

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IMPLICACIONES DE LA RUTA DE ANEMIA DE FANCONI EN LA
RESPUESTA CELULAR A TETRAHIDROISOQUINOLINAS
ANTITUMORALES QUE INTERACCIONAN CON EL ADN

TESIS DOCTORAL DE:

SANDRA MARTÍNEZ MORILLA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

JUAN ANTONIO BUEREN RONCERO
BEATRIZ ALBELLA RODRÍGUEZ

Madrid, 2013



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**IMPLICACIONES DE LA RUTA DE ANEMIA
DE FANCONI EN LA RESPUESTA CELULAR
A TETRAHIDROISOQUINOLINAS
ANTITUMORALES QUE INTERACCIONAN
CON EL ADN**

**Sandra Martínez Morilla
TESIS DOCTORAL
MADRID, 2012**

Agradecimientos

MIL GRACIAS:

A PharmaMar S.A. por permitirme realizar este trabajo con sus productos, así como financiarme el periodo de mi Tesis.

A Juan A. Bueren, por darme la oportunidad de entrar en su grupo y por haber contribuido, como mi codirector, a que llegase este momento.

A Beatriz Albella, mi otra codirectora, por enseñarme a trabajar con rigor científico, por transmitirme su pasión por este trabajo, por alimentar mis inquietudes, por su nobleza, su apoyo incondicional y su energía inagotable que me han acompañado durante todo el camino y por un largo etcétera.

A continuación, a toda la División de Hematopoyesis y Terapia Génica del Ciemat por todo lo que me habéis enseñado y por el apoyo que he recibido, muy especialmente a Laura, mi "compi" para todo: este trabajo es tan tuyo como mío; Elena, por ser tan buena amiga, he aprendido mucho de ti; mis *business women*, por su vitalidad y su naturalidad; Miguel, por sacarme de todos los apuros burocráticos; y Óscar, por compartir conmigo sus conocimientos y sus ideas. Asimismo, al grupo de Epitelios, con los que he compartido laboratorio estos años, y al personal del Animalario y de Histología.

A Ale, Guillermo y Vero, por tener tanta paciencia conmigo, enseñarme tantas cosas, compartir conmigo miles de risas, apoyarme en tantos momentos, hacerme sentir "como en casa". Tuve mucha, mucha pero que mucha suerte de encontraros en Sevilla y nunca dejaréis de estar conmigo.

A Concepción Romero, Juan Luis Santos, Mónica y Eva, del Dpto. de Genética de la Facultad de C. C. Biológicas (UCM) por darme la primera oportunidad de trabajar en un laboratorio de investigación.

Pasando al ámbito personal, gracias a mis amigos: mi "familia" madrileña, Arturo, Ana³, Gema, Bea y Carlos; a Nerea e Inês, mi regalo del Erasmus; a María Fernanda, por rescatarme cuando lo he necesitado; a Andrea, Fineta, Mariana, Vero y Fernando, por ayudarme a "desconectar de la poyata" y abrirme otros horizontes.

A toda mi familia: hermanito, abuelos, tíos, primos, ... Pero sobre todo, a mis padres, por la educación y el amor que he recibido de ellos; por darme alas para volar; por confiar en mí y apoyarme siempre en cada iniciativa, en cada decisión, en cada "ocurrencia" de las

mías, sin interferir con su sabiduría, sólo aconsejando, aunque supiesen que me estaba equivocando; porque sin vosotros, nunca hubiese llegado hasta aquí.

Y a Ángel, que ha tenido que aguantarme todo este tiempo, y he de reconocer que no se lo he puesto nada fácil. Gracias por intentar entender a qué me dedico, por hacerme sonreír cada día, por estar conmigo. Gracias por venirte a Madrid y acompañarme en esta senda tan emocionante pero llena de claroscuros que es la Tesis.

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Anemia de Fanconi
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina de suero bovino)
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> (Unidad formadora de colonia)
CFU-GM	<i>Colony Forming Unit - Granulocyte – Macrophage</i> (Unidad formadora de colonia granulo-macrofágica)
CI	Coefficiente de interacción
CMH	Célula madre hematopoyética
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGFP	<i>Enhancer Green Flourescece Protein</i> (Proteína verde fluorescente mejorada)
ET	Trabectedina = Yondelis® = ET-743
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	Fluoresceína
FTs	Factores de transcripción
GMP	<i>Granulocyte – Macrophage Progenitor</i> (Progenitor granulo-macrofágico)
IC	<i>Inhibitory concentration</i> (Concentración de inhibición)
ICLs	<i>Interstrand Cross-Links</i>
LCL	<i>Lymphoblastoid Cell Line</i> (Línea celular linfoblastoide)
MMC	Mitomicina C
MO	Médula ósea
PBA	<i>Phosphate Buffered Saline</i> + 1% albúmina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampón fosfato salino)
PM	PM01183
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
RDA	Respuesta al daño en el ADN
RDC	Roturas de doble cadena
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecilsulfato sódico)
TAICAs	Tetrahidroisoquinolinas antitumorales que interaccionan con el ADN
TBS	Tris-HCl 1M pH 7,8, NaCl 4M
WB	<i>Western Blot</i>
ZLP	Zalypsis® = PM00104

NOTA: algunas siglas se han mantenido en inglés debido a la ausencia de un equivalente estandarizado en español y/o porque su uso está ampliamente extendido dentro de la comunidad científica.

