por lo que, al igual que el ICL, necesita de sí mismo para su activación. En cuanto a su inhibición, ésta principalmente consta de su propio señalizador río abajo, NF-κB, como muchos otros receptores celulares, como un mecanismo de retroalimentación negativa que evita la sobreactivación del receptor (Nelson <i>et al.</i>, 2004).</p>
NF κ B	(TNF α ANTI_ap) & !(Wip1 Smad2/3)	<p>En el caso de NF-κB, este es un factor de transcripción que, bajo condiciones normales, es secuestrado de forma constante por la cinasa Ikappa B; sin embargo, ante la señalización de TNF-α, se activa la cinasa IKK, la cual promueve la ubiquitinación de Ikappa B al fosforilarlo, liberando a NF-κB (Bloom <i>et al.</i>, 2019).</p> <p>Alternamente, existe evidencia en donde la activación de NF-κB también puede ser a través de Bcl-2, existiendo una interacción entre ambas proteínas que incrementa la actividad de regulador transcripcional de NF-κB (Ricca <i>et al.</i>, 2000).</p> <p>Por otro lado, la inhibición de NF-κB puede ocurrir a través de Wip1, ya que este desfosforila la subunidad p65 de NF-κB, inactivándolo (Chew <i>et al.</i>, 2009; Salminen <i>et al.</i>, 2011).</p>
TGF β	TGF β & !Smad2/3	<p>TGFβ fue considerado como un nodo de entrada al sistema por representar al receptor pleiotrópico de citosinas involucrado en la homeostasis celular, por lo que, al igual que el ICL, necesita de sí mismo para su activación. Adicionalmente, al formarse el complejo transcripcional Smad (conformado por Smad2, Smad3 y Smad4) frente a la activación de TGFβ, dentro de los genes que regulan está el de la proteína Smad7, el cual competirá por la unión entre las proteínas Smads y promoverá su ubiquitinación, terminando la señalización de la vía (Shi y Massagué, 2003).</p>
Smad2/3	TGF β & !Mdm2	<p>Los factores transcripcionales Smad 2 y Smad3 ejercen su función una vez que son fosforilados como consecuencia de la activación del receptor TGFβ. Su fosforilación lleva a que se disocien del receptor y formen el complejo Smad junto con Smad4, acumulándose en el núcleo y promoviendo la transcripción de sus genes blanco (Shi y Massagué, 2003; Derynk y Zhang, 2003; Lang y Chung, 2011).</p> <p>En cuanto a la inhibición del complejo Smad2/3, se ha demostrado que tanto Mdm2 como Mdm4, son capaces de regular negativamente</p>

		la actividad transcripcional de las proteínas Smads independientemente de p53 (Yam <i>et al.</i> , 1999; Kadakia <i>et al.</i> , 2002)
RL40p	p53 & !cMyc	El gen híbrido <i>UBA52</i> , cuyo producto proteico es RL40p, fue uno de los genes que se obtuvo a través del análisis de correlación de genes. Este presentaba sitios unión a p53 y una correlación de expresión positiva, por lo que se infirió que su expresión estaba regulada positivamente por p53. Por otro lado, también se encontraba dentro de los genes con sitios de unión para cMyc, pero con una correlación de expresión negativa, por lo que se infirió su inhibición por cMyc.
ANTI_ap	NFkB & !(p53 cMyc PRO_ap)	Bcl-2 es una proteína que forma parte de la familia de proteínas BCL-2, las cuales están involucradas en la regulación, tanto positiva como negativa, de la apoptosis (Kale <i>et al.</i> , 2018). Se ha descrito que existen sitios de unión en el gen de Bcl-2 para múltiples subunidades del factor transcripcional NF-kappa B, el cual se ha demostrado que es capaz de promover la transcripción de Bcl-2, así como permitir la estabilización de la proteína (Wang <i>et al.</i> , 2012; Viatour <i>et al.</i> , 2003; Fahy <i>et al.</i> , 2005; Kurland <i>et al.</i> , 2001). Por otro lado, la inhibición de Bcl-2 ocurre a través de p53, ya sea a través de la activación de sus inhibidores (los genes pro-apoptóticos BH3-únicos), uniéndose directamente a la proteína o regulando su transcripción (Hemann y Lowe, 2006; Wang <i>et al.</i> , 2018). También ha sido reportado la inhibición transcripcional de Bcl-2 por la unión de cMyc en su promotor, como un mecanismo de apoptosis inducida por oncogenes (Eischen <i>et al.</i> , 2001).
HJURP	cMyc & !Casp3**	<i>HJURP</i> fue uno de los genes que se obtuvo a través del análisis de correlación de genes. Este presentaba sitios unión a cMyc y una correlación de expresión positiva, por lo que se infirió que su expresión estaba regulada positivamente por cMyc.
PRO_ap	p53 & !(ANTI_ap CycB/Cdk1 via_FA/BRCA)	En el caso de los genes pro-apoptóticos, éstos representan a los principales blancos transcripcionales de p53 que inducen la apoptosis intrínseca en la célula, como <i>BAX</i> y <i>BAK</i> , quienes directamente inducen la permeabilización de la membrana mitocondrial y con ello la cascada de caspasas, o los miembros del grupo BH3-únicos como <i>BID</i> , <i>PUMA</i> , <i>FAS</i> y <i>NOXA</i> quienes sirven como reguladores positivos de las proteínas antes mencionadas (Aubrey <i>et al.</i> , 2018; Aubetabh <i>et al.</i> , 2022). La inhibición de estos genes se ha reportado por múltiples reguladores. Sin embargo, dentro de los principales reguladores negativos de la apoptosis se encuentran algunas proteínas de la familia de genes <i>BCL-2</i> , principalmente Bcl-2 y Bcl-X. El cuál se ha reportado que inhibe las actividades apoptóticas de Bid (Yi <i>et al.</i> , 2003), Fas (Kawahara <i>et al.</i> , 1998), Bax y Bak (Murphy <i>et al.</i> , 2000; Youle y Strasser, 2018). Adicionalmente se añadieron los nodos del complejo Ciclina B/Cdk1 y la vía FA/BRCA como inhibidores de estos genes a manera de evitar que iniciara un proceso apoptótico sin

		antes existir un evento de arresto del ciclo celular y si se contaba con una vía de reparación funcional, respectivamente.
Casp3	((PRO_ap y ICL) Casp3) & !via_FA/BRCA	La activación de la Caspasa 3 es de los últimos pasos dentro del proceso de apoptosis, con ella inicia la fragmentación del ADN, sellando el destino de la célula (Julien y Wells, 2017). Debido a esto, su activación se restringió al caso en el que solamente estuvieran activos los genes pro-apoptóticos, los cuales son quienes activan la cascada de caspasas (Flores-Romero <i>et al.</i> , 2020), y continuara sin repararse el ICL. De igual manera, con el fin de que la activación de la Caspasa 3 fuera un punto de no retorno donde la célula se comprometió a la apoptosis, se agregó a ella misma como su activador, con el fin de perpetuar su activación. Finalmente, su inhibición, al igual que los genes pro-apoptóticos, constó de si se tenía una vía FA/BRCA funcional, capaz de reparar un ICL.
CycB/Cdk1	(cMyc !(Chk1/2 p21)) & !Casp3**	El complejo Ciclina B/Cdk1 fue comprendido dentro del modelo como el nodo representativo de la proliferación celular, por lo que su activación dependía de cMyc, ya que éste regula transcripcionalmente a genes involucrados en la proliferación celular (Bretones <i>et al.</i> , 2015). De igual manera, para activarse, es suficiente que no esté la Caspasa 3, significando que la célula ya se comprometió a la apoptosis**, o cualquiera de sus inhibidores; por un lado, las cinasas Chk1/2, las cuales fosforilan, y con ello inhiben, a la activadora del complejo Ciclina B/Cdk1, la ciclina Cdc25A (Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006; Medema y Macûrek, 2012). Por otro lado, p21 es de los principales inhibidores del complejo Ciclina B/Cdk1 (Karimian <i>et al.</i> , 2016; Stark y Taylor, 2004).

**La inhibición de ciertos nodos por la Caspasa 3 fueron interacciones inferidas debido a que sin ellas existía la posibilidad de que la red llegara a un atractor diferente a la apoptosis habiendo activado al nodo de la Caspasa 3 en pasos anteriores; sin embargo, el nodo de la Caspasa 3 dentro del modelo representa el punto de no retorno de compromiso a la apoptosis.

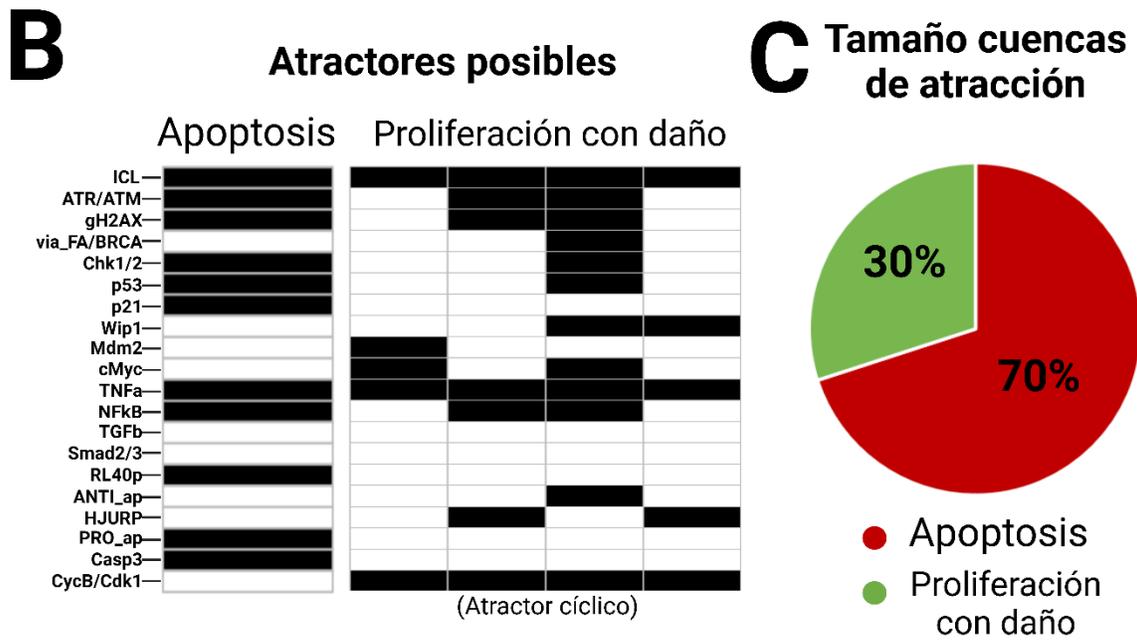
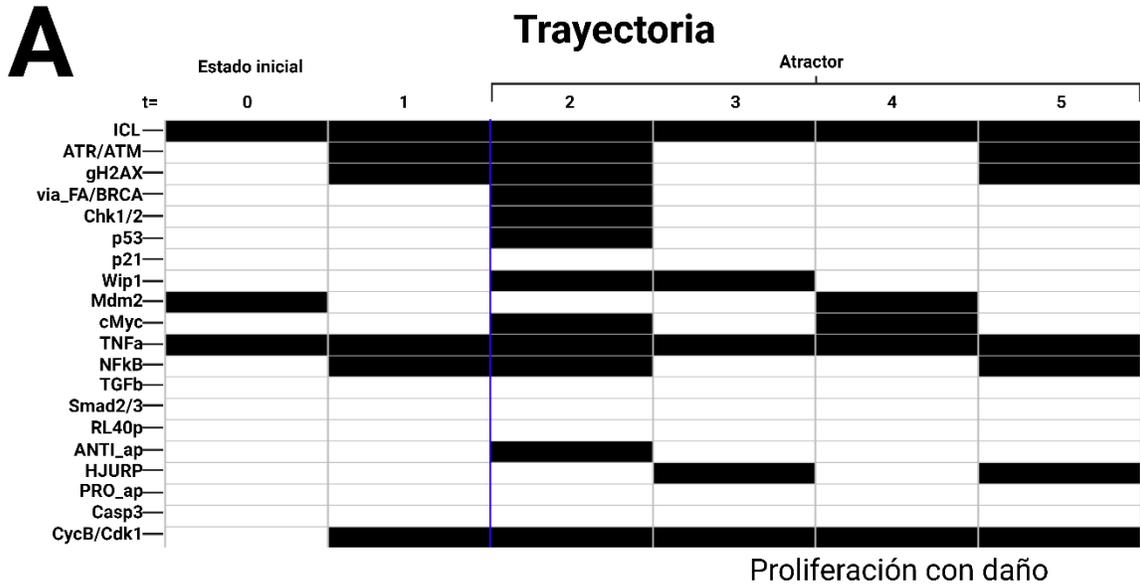


Figura Suplementaria 1. Análisis de la red PR con activación constitutiva del nodo del ICL y TNFa. (A) Análisis de trayectoria de la red con el ICL y TNFa constitutivamente activos y partiendo de un estado inicial con Mdm2 activo. (B) Atractores posibles a partir de búsqueda de cuencas de atracción y su respectivo tamaño (C).