Índice

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Sistema hematopoyético y su organización.....	7
1.1.1. Células madre hematopoyéticas.....	8
1.1.2. Precursores hematopoyéticos.....	9
1.1.3. Compartimento de células funcionales.....	10
1.2. La ruta de anemia de Fanconi (AF).....	11
1.2.1. Ruta bioquímica de AF.....	11
1.2.2. Relevancia de la ruta de AF en cáncer.....	13
1.3. Tetrahydroisoquinolinas antitumorales que interactúan con el ADN (TAICAs).....	15
1.3.1. Trabectedina.....	17
1.3.2. Zalypsis®.....	19
1.3.3. PM01183.....	20
1.3.4. Antecedentes sobre la implicación de la ruta de AF en la respuesta celular a los fármacos TAICAs.....	21
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. Células primarias.....	29
3.2. Líneas celulares.....	30
3.3. Modificación de líneas celulares mediante transducción de vectores retrovirales y lentivirales.....	32
3.3.1. Vectores retrovirales.....	32
3.3.1.1. Producción y titulación de sobrenadantes retrovirales.....	32
3.3.1.2. Complementación génica de células deficientes en genes <i>FANC</i> mediante vectores retrovirales.....	33
3.3.2. Vectores lentivirales.....	34
3.3.2.1. Producción y titulación de sobrenadantes lentivirales.....	34
3.3.2.2. Transducción de células con vectores lentivirales.....	35
3.4. Fármacos antitumorales.....	35
3.5. Exposición a los fármacos antitumorales.....	35
3.5.1. Ensayos clonogénicos.....	36
3.5.1.1. Ensayos clonogénicos de progenitores hematopoyéticos murinos.....	36
3.5.1.2. Ensayos clonogénicos de células tumorales humanas.....	37
3.5.2. Análisis por citometría de flujo: viabilidad, apoptosis y ciclo celular.....	39
3.6. Análisis de la expresión génica.....	40

3.6.1. Análisis de los niveles de ARNm por RT-qPCR.....	40
3.6.2. Análisis de los niveles de proteína por <i>Western Blot</i>	42
3.7. Análisis de formación de focos nucleares de FANCD2 por inmunofluorescencia.....	43
3.8. Ensayos de actividad promotora.....	44
3.9. Análisis estadístico.....	45
4. RESULTADOS	51
4.1. La inactivación de la ruta de AF sensibiliza a progenitores hematopoyéticos y líneas linfoblásticas frente a los fármacos TAICAs.....	51
4.1.1. Precursores hematopoyéticos murinos.....	51
4.1.2. Linfoblastos humanos inmortalizados.....	54
4.2. La deficiencia en genes <i>FANC</i> no afecta a la sensibilidad de células tumorales frente a los fármacos TAICAs.....	56
4.2.1. Células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.....	56
4.2.2. Células leucémicas.....	59
4.3. La exposición a los fármacos TAICAs disminuye la expresión del gen <i>FANCD2</i> preferentemente en células tumorales.....	63
4.3.1. Expresión del ARNm de <i>FANCA</i> y <i>FANCD2</i>	63
4.3.2. Expresión de la proteína FANCD2.....	65
4.3.3. Formación de focos nucleares de FANCD2 tras una exposición de las células a los fármacos TAICAs y MMC.....	66
4.3.4. Actividad promotora.....	68
4.4. Los fármacos TAICAs inducen apoptosis y bloquean el ciclo celular preferentemente en células tumorales.....	70
4.4.1. Apoptosis.....	70
4.4.2. Bloqueo del ciclo celular.....	71
4.5. Adición/Sinergia de los fármacos TAICAs en combinación con agentes entrecruzantes del ADN.....	73
4.5.1. Estudios preliminares.....	74
4.5.2. Estudios de combinación de fármacos.....	76
4.5.3. Efecto de la combinación de Zalypsis® y MMC en líneas de carcinoma escamoso.....	80
5. DISCUSIÓN	85
5.1. La inactivación de la ruta de AF sensibiliza a progenitores hematopoyéticos primarios y líneas linfoblastoides frente a los fármacos TAICAs, mientras que esta sensibilización no ocurre con células tumorales, en particular de carcinoma escamoso y leucemia mieloide aguda.....	86

5.2. La respuesta diferencial de las células tumorales a los fármacos TAICAs se corresponde con una inhibición de la ruta de AF.....	89
5.2.1. Los fármacos TAICAs y su efecto sobre FANCD2.....	89
5.2.2. Los fármacos TAICAs y su efecto sobre la apoptosis y el ciclo celular.....	92
5.3. Adición/Sinergia de los fármacos TAICAs en combinación con agentes entrecruzantes que producen entrecruzamientos en el ADN.....	94
5.4. Hipótesis final.....	95
6. CONCLUSIÓN.....	101
7. BIBLIOGRAFÍA.....	105

Resumen

Aproximadamente el 10% de los tumores sólidos y hematológicos presentan una inhibición en la ruta de anemia de Fanconi (AF) como consecuencia de mutaciones inactivantes o silenciamientos epigenéticos en alguno de los 15 genes *FANC* descritos hasta el momento. Las células deficientes en la expresión de cualquiera de estos genes son hipersensibles a agentes entrecruzantes del ADN tales como la mitomicina C (MMC). Se ha sugerido que las tetrahidroisoquinolinas antitumorales que interaccionan con el ADN (TAICAs), trabectedina, Zalypsis y PM01183, se comportan como agentes entrecruzantes del ADN, aún cuando estos compuestos se unen de forma covalente sólo a una de las dos cadenas del ADN.