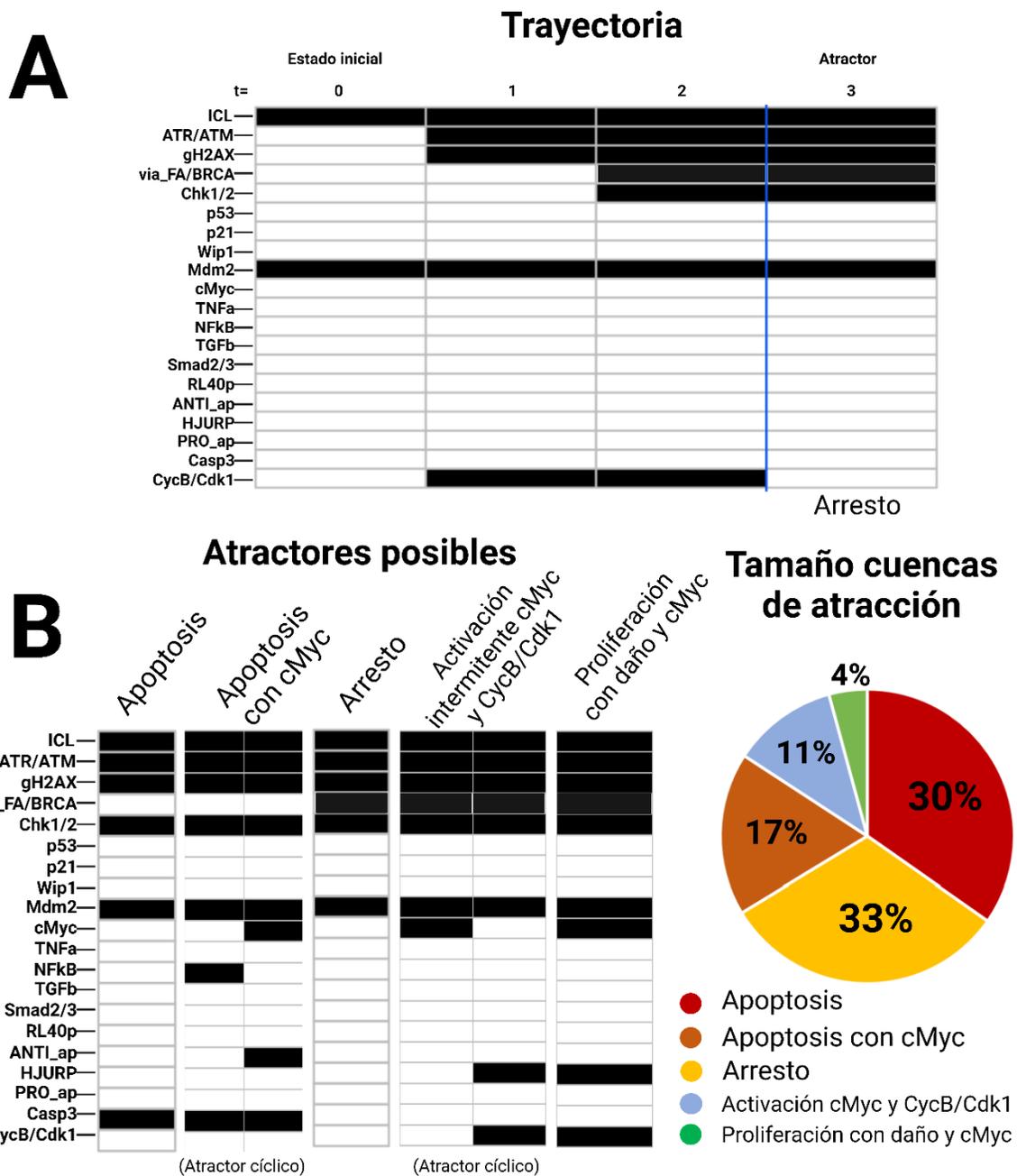


Figura Suplementaria 2. Análisis de la red PR con activación constitutiva del nodo del ICL y Mdm2. (A) Análisis de trayectoria de la red con el ICL y Mdm2 constitutivamente activos y como estado inicial. (B) Atractores posibles a partir de búsqueda de cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo y su respectivo tamaño (C).

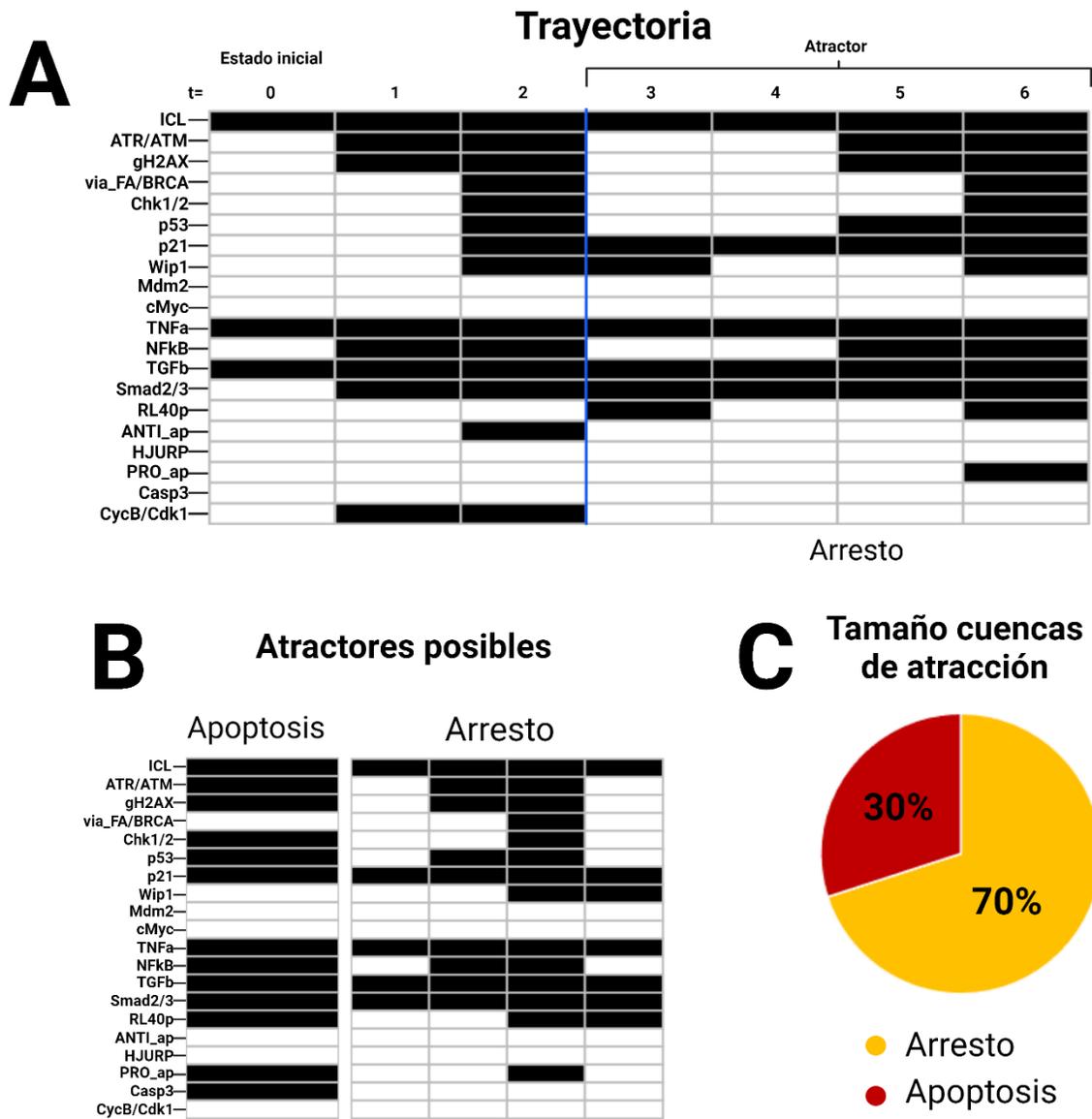
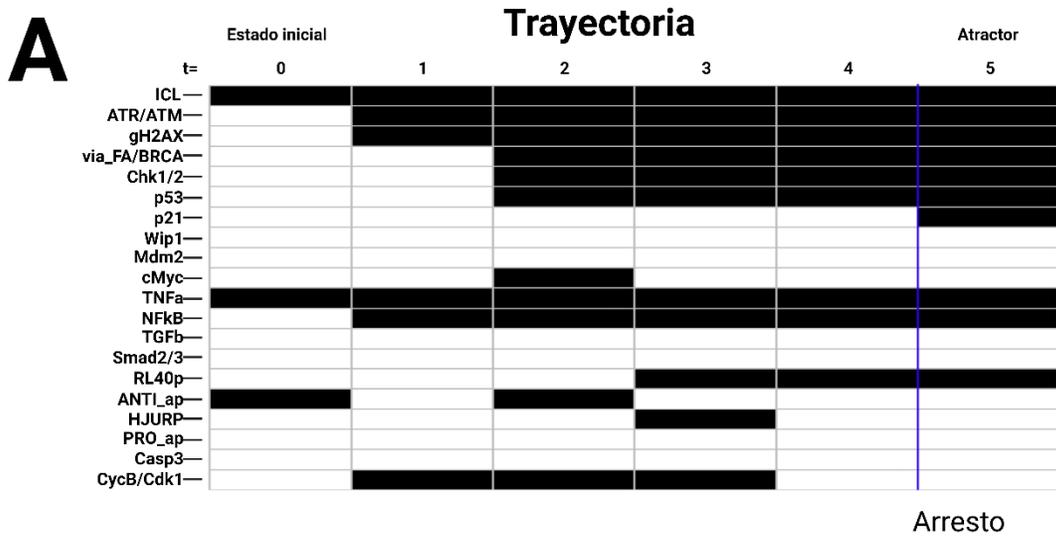
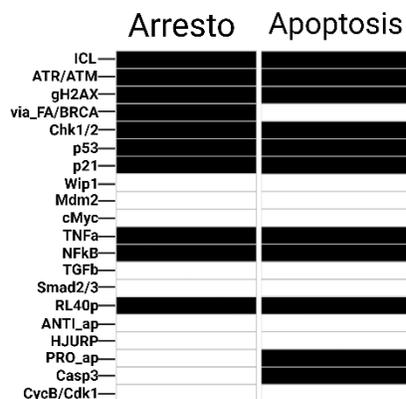


Figura Suplementaria 3. Análisis de la red PR con activación constitutiva del nodo del ICL, TNF- α y TGF β . (A) Análisis de trayectoria de la red con el ICL, TNF- α y TGF β constitutivamente activos, y Mdm2 activo como estado inicial. (B) Atractores posibles a partir de búsqueda de cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo y su respectivo tamaño (C).