En este trabajo se ha estudiado la implicación de la ruta de AF en la respuesta de diferentes líneas celulares a estos fármacos. En consonancia con resultados previos publicados por nuestro laboratorio, progenitores hematopoyéticos de ratones FA-A y FA-D1 y también linfoblastos humanos FA-A y FA-J fueron hipersensibles a los tres fármacos TAICAs, en comparación con sus respectivas células control, competentes en la ruta de AF. Del mismo modo, el agente entrecruzante del ADN MMC fue más tóxico en las células deficientes en genes *FANC* frente a células con una ruta de AF funcional.

En diferentes líneas celulares tumorales tales como carcinoma escamoso de cabeza y cuello (SCC) y leucemia mieloide aguda (LMA) se observó, sin embargo, una respuesta similar a los fármacos TAICAs en células deficientes en genes *FANC* y en sus correspondientes células control complementadas genéticamente. A pesar de ello, todas las células tumorales estudiadas deficientes en la ruta de AF fueron más sensibles a MMC, en comparación a sus controles competentes en esta ruta. Es más, mientras que MMC activó la ruta de AF tanto en células no transformadas como en células tumorales, los fármacos de tipo TAICA provocaron una inhibición en dicha ruta, a juzgar por la disminución de la expresión del gen *FANCD2* y la inhibición de la formación de focos nucleares de *FANCD2* inducida por MMC.

Tomando en su conjunto los resultados obtenidos en esta memoria podemos concluir que, aunque los fármacos de tipo TAICA mimetizan funcionalmente la interacción de los agentes entrecruzantes con el ADN, estos dos tipos de compuestos presentan una respuesta celular opuesta en relación a la activación de la ruta de AF. Así, mientras que los agentes entrecruzantes clásicos como MMC son activadores de la ruta de AF, los fármacos de tipo TAICA son inhibidores de esta ruta. Proponemos, por tanto, que el efecto inhibitorio sobre la ruta de AF ejercido por los fármacos TAICAs podría explotarse clínicamente para potenciar la respuesta de tumores a tratamientos combinados de estos fármacos con agentes entrecruzantes del ADN.

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema hematopoyético y su organización

El sistema hematopoyético constituye un tejido extremadamente complejo que está altamente regulado por un entramado de mecanismos transcripcionales (factores de transcripción (FTs), microARNs) y epigenéticos, además de numerosos factores de crecimiento y por interacciones específicas con las células estromales del nicho hematopoyético (Bissels *et al.*, 2012; Novershtern *et al.*, 2011; Simmons *et al.*, 1997; Sachs, 1987). Esto se debe a que es el responsable de producir, a partir de poblaciones celulares indiferenciadas situadas fundamentalmente en la médula ósea (MO), las células maduras de los diferentes linajes hematopoyéticos circulantes en el torrente circulatorio.