B Atractores posibles



C Tamaño cuencas de atracción

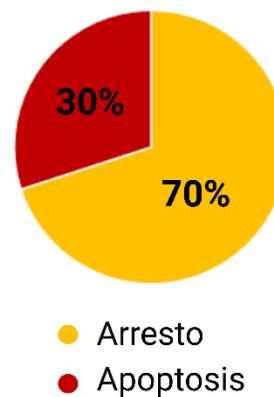


Figura Suplementaria 4. Análisis de la red PR con activación constitutiva del nodo del ICL y TNF- α e inactivación constitutiva de Wip1. (A) Análisis de trayectoria de la red con el ICL y TNF α constitutivamente activos y Mdm2 activo como estado inicial. (B) Atractores posibles a partir de búsqueda de cuencas de atracción con el ICL constitutivamente activo y su respectivo tamaño (C).

15. REFERENCIAS

- Abuetabh, Y., Wu, H. H., Chai, C., Al Yousef, H., Persad, S., Sergi, C. M., y Leng, R. (2022). DNA damage response revisited: the p53 family and its regulators provide endless cancer therapy opportunities. *Experimental y molecular medicine*, 54(10), 1658–1669. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00863-4>
- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., y Nalbant, A. (2016). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176. doi:10.3109/07388551.2015.1128
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
- Alter, B. P., y Giri, N. (2016). Thinking of VACTERL-H? Rule out Fanconi Anemia according to PHENOS. *American journal of medical genetics. Part A*, 170(6), 1520–1524. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37637>
- Atfi, A., y Baron, R. (2008). p53 brings a new twist to the Smad signaling network. *Science signaling*, 1(26), pe33. <https://doi.org/10.1126/scisignal.126pe33>
- Aubrey, B. J., Kelly, G. L., Janic, A., Herold, M. J., y Strasser, A. (2018). How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?. *Cell death and differentiation*, 25(1), 104–113. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>
- Bai, F., Zhou, H., Fu, Z., Xie, J., Hu, Y., y Nie, S. (2018). NF- κ B-induced WIP1 expression promotes colorectal cancer cell proliferation through mTOR signaling. *Biomedicine y pharmacotherapy = Biomedecine y pharmacotherapie*, 99, 402–410. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.075>
- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-Tellez, M., & Hamilton, P. W. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific reports*, 7(1), 16878. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Bloom, M. J., Saksena, S. D., Swain, G. P., Behar, M. S., Yankeelov, T. E., y Sorace, A. G. (2019). The effects of IKK-beta inhibition on early NF-kappa-B activation and transcription of downstream genes. *Cellular signalling*, 55, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.12.004>
- Bogliolo, M., Lyakhovich, A., Callén, E., Castellà, M., Cappelli, E., Ramírez, M. J., Creus, A., Marcos, R., Kalb, R., Neveling, K., Schindler, D., y Surrallés, J. (2007). Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in

the same pathway to maintain chromosome stability. *The EMBO journal*, 26(5), 1340–1351. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601574>

- Boutelle, A. M., y Attardi, L. D. (2021). p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. *Trends in cell biology*, 31(4), 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.12.011>
- Bretones, G., Delgado, M. D., y León, J. (2015). Myc and cell cycle control. *Biochimica et biophysica acta*, 1849(5), 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.013>
- Brooks, C. L., y Gu, W. (2010). New insights into p53 activation. *Cell research*, 20(6), 614–621. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.53>
- Bornholdt S. (2008). Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations. *Journal of the Royal Society, Interface*, 5 Suppl 1(Suppl 1), S85–S94. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0132.focus>
- Bulavin, D. V., Demidov, O. N., Saito, S., Kauraniemi, P., Phillips, C., Amundson, S. A., Ambrosino, C., Sauter, G., Nebreda, A. R., Anderson, C. W., Kallioniemi, A., Fornace, A. J., Jr, y Appella, E. (2002). Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nature genetics*, 31(2), 210–215. <https://doi.org/10.1038/ng894>
- Calzone, L., Tournier, L., Fourquet, S., Thieffry, D., Zhivotovsky, B., Barillot, E., y Zinovyev, A. (2010). Mathematical modelling of cell-fate decision in response to death receptor engagement. *PLoS computational biology*, 6(3), e1000702. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000702>
- Carrington, E. M., Zhan, Y., Brady, J. L., Zhang, J. G., Sutherland, R. M., Anstee, N. S., Schenk, R. L., Vikstrom, I. B., Delconte, R. B., Segal, D., Huntington, N. D., Bouillet, P., Tarlinton, D. M., Huang, D. C., Strasser, A., Cory, S., Herold, M. J., y Lew, A. M. (2017). Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. *Cell death and differentiation*, 24(5), 878–888. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.30>
- Castella, M., Pujol, R., Callén, E., Trujillo, J. P., Casado, J. A., Gille, H., Lach, F. P., Auerbach, A. D., Schindler, D., Benítez, J., Porto, B., Ferro, T., Muñoz, A., Sevilla, J., Madero, L., Cela, E., Beléndez, C., de Heredia, C. D., Olivé, T., de Toledo, J. S., ... Surrallés, J. (2011). Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. *Blood*, 117(14), 3759–3769. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-299917>
- Cha, H., Lowe, J. M., Li, H., Lee, J. S., Belova, G. I., Bulavin, D. V., y Fornace, A. J., Jr (2010). Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response. *Cancer research*, 70(10), 4112–4122. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4244>

- Chen, H., Wang, G., Simha, R. et al. Boolean Models of Biological Processes Explain Cascade-Like Behavior. *Sci Rep* 6, 20067 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep20067>
- Chen, T., Huang, H., Zhou, Y., Geng, L., Shen, T., Yin, S., Zhou, L., y Zheng, S. (2018). HJURP promotes hepatocellular carcinoma proliferation by destabilizing p21 via the MAPK/ERK1/2 and AKT/GSK3 β signaling pathways. *Journal of experimental y clinical cancer research : CR*, 37(1), 193. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0866-4>
- Chew, J., Biswas, S., Shreeram, S., Humaidi, M., Wong, E. T., Dhillon, M. K., Teo, H., Hazra, A., Fang, C. C., López-Collazo, E., Bulavin, D. V., y Tergaonkar, V. (2009). WIP1 phosphatase is a negative regulator of NF-kappaB signalling. *Nature cell biology*, 11(5), 659–666. <https://doi.org/10.1038/ncb1873>
- Chong, K. H., Samarasinghe, S., y Kulasiri, D. (2015). Mathematical modelling of p53 basal dynamics and DNA damage response. *Mathematical biosciences*, 259, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2014.10.010>
- Clémenson, C., y Marsolier-Kergoat, M.-C. (2009). DNA damage checkpoint inactivation: Adaptation and recovery. *DNA Repair*, 8(9), 1101–1109. doi:10.1016/j.dnarep.2009.04.0
- Crespi, V. Galstyan, A., y Lerman, K. (2005). Comparative analysis of top-down and bottom-up methodologies for multi-agent system design. In *Proceedings of the fourth international joint conference on Autonomous agents and multiagent systems (AAMAS '05)*. Association for Computing Machinery, New York, NY, USA, 1159–1160. <https://doi.org/10.1145/1082473.1082672>
- Dhanasekaran, R., Deutzmann, A., Mahauad-Fernandez, W. D., Hansen, A. S., Gouw, A. M., y Felsher, D. W. (2022). The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nature reviews. Clinical oncology*, 19(1), 23–36. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00549-2>
- Deb, S. P., Singh, S., y Deb, S. (2014). MDM2 overexpression, activation of signaling networks, and cell proliferation. *Sub-cellular biochemistry*, 85, 215–234. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9211-0_12
- Derynck, R., y Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 425(6958), 577–584. <https://doi.org/10.1038/nature02006>
- Du, W., Erden, O., y Pang, Q. (2014). TNF- α signaling in Fanconi anemia. *Blood cells, molecules y diseases*, 52(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2013.06.005>
- Duwal, S., y von Kleist, M. (2016). Top-down and bottom-up modeling in system pharmacology to understand clinical efficacy: An example with NRTIs of HIV-1. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 94, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.01.016>