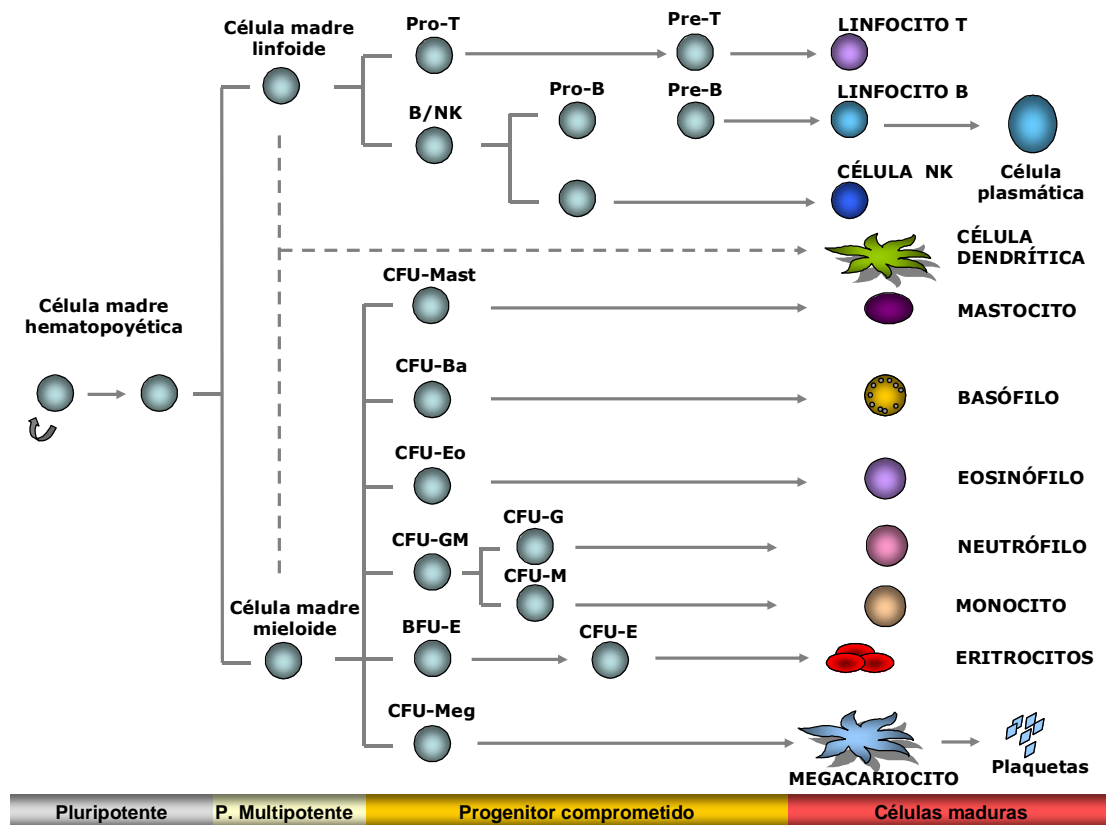


Figura 1. Modelo de determinación de linaje del sistema hematopoyético.

El sistema hematopoyético es un sistema altamente jerarquizado (**figura 1**) donde un pequeño número de células multipotentes y con capacidad de automantenimiento es capaz de dar lugar a un elevado número de los diferentes progenitores comprometidos. Dichos progenitores, con gran capacidad de proliferación, darán lugar a todas las células maduras

que se encuentran en el torrente sanguíneo: linfocitos, granulocitos, eritrocitos y plaquetas. A partir del estudio de progenitores comprometidos en ratón (Reya *et al.*, 2001; Akashi *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 1997), se ha formulado un modelo clásico que define el proceso de diferenciación dentro de la hematopoyesis:

- la pérdida de la capacidad de automantenimiento durante la diferenciación precede al compromiso de linaje.
- la primera decisión de compromiso separa en linajes mieloide y linfoide.
- las decisiones hacia cada linaje ocurren como pasos bifurcados.

De este modo, las células hematopoyéticas pueden clasificarse, de forma esquemática, en tres compartimentos, dependiendo de su capacidad de diferenciación y automantenimiento: células madre hematopoyéticas (CMH), precursores hematopoyéticos y células funcionales.

1.1.1. Células madre hematopoyéticas

Las células madre hematopoyéticas (CMH) suponen un pequeño porcentaje de la MO total, 1 de cada 10^6 (Wang *et al.*, 1997), son pluripotentes y morfológicamente indiferenciables. Su principal característica es su capacidad de automantenimiento (Till y McCulloch, 1961). Es una población básica en el funcionamiento del tejido hematopoyético puesto que a partir de ella se producen todos los tipos celulares de este sistema. Presentan una baja tasa de proliferación, lo que podría ser un mecanismo para protegerse del daño en el ADN, por ejemplo derivado del estrés replicativo y oxidativo (Catlin *et al.*, 2011; Shepherd *et al.*, 2004). Asimismo existen estudios que indican que las CMH dañadas mueren preferentemente por apoptosis para mantener así la integridad de su genoma (Milyavsky *et al.*, 2010).

Otra característica asociada a las células madre es su plasticidad, es decir, la capacidad de producir células de otros tejidos diferentes a los que pertenece. Esta propiedad también está presente en las CMH, de hecho, de ellas se obtuvieron los primeros resultados sobre este fenómeno (Herzog *et al.*, 2003; Theise *et al.*, 2003; Graf, 2002; Krause, 2002). Se trata de un fenómeno de frecuencia variable y que se ha detectado en diferentes modelos animales. Algunos ejemplos de generación de células maduras a partir de células madre hematopoyéticas son: células de músculo esquelético (Gussoni *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 1999), músculo cardíaco (Jackson *et al.*, 2001), hepatocitos (Lagasse *et al.*, 2000; Theise *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 1999) y tejido epitelial (Krause *et al.*, 2001). Sin embargo, algunos trabajos apuntan a una fusión de las CMH con células diferenciadas del tejido diana para explicar esta capacidad de transdiferenciación (Quintana-

Bustamante *et al.*, 2006; Vassilopoulos *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Terada *et al.*, 2002; Wagers *et al.*, 2002; Ying *et al.*, 2002).

La identificación de algunos marcadores de superficie específicos de células madre, como el CD34 en humanos, hicieron posible su identificación por citometría de flujo (Spangrude *et al.*, 1988). Existe un amplio número de estudios en este campo, aunque en la década de los 90 se llegó a la conclusión de que las CMH humanas se encontraban en la población celular caracterizada como CD34⁺CD38⁻Thy1⁺CD45RA⁻ (Bhatia *et al.*, 1997; Conneally *et al.*, 1997; Lansdorp *et al.*, 1990).

Se han dedicado muchos esfuerzos a la obtención de un cultivo *in vitro* para el estudio de las CMH. Los primeros frutos de ello fueron la célula iniciadora de cultivo a largo plazo (LTC-IC, *Long term culture-initiating cell*) (Lemieux *et al.*, 1995) o la célula formadora de áreas en adoquín o *cobblestone* (CAFC, *Cobblestone area forming cell*) (Ploemacher *et al.*, 1989), aunque ningún caso tuvo éxito. Se sigue trabajando en el desarrollo de ensayos *in vitro* que puedan mantener las características fundamentales de las CMH, como la pluripotencia y el automantenimiento, a lo largo del cultivo (Elizalde *et al.*, 2012; Ventura Ferreira *et al.*, 2012; Nishino *et al.*, 2011; Sekulovic *et al.*, 2011; Himburg *et al.*, 2010).