- Eischen, C. M., Packham, G., Nip, J., Fee, B. E., Hiebert, S. W., Zambetti, G. P., y Cleveland, J. L. (2001). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. *Oncogene*, 20(48), 6983–6993.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204892>
- Ellenrieder V. (2008). TGFbeta regulated gene expression by Smads and Sp1/KLF-like transcription factors in cancer. *Anticancer research*, 28(3A), 1531–1539.
- Elston, R., y Inman, G. J. (2012). Crosstalk between p53 and TGF-β Signalling. *Journal of signal transduction*, 2012, 294097.
<https://doi.org/10.1155/2012/294097>.
- Engeland K. (2018). Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell death and differentiation*, 25(1), 114–132. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.172>
- Engeland K. (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell death and differentiation*, 29(5), 946–960. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00988-z>
- Faruq, O., Zhao, D., Shrestha, M., Vecchione, A., Zacksenhaus, E., y Chang, H. (2022). Targeting an MDM2/MYC Axis to Overcome Drug Resistance in Multiple Myeloma. *Cancers*, 14(6), 1592.
<https://doi.org/10.3390/cancers14061592>
- Feng, Y. C., Liu, X. Y., Teng, L., Ji, Q., Wu, Y., Li, J. M., Gao, W., Zhang, Y. Y., La, T., Tabatabaee, H., Yan, X. G., Jamaluddin, M. F. B., Zhang, D., Guo, S. T., Scott, R. J., Liu, T., Thorne, R. F., Zhang, X. D., y Jin, L. (2020). c-Myc inactivation of p53 through the pan-cancer lncRNA MILIP drives cancer pathogenesis. *Nature communications*, 11(1), 4980.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-18735-8>
- Fiscella, M., Zhang, H., Fan, S., Sakaguchi, K., Shen, S., Mercer, W. E., Vande Woude, G. F., O'Connor, P. M., y Appella, E. (1997). Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), 6048–6053.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6048>
- Flores-Romero, H., Ros, U., y Garcia-Saez, A. J. (2020). Pore formation in regulated cell death. *The EMBO journal*, 39(23), e105753.
<https://doi.org/10.15252/embj.2020105753>
- Friboulet, A., y Thomas, D. (2005). Systems Biology-an interdisciplinary approach. *Biosensors y bioelectronics*, 20(12), 2404–2407.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.11.014>
- García-de-Teresa, B., Rodríguez, A., y Frias, S. (2020). Chromosome Instability in Fanconi Anemia: From Breaks to Phenotypic Consequences. *Genes*, 11(12), 1528. <https://doi.org/10.3390/genes11121528>

- Greaves, M., Maley, C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* 481, 306–313. <https://doi.org/10.1038/nature10762>
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., y Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1897, 299–311. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_26
- Hafner, A., Stewart-Ornstein, J., Purvis, J. E., Forrester, W. C., Bulyk, M. L., y Lahav, G. (2017). p53 pulses lead to distinct patterns of gene expression albeit similar DNA-binding dynamics. *Nature structural y molecular biology*, 24(10), 840–847. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3452>
- Harris, S. L., y Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17), 2899–2908. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208615>
- Hat, B., Kočańczyk, M., Bogdał, M. N., y Lipniacki, T. (2016). Feedbacks, Bifurcations, and Cell Fate Decision-Making in the p53 System. *PLoS computational biology*, 12(2), e1004787. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004787>
- He, G., Siddik, Z. H., Huang, Z., Wang, R., Koomen, J., Kobayashi, R., Khokhar, A. R., y Kuang, J. (2005). Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene*, 24(18), 2929–2943. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208474>
- Hebbar, A., Moger, A., Hari, K., y Jolly, M. K. (2022). Robustness in phenotypic plasticity and heterogeneity patterns enabled by EMT networks. *Biophysical journal*, 121(19), 3600–3615. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.07.017>
- Hemann, M. T., y Lowe, S. W. (2006). The p53-Bcl-2 connection. *Cell death and differentiation*, 13(8), 1256–1259. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401962>
- Hickman, G. J., y Hodgman, T. C. (2009). Inference of gene regulatory networks using boolean-network inference methods. *Journal of bioinformatics and computational biology*, 7(6), 1013–1029. <https://doi.org/10.1142/s0219720009004448>
- Ho, J. S., Ma, W., Mao, D. Y., y Benchimol, S. (2005). p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Molecular and cellular biology*, 25(17), 7423–7431. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.17.7423-7431.2005>
- Hoffman, B., y Liebermann, D. A. (2008). Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene*, 27(50), 6462–6472. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.312>
- Hou, H., Sun, D., y Zhang, X. (2019). The role of MDM2 amplification and overexpression in therapeutic resistance of malignant tumors. *Cancer cell international*, 19, 216. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0937-4>

- Jackson, S. P., y Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071–1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jonak, K., Kurpas, M., Szoltysek, K., Janus, P., Abramowicz, A., y Puszynski, K. (2016). A novel mathematical model of ATM/p53/NF- κ B pathways points to the importance of the DDR switch-off mechanisms. *BMC systems biology*, 10(1), 75. <https://doi.org/10.1186/s12918-016-0293-0>
- Julien, O., y Wells, J. A. (2017). Caspases and their substrates. *Cell death and differentiation*, 24(8), 1380–1389. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44>
- Kadakia, M., Brown, T. L., McGorry, M. M., y Berberich, S. J. (2002). MdmX inhibits Smad transactivation. *Oncogene*, 21(57), 8776–8785. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205993>
- Kale, J., Osterlund, E. J., y Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell death and differentiation*, 25(1), 65–80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>
- Karimian, A., Ahmadi, Y., y Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA repair*, 42, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008>
- Karlsson-Rosenthal, C., y Millar, J. B. (2006). Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. *Trends in cell biology*, 16(6), 285–292. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.04.002>
- Kass, E. M., y Jasin, M. (2010). Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS letters*, 584(17), 3703–3708. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.057>
- Kawahara, A., Kobayashi, T., y Nagata, S. (1998). Inhibition of Fas-induced apoptosis by Bcl-2. *Oncogene*, 17(20), 2549–2554. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202192>
- Kawarada, Y., Inoue, Y., Kawasaki, F., Fukuura, K., Sato, K., Tanaka, T., Itoh, Y., y Hayashi, H. (2016). TGF- β induces p53/Smads complex formation in the PAI-1 promoter to activate transcription. *Scientific reports*, 6, 35483. <https://doi.org/10.1038/srep35483>
- Khan, S., Lopez-Dee, Z., Kumar, R., y Ling, J. (2013). Activation of NF κ B is a novel mechanism of pro-survival activity of glucocorticoids in breast cancer cells. *Cancer letters*, 337(1), 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.05.020>
- Kim, D. W., Gazourian, L., Quadri, S. A., Romieu-Mourez, R., Sherr, D. H., y Sonenshein, G. E. (2000). The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. *Oncogene*, 19(48), 5498–5506. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203945>
- Kim, M.-R., Lee, J., An, Y. S., Jin, Y. B., Park, I.-C., Chung, E., ... Yi, J. Y. (2014). TGF β 1 Protects Cells from γ -IR by Enhancing the Activity of the NHEJ