Los ensayos más fiables y exhaustivos para el estudio de esta población son los ensayos de repoblación competitiva en ratón (Harrison *et al.*, 1993) y la reconstitución de ratones inmunodeficientes con células madre hematopoyéticas humanas (Larochelle *et al.*, 1996). El desarrollo de este tipo de modelos, progresivamente más perfeccionados, ha hecho posible una mejor caracterización de las CMH durante los últimos 20 años. En la actualidad, se considera que el modelo de ratón NOD-scid NSG es el más sensible para detectar CMH humanas en ensayos de repoblación de ratones inmunodeficientes (Notta *et al.*, 2010).

1.1.2. Precursores hematopoyéticos

Los precursores comprometidos presentan una alta tasa proliferativa, con una capacidad de automantenimiento muy limitada. Pueden diferenciarse a un linaje determinado y son morfológicamente irreconocibles (Martin *et al.*, 1970; Morrison *et al.*, 1995).

Es posible estimularlos *in vitro* añadiendo factores de crecimiento hematopoyético, lo que permite realizar ensayos clonogénicos en los cuales se obtienen colonias cuantificables de células diferenciadas. Basándose en los resultados obtenidos en ratón (Bradley y Metcalf, 1966; Pluznik y Sachs, 1965), se empezó a estudiar *in vitro* la formación de colonias de

progenitores sembrando células de médula ósea (MO) humana en agar y suplementada con sangre periférica humana primero (Moore *et al.*, 1973; Pike y Robinson, 1970) y modificando las condiciones después (Gartner y Kaplan, 1980; Sutherland *et al.*, 1989). En la actualidad, estos ensayos *in vitro*, que comenzaron siendo muy laboriosos y en condiciones muy variables, están muy estandarizados con una fácil disponibilidad de kits comerciales en los que se incluyen el medio semisólido y los factores de crecimiento hematopoyéticos necesarios para la cuantificación de los diferentes precursores hematopoyéticos.

La información derivada de los estudios de ratón y humanos ha permitido clasificar los progenitores comprometidos en: CFU-GM (unidad formadora de colonias granulomacrofágicas), cuya diferenciación da lugar a CFU-G (unidad formadora de colonias de granulocitos) y CFU-M (unidad formadora de colonias de macrófagos) (Bradley y Metcalf, 1966; Pluznik y Sachs, 1965); CFU-Eo (unidad formadora de colonias de eosinófilos); CFU-Ba (unidad formadora de colonias de basófilos); BFU-E (unidad formadora de brote eritroide) (Gregory y Eaves, 1978), cuya diferenciación da lugar a CFU-E (unidad formadora de colonias eritroides); y CFU-Meg (unidad formadora de colonias megacariocíticas) (McLeod *et al.*, 1976; Nakeff y Daniels-McQueen, 1976; Metcalf *et al.*, 1975).

1.1.3. Compartimento de células funcionales

Las células funcionales se encuentran en el torrente circulatorio y presentan características morfológicas específicas según el tipo celular, lo que las hace fácilmente reconocibles por microscopía. Proviene de la diferenciación de los diferentes progenitores comprometidos y se pueden dividir en dos grupos principales: linfoide y mieloide. El compartimento linfoide incluye células T, B y NK (*Natural Killers*) y se encargan de la respuesta inmune innata y adaptativa. Por otro lado, el linaje mieloide está formado por granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos), monocitos, eritrocitos y megacariocitos. Las células que forman parte de este compartimento tienen una capacidad proliferativa baja o nula, excepto en el caso de los linfocitos T, y no son capaces de automantenerse.

1.2. La ruta de anemia de Fanconi (AF)

1.2.1. Ruta bioquímica de AF

La Anemia de Fanconi (AF) es una enfermedad autosómica recesiva (excepto para el gen *FANCB* localizado en el cromosoma X) que se origina por la mutación de alguno de los 15 genes *FANC*, lo que desencadena un incremento en la inestabilidad cromosómica y una hipersensibilidad de las células deficientes a agentes entrecruzantes del ADN, como diepoxibutano, mitomicina C (MMC) o cisplatino (Valeri *et al.*, 2011; D'Andrea, 2010; Moldovan y D'Andrea, 2009; Niedernhofer *et al.*, 2005).

Dentro de la ruta de AF, se han identificado tres complejos de proteínas diferentes (**figura 2**). Después de la replicación del ADN o del daño en el mismo producido por radiaciones ionizantes o agentes entrecruzantes, ocho proteínas FANC (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCL* y *FANCM*) junto con dos proteínas AF-asociadas (*FAAP24*, *FAAP100*), *MHF1* y *MHF2* constituyen el **complejo I**. Concretamente, son cuatro las proteínas de este complejo las que reconocen la lesión y reclutan al resto de proteínas: *FANCM*, *FAAP24*, *MHF1* y *MHF2* (Kee y D'Andrea, 2010). Tan sólo dos proteínas de este complejo presentan actividad catalítica: *FANCL*, que actúa como una E3 ubiquitina ligasa (Meetei *et al.*, 2003), y *FANCM*, que posee actividad translocasa ATP-dependiente (Ali *et al.*, 2009). El ensamblaje del complejo I induce la activación del siguiente complejo formado por *FANCD2* y *FANCI* (**complejo ID**) vía monoubiquitinización (Smogorzewska *et al.*, 2007; Garcia-Higuera *et al.*, 2001). Seguidamente, el complejo ID activado se une a la cromatina y recluta a *FAN1* (*Fanconi-associated nuclease 1*) (Kitao y Takata, 2011; Kratz *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; MacKay *et al.*, 2010; Smogorzewska *et al.*, 2010), que colocaliza con otras proteínas asociadas como *FANCI/BRIP1*, *FANCN/PALB2*, *FANCD1/BRCA2*, *RAD51C/FANCO*, *RAD51* y *BRCA1* (Knipscheer *et al.*, 2009). Estas proteínas (**complejo III**), junto con el complejo ID activado, son capaces de detectarse microscópicamente como focos de reparación o *foci* subnucleares en la región dañada del ADN. Finalmente, la ruta vuelve a su estado inactivo a través del complejo enzimático *USP1/UAF1*, que retira los grupos ubiquitina del complejo ID (Nijman *et al.*, 2005).

1.2.2. Relevancia de la ruta de AF en cáncer

Debido a la implicación de la ruta de AF en la reparación del ADN, los pacientes con Anemia de Fanconi presentan una elevada predisposición a desarrollar procesos tumorales tales como leucemia mieloide aguda (LMA) y diversos tumores sólidos, principalmente carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Kutler *et al.*, 2003a; Kutler *et al.*, 2003b).

Por otro lado, la relevancia de carecer de una ruta de AF funcional también se ha puesto de manifiesto en individuos con cáncer no hereditario (Lyakhovich y Surralles, 2006). Es más, se ha descubierto que entorno al 10% de los tumores esporádicos estudiados presentan modificaciones genéticas o epigenéticas en alguno de los genes *FANC* (Valeri *et al.*, 2011). Este hecho impide el correcto funcionamiento de la vía de señalización de AF, favoreciendo la inestabilidad genética y la hipersensibilidad a agentes entrecruzantes de las células tumorales deficientes en alguno de los genes *FANC* (Palagyi *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2009; Hess *et al.*, 2008; Marsit *et al.*, 2004; van der Heijden *et al.*, 2004a; Taniguchi *et al.*, 2003).

El principal mecanismo de acción de los fármacos antitumorales empleados en la quimioterapia es el de inducir daño en el ADN (entrecruzamientos de cadenas, ICLs) (Deans y West, 2011; Ciccia y Elledge, 2010; Wang y Gautier, 2010). Este mecanismo de acción ataca preferentemente a células con una elevada tasa de proliferación, lo que puede afectar tanto a células tumorales como a células sanas que deban responder rápidamente al aumento celular según la demanda, como el tejido hematopoyético. Esta última consecuencia no es la deseada y por ese motivo la mayoría de estos compuestos presentan algún efecto secundario tóxico (Medema y Macurek, 2012; Deldar *et al.*, 1995; Deldar, 1994; Parchment *et al.*, 1993). Sin embargo, a diferencia de las células sanas, las células tumorales pueden tener problemas a la hora de reparar adecuadamente su ADN (Bouwman y Jonkers, 2012; Deans y West, 2011), ya que suelen presentar alteraciones en sus mecanismos de control. Así, mientras que las células sanas reconocen las lesiones gracias a los genes de respuesta al daño en el ADN (RDA), que activan los puntos de control del ciclo celular y de reparación, las células tumorales, por el contrario, pueden ser deficientes en esta función. Esta circunstancia puede resultar una ventaja a la hora de aplicar un tratamiento que produzca daño en el ADN y, de este modo, acabar selectivamente con las células tumorales.

Dada la elevada sensibilidad de las células con una ruta AF no funcional a los agentes entrecruzantes, en los últimos años se han dirigido esfuerzos hacia la búsqueda de moléculas específicas que inhiban la ruta de AF, de moléculas reguladoras de la misma o de

proteínas relacionadas. Éste es el caso de la curcumina, un compuesto antitumoral de origen natural que inhibe la monoubiquitinización de FANCD2, o del agente sintético wortmanina, que inhibe ciertas quinasas reguladoras de la ruta de AF, como ATR o ATM (Litman *et al.*, 2008). Así, se han desarrollado compuestos más potentes y específicos, como el monoketone, un análogo de la curcumina (Landais *et al.*, 2009a), o la naftoquinona (DDN) (Landais *et al.*, 2009b). Del mismo modo, se han llevado a cabo otras aproximaciones, como reducir la expresión de *BRCA1* mediante fenilbutirato (inhibidor de la acetilación de histonas) para sensibilizar células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello a cisplatino, entre otros efectos (Burkitt y Ljungman, 2008). Existen otros estudios en los que, mediante técnicas de análisis de alto rendimiento, se han identificado nuevas moléculas que pueden ser candidatas para atacar selectivamente células tumorales con una ruta de AF deficiente (Gallmeier *et al.*, 2007).