Repair Pathway. *Molecular Cancer Research*, 13(2), 319–329.

doi:10.1158/1541-7786.mcr-14-0098-t

- Klapproth, K., Sander, S., Marinkovic, D., Baumann, B., y Wirth, T. (2009). The IKK2/NF- κ B pathway suppresses MYC-induced lymphomagenesis. *Blood*, 114(12), 2448–2458. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-181008>
- Kowalik T. F. (2002). Smad about E2F. TGFbeta repression of c-Myc via a Smad3/E2F/p107 complex. *Molecular cell*, 10(1), 7–8. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00584-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00584-1)
- Kuttler, C. (2009). *Mathematical Models in Biology*.
- Ladokhin A. S. (2020). Regulation of Apoptosis by the Bcl-2 Family of Proteins: Field on a Brink. *Cells*, 9(9), 2121. <https://doi.org/10.3390/cells9092121>
- Lan, H. Y., y Chung, A. C. K. (2011). Transforming growth factor- β and Smads. *Contributions to nephrology*, 170, 75–82. <https://doi.org/10.1159/000324949>
- Lee, R. E., Qasaimeh, M. A., Xia, X., Juncker, D., y Gaudet, S. (2016). NF- κ B signalling and cell fate decisions in response to a short pulse of tumour necrosis factor. *Scientific reports*, 6, 39519. <https://doi.org/10.1038/srep39519>
- Lensch, M. W., Rathbun, R. K., Olson, S. B., Jones, G. R., y Bagby, G. C., Jr (1999). Selective pressure as an essential force in molecular evolution of myeloid leukemic clones: a view from the window of Fanconi anemia. *Leukemia*, 13(11), 1784–1789. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401586>
- Liao, P., Zeng, S. X., Zhou, X., Chen, T., Zhou, F., Cao, B., Jung, J. H., Del Sal, G., Luo, S., y Lu, H. (2017). Mutant p53 Gains Its Function via c-Myc Activation upon CDK4 Phosphorylation at Serine 249 and Consequent PIN1 Binding. *Molecular cell*, 68(6), 1134–1146.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.006>
- Liu, Y., Deisenroth, C., y Zhang, Y. (2016). RP-MDM2-p53 Pathway: Linking Ribosomal Biogenesis and Tumor Surveillance. *Trends in cancer*, 2(4), 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.03.002>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., y Sun, S. C. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2, 17023–. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Lowe, J. M., Cha, H., Yang, Q., y Fornace, A. J., Jr (2010). Nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is a novel positive transcriptional regulator of the oncogenic Wip1 phosphatase. *The Journal of biological chemistry*, 285(8), 5249–5257. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.034579>
- Lu, X., Ma, O., Nguyen, T. A., Jones, S. N., Oren, M., y Donehower, L. A. (2007). The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer cell*, 12(4), 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.033>

- Lyakhovich, A., y Surrallés, J. (2007). New roads to FA/BRCA pathway: H2AX. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(9), 1019–1023. <https://doi.org/10.4161/cc.6.9.4223>
- Macurek, L., Benada, J., Müllers, E., Halim, V. A., Krejčíková, K., Burdová, K., Pecháčková, S., Hodný, Z., Lindqvist, A., Medema, R. H., y Bartek, J. (2013). Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(2), 251–262. <https://doi.org/10.4161/cc.23057>
- Macurek, L., Lindqvist, A., Voets, O., Kool, J., Vos, H. R., y Medema, R. H. (2010). Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene*, 29(15), 2281–2291. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.501>
- Madapura, H. S., Salamon, D., Wiman, K. G., Lain, S., Klein, E., y Nagy, N. (2016). cMyc-p53 feedback mechanism regulates the dynamics of T lymphocytes in the immune response. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 15(9), 1267–1275. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1160975>
- Maréchal, A., y Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(9), a012716. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716>
- Mattson, M. P., y Meffert, M. K. (2006). Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell death and differentiation*, 13(5), 852–860. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401837>
- Medema, R. H., y Macurek, L. (2011). Checkpoint recovery in cells: how a molecular understanding can help in the fight against cancer. *F1000 biology reports*, 3, 10. <https://doi.org/10.3410/B3-10>
- Medema, R. H., y Macurek, L. (2012). Checkpoint control and cancer. *Oncogene*, 31(21), 2601–2613. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.451>
- Mehta, P. A., y Ebens, C. (2002). Fanconi Anemia. In M. P. Adam (Eds.) et al., *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle.
- Meng, X., Franklin, D. A., Dong, J., y Zhang, Y. (2014). MDM2-p53 pathway in hepatocellular carcinoma. *Cancer research*, 74(24), 7161–7167. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1446>
- Meulmeester, E., Pereg, Y., Shiloh, Y., y Jochemsen, A. G. (2005). ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 4(9), 1166–1170. <https://doi.org/10.4161/cc.4.9.1981>
- Murphy, K. M., Ranganathan, V., Farnsworth, M. L., Kavallaris, M., y Lock, R. B. (2000). Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell death and differentiation*, 7(1), 102–111. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400597>

- Muessel C, Hopfensitz M, Kestler HA (2010). “BoolNet - an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks.” *Bioinformatics*, 26(10), 1378–1380. doi:10.1093/bioinformatics/btq124.
- Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M., y Zhang, R. (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of biomedical research*, 27(4), 254–271. <https://doi.org/10.7555/JBR.27.20130030>
- Nakamura Y. (1998). ATM: the p53 booster. *Nature medicine*, 4(11), 1231–1232. <https://doi.org/10.1038/3207>
- Nelson, D. E., Ihekweaba, A. E., Elliott, M., Johnson, J. R., Gibney, C. A., Foreman, B. E., Nelson, G., See, V., Horton, C. A., Spiller, D. G., Edwards, S. W., McDowell, H. P., Unitt, J. F., Sullivan, E., Grimley, R., Benson, N., Broomhead, D., Kell, D. B., y White, M. R. (2004). Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5696), 704–708. <https://doi.org/10.1126/science.1099962>
- Nepal, M., Che, R., Zhang, J., Ma, C., y Fei, P. (2017). Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends in cancer*, 3(12), 840–856. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.10.005>
- Nie, Z., Hu, G., Wei, G., Cui K, Yamane, A., Resch, W., et al. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell*. 2012; 151:68–79. [PubMed: 23021216]
- Nilsson, J. A., y Cleveland, J. L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene*, 22(56), 9007–9021. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207261>
- Nirmal, A.J., Chen, Y., y Sokolov, A. (2022). labsyspharm/scimap: Release-0.22.0 (0.22.0). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6615230>
- Nowicka, M., Krieg, C., Crowell, H. L., Weber, L. M., Hartmann, F. J., Guglietta, S., Becher, B., Levesque, M. P., y Robinson, M. D. (2017). CyTOF workflow: differential discovery in high-throughput high-dimensional cytometry datasets. *F1000Research*, 6, 748. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11622.3>
- Oghabi Bakhshaiesh, T., Majidzadeh-A, K., y Esmaeili, R. (2017). Wip1: A candidate phosphatase for cancer diagnosis and treatment. *DNA repair*, 54, 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.03.004>
- Oostra, A. B., Nieuwint, A. W., Joenje, H., y de Winter, J. P. (2012). Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia*, 2012, 238731. <https://doi.org/10.1155/2012/238731>
- Pardali, K., Kowanzetz, M., Heldin, C. H., y Moustakas, A. (2005). Smad pathway-specific transcriptional regulation of the cell cycle inhibitor p21(WAF1/Cip1). *Journal of cellular physiology*, 204(1), 260–272. <https://doi.org/10.1002/jcp.20304>

- Porter, J. R., Fisher, B. E., y Batchelor, E. (2016). p53 Pulses Diversify Target Gene Expression Dynamics in an mRNA Half-Life-Dependent Manner and Delineate Co-regulated Target Gene Subnetworks. *Cell systems*, 2(4), 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.03.006>
- Purvis, J. E., Karhohs, K. W., Mock, C., Batchelor, E., Loewer, A., y Lahav, G. (2012). p53 dynamics control cell fate. *Science (New York, N.Y.)*, 336(6087), 1440–1444. <https://doi.org/10.1126/science.1218351>
- Reisman, D., Elkind, N. B., Roy, B., Beamon, J., y Rotter, V. (1993). c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell growth y differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 4(2), 57–65.
- Regula, K. M., Ens, K., y Kirshenbaum, L. A. (2002). IKK beta is required for Bcl-2-mediated NF-kappa B activation in ventricular myocytes. *The Journal of biological chemistry*, 277(41), 38676–38682. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206175200>
- Ricca, A., Biroccio, A., Del Bufalo, D., Mackay, A. R., Santoni, A., y Cippitelli, M. (2000). bcl-2 over-expression enhances NF-kappaB activity and induces mmp-9 transcription in human MCF7(ADR) breast-cancer cells. *International journal of cancer*, 86(2), 188–196. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(20000415\)86:2<188::aid-ijc7>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(20000415)86:2<188::aid-ijc7>3.0.co;2-w)
- Rodríguez, A., Epperly, M., Filiatrault, J., Velázquez, M., Yang, C., McQueen, K., Sambel, L. A., Nguyen, H., Iyer, D. R., Juárez, U., Ayala-Zambrano, C., Martignetti, D. B., Frías, S., Fisher, R., Parmar, K., Greenberger, J. S., y D'Andrea, A. D. (2022). TGFβ pathway is required for viable gestation of Fanconi anemia embryos. *PLoS genetics*, 18(11), e1010459. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010459>
- Rodríguez, A., Naveja, J. J., Torres, L., García de Teresa, B., Juárez-Figueroa, U., Ayala-Zambrano, C., Azpeitia, E., Mendoza, L., y Frías, S. (2019). WIP1 Contributes to the Adaptation of Fanconi Anemia Cells to DNA Damage as Determined by the Regulatory Network of the Fanconi Anemia and Checkpoint Recovery Pathways. *Frontiers in genetics*, 10, 411. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00411>
- Rodríguez, A., Sosa, D., Torres, L., Molina, B., Frías, S., y Mendoza, L. (2012). A Boolean network model of the FA/BRCA pathway. *Bioinformatics*, 28(6), 858–866. doi:10.1093/bioinformatics/bts036
- Rodríguez, A., Zhang, K., Färkkilä, A., Filiatrault, J., Yang, C., Velázquez, M., Furutani, E., Goldman, D. C., García de Teresa, B., Garza-Mayén, G., McQueen, K., Sambel, L. A., Molina, B., Torres, L., González, M., Vadillo, E., Pelayo, R., Fleming, W. H., Grompe, M., Shimamura, A., ... D'Andrea, A. D. (2021). MYC Promotes Bone Marrow Stem Cell Dysfunction in Fanconi

Anemia. *Cell stem cell*, 28(1), 33–47.e8.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.004>

- Saadoun, C., Nouadi, B., Hamdaoui, H., Chegdani, F., y Bennis, F. (2022). Multiple Myeloma: Bioinformatic Analysis for Identification of Key Genes and Pathways. *Bioinformatics and biology insights*, 16, 11779322221115545.

<https://doi.org/10.1177/11779322221115545>

- Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S., Elble, R., Watabe, K., y Mo, Y. Y. (2009). p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3207–3212.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0808042106>

- Sakai, H., Fujigaki, H., Mazur, S. J., y Appella, E. (2014). Wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) forestalls cellular premature senescence at physiological oxygen levels by regulating DNA damage response signaling during DNA replication. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(6), 1015–1029.

<https://doi.org/10.4161/cc.27920>

- Salehi, Z., Talebi, S., Maleknia, S., Palizban, F., Naser Moghadasi, A., Kavousi, K., Sahraian, M. A., y Izad, M. (2021). RNA Sequencing of CD4+ T Cells in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients at Relapse: Deciphering the Involvement of Novel genes and Pathways. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 71(12), 2628–2645.

<https://doi.org/10.1007/s12031-021-01878-8>

- Salminen, A., y Kaarniranta, K. (2011). Control of p53 and NF- κ B signaling by WIP1 and MIF: role in cellular senescence and organismal aging. *Cellular signalling*, 23(5), 747–752. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.012>

- Scully, R., Panday, A., Elango, R., y Willis, N. A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(11), 698–714.

<https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0>

- Schmidt E. V. (1999). The role of c-myc in cellular growth control.

Oncogene, 18(19), 2988–2996. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202751>

- Sebert, M., Gachet, S., Leblanc, T., Rousseau, A., Bluteau, O., Kim, R., Ben Abdelali, R., Sicre de Fontbrune, F., Maillard, L., Fedronie, C., Murigneux, V., Bellenger, L., Naouar, N., Quentin, S., Hernandez, L., Vasquez, N., Da Costa, M., Prata, P. H., Larcher, L., de Tersant, M., ... Soulier, J. (2023). Clonal hematopoiesis driven by chromosome 1q/MDM4 trisomy defines a canonical route toward leukemia in Fanconi anemia. *Cell stem cell*, 30(2), 153–170.e9.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2023.01.006>

- Shen, X. F., Zhao, Y., Jiang, J. P., Guan, W. X., y Du, J. F. (2017).

Phosphatase Wip1 in Immunity: An Overview and Update. *Frontiers in immunology*, 8, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00008>

- Shiloh, Y., y Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(4), 197–210.
- Shreeram, S., Hee, W. K., Demidov, O. N., Kek, C., Yamaguchi, H., Fornace, A. J., Jr, Anderson, C. W., Appella, E., y Bulavin, D. V. (2006). Regulation of ATM/p53-dependent suppression of myc-induced lymphomas by Wip1 phosphatase. *The Journal of experimental medicine*, 203(13), 2793–2799. <https://doi.org/10.1084/jem.20061563>
- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N., y Gillespie, D. A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Advances in cancer research*, 108, 73–112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0>
- Stark, G. R., y Taylor, W. R. (2004). Analyzing the G2/M checkpoint. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 280, 51–82. <https://doi.org/10.1385/1-59259-788-2:051>
- Stein, C. M., Weiskirchen, R., Damm, F., y Strzelecka, P. M. (2021). Single-cell omics: Overview, analysis, and application in biomedical science. *Journal of cellular biochemistry*, 122(11), 1571–1578. <https://doi.org/10.1002/jcb.30134>
- Schwab, J. D., Kühlwein, S. D., Ikonomi, N., Köhl, M., y Kestler, H. A. (2020). Concepts in Boolean network modeling: What do they all mean?. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 571–582. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.03.001>
- Semlow, D. R., y Walter, J. C. (2021). Mechanisms of Vertebrate DNA Interstrand Cross-Link Repair. *Annual review of biochemistry*, 90, 107–135. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-080320-112510>
- Seol, J. H., Shim, E. Y., y Lee, S. E. (2018). Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. *Mutation research*, 809, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002>
- Shen, Y., y White, E. (2001). p53-dependent apoptosis pathways. *Advances in cancer research*, 82, 55–84. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(01\)82002-9](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(01)82002-9)
- Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L., y Dang, C. V. (2015). MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer discovery*, 5(10), 1024–1039. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0507>
- Shi, L., Tian, Q., Feng, C., Zhang, P., y Zhao, Y. (2020). The biological function and the regulatory roles of wild-type p53-induced phosphatase 1 in immune system. *International reviews of immunology*, 39(6), 280–291. <https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1795153>
- Shi, Y., y Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685–700. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00432-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00432-x)