Con el propósito de mejorar la selectividad de los fármacos antitumorales, el concepto de "letalidad sintética" ha ganado importancia recientemente en el campo de la quimioterapia. Por definición, dos genes son sintéticamente letales si la mutación en uno de ellos es compatible con la viabilidad celular pero la mutación de ambos supone la muerte celular (Kaelin, 2005). Este concepto ha sido propuesto como una nueva alternativa para la terapia antitumoral selectiva dirigida a diferentes rutas de RDA. De este modo, si las células tumorales son las únicas que son deficientes en una determinada ruta de RDA, sería posible inducir la muerte específica de las mismas mediante esta aproximación. Éste sería el caso del inhibidor de la ciclina Chk1 Gö6976 (Chen *et al.*, 2009a), que es sintéticamente letal para células tumorales deficientes en genes *FANC*. Otro ejemplo son los inhibidores de la polimerasa poli(ADP)-ribosa (PARP), que es especialmente tóxico como agente único para células tumorales con mutaciones en *BRCA2* (Bryant *et al.*, 2005; Farmer *et al.*, 2005) y en *FANCA*, *FANCC* o *FANCD2* (McCabe *et al.*, 2006), o en combinación con agentes entrecruzantes o irradiación, tanto *in vitro* (Evers *et al.*, 2008) como *in vivo* (Rottenberg *et al.*, 2008; Donawho *et al.*, 2007). Basándose en estos estudios preclínicos, los inhibidores de PARP se han utilizado en varios ensayos clínicos, de forma individual así como en combinación con agentes entrecruzantes¹.

Sin embargo, durante los diferentes ciclos de quimioterapia, pueden aparecer resistencias al tratamiento relacionadas en ocasiones con alteraciones en los genes *FANC*. Uno de los mecanismos de resistencia es la reversión del genotipo del tumor, como se ha descrito en diversos modelos de cáncer: en la línea celular de cáncer pancreático CAPAN1 deficiente en *BRCA2* resistente a fármacos basados en platino o a inhibidores de PARP (Edwards *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 2008); en células de LMA de un paciente con AF que presentaban mutaciones bialélicas inactivantes de la expresión del gen *BRCA2* (Ikeda *et al.*,

2003); en linfoblastos de un paciente AF con hemangioendotelioma kaposiforme con una mutación en el gen *PALB2* (Xia *et al.*, 2007); pacientes con cáncer de mama que tenían el gen *BRCA2* mutado con tumores recurrentes tras tratamiento con cisplatino (Sakai *et al.*, 2008); células de cáncer de ovario que contenían el promotor del gen *FANCF* hipermetilado y eran sensibles a cisplatino, se volvieron resistentes al fármaco al desmetilarse este promotor (Taniguchi *et al.*, 2003).

Asimismo, las células tumorales pueden volverse resistentes al tratamiento utilizando vías de reparación del ADN alternativas: dos estudios recientes muestran cómo células deficientes en *FANCC* (Adamo *et al.*, 2010) o *FANCD2* (Pace *et al.*, 2010) minimizan su hipersensibilidad a agentes entrecruzantes y sus defectos en la reparación del ADN mediante la supresión de la ruta de reparación a través de la unión de extremos no homólogos (NHEJ).

1.3. Tetrahydroisoquinolinas antitumorales que interaccionan con el ADN (TAICAs)

La naturaleza ha sido modelada durante millones de años de evolución dando lugar a una extraordinaria variedad de formas de vida integradas en una compleja red de relaciones y sometidas a una presión de competición interespecies por los recursos limitados. Así, no es de extrañar, que existan multitud de biomoléculas con una amplia variedad en complejidad, función, etc., que todavía desconocemos y que pueden ser de gran utilidad para la humanidad. Por ejemplo, numerosos fármacos antitumorales fueron originalmente extraídos de especies vegetales terrestres como los *Vinca* alcaloides, (Vincristina, Vinblastina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), inhibidores de topoisomerasa (Etopósido), camptotecinas (Topotecan, Irinotecan), etc. El medio marino ha sido y puede seguir siendo una fuente de compuestos con funciones de interés a nivel terapéutico (Mayer *et al.*, 2011; Cragg *et al.*, 2006), ya que no poseen equivalentes en la corteza terrestre y podrían tener mecanismos de acción muy novedosos. Asimismo, suelen ser compuestos de elevada potencia ya que muchos organismos marinos no pueden huir de sus depredadores y tienen que desarrollar sustancias para defenderse muy potentes.

Los estudios de búsqueda de agentes terapéuticos en los organismos marinos comenzaron en los años 60 y, en los 70, las grandes empresas farmacéuticas se empezaron a interesar por ellos. Sin embargo, el interés por dichos compuestos se enfrió debido a la dificultad técnica y al excesivo trabajo que conllevaba, ya que estas sustancias se obtenían