- Tomlin, C. J., y Axelrod, J. D. (2007). Biology by numbers: mathematical modelling in developmental biology. *Nature reviews. Genetics*, 8(5), 331–340. <https://doi.org/10.1038/nrg2098>
- van Riggelen J, Yetil A, Felsher DW. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nature reviews Cancer*. 2010; 10:301–9. [PubMed: 20332779]
- Vasquez K. M. (2010). Targeting and processing of site-specific DNA interstrand crosslinks. *Environmental and molecular mutagenesis*, 51(6), 527–539. <https://doi.org/10.1002/em.20557>
- Viatour, P., Bentires-Alj, M., Chariot, A., Deregowski, V., de Leval, L., Merville, M. P., y Bours, V. (2003). NF- kappa B2/p100 induces Bcl-2 expression. *Leukemia*, 17(7), 1349–1356. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402982>
- Warren, C., Wong-Brown, M. W., y Bowden, N. A. (2019). BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell death y disease*, 10(3), 177. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1407-6>
- Webster, A. L. H., Sanders, M. A., Patel, K., Dietrich, R., Noonan, R. J., Lach, F. P., White, R. R., Goldfarb, A., Hadi, K., Edwards, M. M., Donovan, F. X., Hoogenboezem, R. M., Jung, M., Sridhar, S., Wiley, T. F., Fedrigo, O., Tian, H., Rosiene, J., Heineman, T., Kennedy, J. A., ... Smogorzewska, A. (2022). Genomic signature of Fanconi anaemia DNA repair pathway deficiency in cancer. *Nature*, 612(7940), 495–502. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05253-4>
- P.P. Wong, F. Miranda, K.V. Chan, C. Berlato, H.C. Hurst, A.G. Scibetta. Histone demethylase KDM5B collaborates with TFAP2C and Myc to repress the cell cycle inhibitor p21(cip) (CDKN1A) *Mol Cell Biol*, 32 (2012), pp. 1633-1644.
- Uwe Schmidt, Martin Weigert, Coleman Broaddus, and Gene Myers. [Cell Detection with Star-convex Polygons](#). International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention (MICCAI), Granada, Spain, September 2018
- Uyanik, B., Grigorash, B. B., Goloudina, A. R., y Demidov, O. N. (2017). DNA damage-induced phosphatase Wip1 in regulation of hematopoiesis, immune system and inflammation. *Cell death discovery*, 3, 17018. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.18>
- Vanderwerf, S. M., Svahn, J., Olson, S., Rathbun, R. K., Harrington, C., Yates, J., Keeble, W., Anderson, D. C., Anur, P., Pereira, N. F., Pilonetto, D. V., Pasquini, R., y Bagby, G. C. (2009). TLR8-dependent TNF-(alpha) overexpression in Fanconi anemia group C cells. *Blood*, 114(26), 5290–5298. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-222414>
- Wang, F., Chen, X., Yu, X., y Lin, Q. (2019). Degradation of CCNB1 mediated by APC11 through UBA52 ubiquitination promotes cell cycle

progression and proliferation of non-small cell lung cancer cells. *American journal of translational research*, 11(11), 7166–7185.

- Wang, Y., Wang, X., Zhao, H., Liang, B., y Du, Q. (2012). Clusterin confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in breast cancer cells through NF-kappaB activation and Bcl-2 overexpression. *Journal of chemotherapy* (Florence, Italy), 24(6), 348–357.

<https://doi.org/10.1179/1973947812Y.0000000049>

- Wang, H., Zhang, X., Teng, L., y Legerski, R. J. (2015). DNA damage checkpoint recovery and cancer development. *Experimental cell research*, 334(2), 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.03.011>
- Wang, N., Zhang, Q., Luo, L., Ning, B., y Fang, Y. (2018). β -asarone inhibited cell growth and promoted autophagy via P53/Bcl-2/Bclin-1 and P53/AMPK/mTOR pathways in Human Glioma U251 cells. *Journal of cellular physiology*, 233(3), 2434–2443. <https://doi.org/10.1002/jcp.26118>
- Wolf, F. A., Hamey, F. K., Plass, M., Solana, J., Dahlin, J. S., Göttgens, B., Rajewsky, N., Simon, L., & Theis, F. J. (2019). PAGA: graph abstraction reconciles clustering with trajectory inference through a topology preserving map of single cells. *Genome biology*, 20(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1663-x>
- Wei, Y., Ouyang, G. L., Yao, W. X., Zhu, Y. J., Li, X., Huang, L. X., Yang, X. W., y Jiang, W. J. (2019). Knockdown of HJURP inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation, migration, and invasion by repressing Wnt/ β -catenin signaling. *European review for medical and pharmacological sciences*, 23(9), 3847–3856. https://doi.org/10.26355/eurrev_201905_17812
- Wu, T., Wang, G., Chen, W., Zhu, Z., Liu, Y., Huang, Z., Huang, Y., Du, P., Yang, Y., Liu, C. Y., y Cui, L. (2018). Co-inhibition of BET proteins and NF- κ B as a potential therapy for colorectal cancer through synergistic inhibiting MYC and FOXM1 expressions. *Cell death y disease*, 9(3), 315. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0354-y>
- Yagi, K., Furuhashi, M., Aoki, H., Goto, D., Kuwano, H., Sugamura, K., Miyazono, K., y Kato, M. (2002). c-myc is a downstream target of the Smad pathway. *The Journal of biological chemistry*, 277(1), 854–861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104170200>
- Yam, C. H., Siu, W. Y., Arooz, T., Chiu, C. H., Lau, A., Wang, X. Q., y Poon, R. Y. (1999). MDM2 and MDMX inhibit the transcriptional activity of ectopically expressed SMAD proteins. *Cancer research*, 59(20), 5075–5078.
- Yang, N., Sun, T., y Shen, P. (2020). Deciphering p53 dynamics and cell fate in DNA damage response using mathematical modeling. *Genome Instability y Disease*, 1, 265 - 277.
- Yi, X., Yin, X. M., y Dong, Z. (2003). Inhibition of Bid-induced apoptosis by Bcl-2. tBid insertion, Bax translocation, and Bax/Bak oligomerization

- suppressed. *The Journal of biological chemistry*, 278(19), 16992–16999.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M300039200>
- Yoshida G. J. (2018). Emerging roles of Myc in stem cell biology and novel tumor therapies. *Journal of experimental y clinical cancer research : CR*, 37(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0835-y>
 - Youle, R. J., y Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(1), 47–59. <https://doi.org/10.1038/nrm2308>
 - Yue, X., Bai, C., Xie, D., Ma, T., y Zhou, P. K. (2020). DNA-PKcs: A Multi-Faceted Player in DNA Damage Response. *Frontiers in genetics*, 11, 607428. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.607428>
 - Zhang, C., Chen, Z., Meng, X., Li, M., Zhang, L., y Huang, A. (2017). The involvement and possible mechanism of pro-inflammatory tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in thoracic ossification of the ligamentum flavum. *PloS one*, 12(6), e0178986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178986>
 - Zhang, H., Kozono, D. E., O'Connor, K. W., Vidal-Cardenas, S., Rousseau, A., Hamilton, A., Moreau, L., Gaudiano, E. F., Greenberger, J., Bagby, G., Soulier, J., Grompe, M., Parmar, K., y D'Andrea, A. D. (2016). TGF- β Inhibition Rescues Hematopoietic Stem Cell Defects and Bone Marrow Failure in Fanconi Anemia. *Cell stem cell*, 18(5), 668–681.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.002>
 - Zhao, B., Rothenberg, E., Ramsden, D. A., y Lieber, M. R. (2020). The molecular basis and disease relevance of non-homologous DNA end joining. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(12), 765–781.
<https://doi.org/10.1038/s41580-020-00297-8>
 - Zhou, Q., Hou, Z., Zuo, S., Zhou, X., Feng, Y., Sun, Y., y Yuan, X. (2019). LUCAT1 promotes colorectal cancer tumorigenesis by targeting the ribosomal protein L40-MDM2-p53 pathway through binding with UBA52. *Cancer science*, 110(4), 1194–1207. <https://doi.org/10.1111/cas.13951>