de los organismos vivos en muy baja cantidad. El primer compuesto de origen marino en incluirse en un ensayo clínico contra el cáncer fue la didemnina B, aislada de un tunicado (Rinehart *et al.*, 1981). Por otro lado, hasta hace varias décadas, la única contribución del mar a la terapia antitumoral fue la citarabina (análogo de nucleósido sintético), que se utiliza comúnmente en el tratamiento de leucemias y linfomas. Más recientemente, un derivado del fluorinado de la citarabina, gemcitabina, ha mostrado actividad significativa en pacientes con tumores sólidos. En los últimos años, se han descrito unos 3000 compuestos nuevos de origen marino y algunos de ellos han entrado en ensayos clínicos (Cragg *et al.*, 1997). Este incremento se ha debido a la mejora, desarrollada en los años 80, de la tecnología necesaria para la recolección de las muestras en altas profundidades y la producción de los compuestos a gran escala mediante acuicultura y síntesis de los mismos. Un ejemplo del peso de los productos de origen marino en la sociedad en estos últimos años es que el 28% de los fármacos desarrollados entre 1981 y 2002, e introducidos en el mercado, procedían del medio marino (Newman *et al.*, 2003), nivel que se mantuvo entre 2003 y 2004 (Mayer y Gustafson, 2006).

En la actualidad, existe entorno a una veintena de compuestos de origen marino en ensayos clínicos o preclínicos para el tratamiento del cáncer (Jiménez *et al.*, 2009), entre otras enfermedades (Newman y Cragg, 2004; Mayer y Gustafson, 2003). Todo esto hace pensar que en un futuro no muy lejano los océanos llegarán a ser una fuente importante de productos químicos, tanto de aplicación directa como medicamentos como base para modificaciones sintéticas de otros compuestos no encontrados en la corteza terrestre.

PharmaMar S.A. es la primera compañía biofarmacéutica española dedicada al descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos antitumorales derivados de organismos marinos. Fundada en 1986, tiene la librería de organismos marinos privada más amplia del mundo con aproximadamente 120.000 muestras, a partir de la cual selecciona los extractos con actividad citotóxica *in vitro* y con un novedoso mecanismo de acción para el tratamiento contra el cáncer que, posteriormente, se sintetizarán de forma química con objeto de no comprometer la integridad del ecosistema marino. Los fármacos que superen con éxito los estudios preclínicos serán probados en ensayos clínicos con pacientes. Al mismo tiempo, la empresa está interesada en identificar, mediante estudios histológicos y farmacogenéticos, aquellos pacientes que puedan responder más eficazmente al tratamiento con sus fármacos. Hasta la fecha, PharmaMar ha llevado a cabo más de 100 ensayos clínicos que han incluido más de 10.000 pacientes con cáncer de más de 300 hospitales de Europa, E.E.U.U., Canadá y Australia².

En la actualidad, PharmaMar tiene cinco moléculas en diversas fases de ensayos clínicos, además de 3 familias de compuestos en desarrollo preclínico. Este trabajo se ha

basado en el estudio de tres de ellos: trabectedina, Zalypsis[®] y PM01183. Estos tres compuestos son alcaloides de tetrahydroisoquinolina y mimetizan funcionalmente el comportamiento de un agente entrecruzante, ya que estos fármacos se unen a una guanina de determinados tripletes del surco menor del ADN mediante la unión covalente a una de las cadenas, estabilizándose dicha unión a través de uno o dos puentes de hidrógeno con la cadena opuesta. De este modo, se acaban generando roturas de doble cadena (RDC) que estabilizan la doble cadena, el bloqueo de la replicación y las horquillas de replicación, además de reclutar proteínas encargadas de la reparación del ADN (Bueren-Calabuig *et al.*, 2011).

1.3.1. Trabectedina

El primer compuesto desarrollado por PharmaMar S.A. y el único que se comercializa hasta el momento es la trabectedina (ET-743 o Yondelis[®], como nombre comercial). Este fármaco fue obtenido del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata* (**figura 3A**) que habita en colonias en los mares Mediterráneo y Caribe, aunque actualmente se produce de forma sintética (Cuevas *et al.*, 2000).

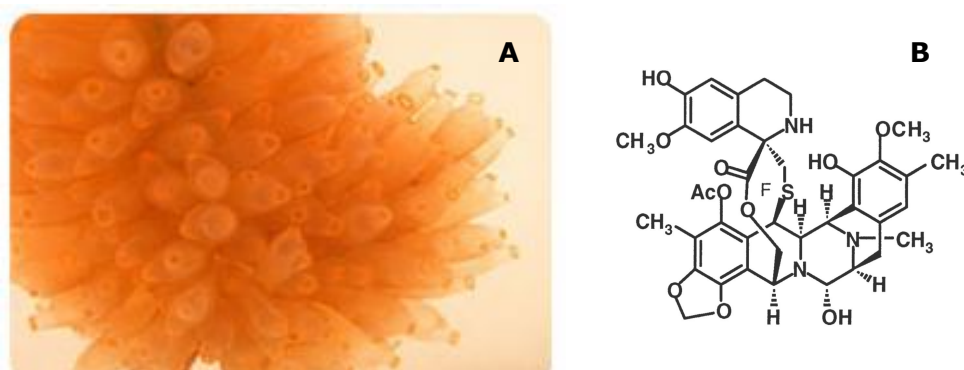


Figura 3. Colonia de *Ecteinascidia turbinata* (A) y estructura molecular de la trabectedina (B).

Se trata de un alcaloide tetrahydroisoquinolínico formado por tres subunidades (**figura 3B**). La trabectedina se une al surco menor del ADN mediante las subunidades A y B (Zewail-Foote y Hurley, 1999; Moore *et al.*, 1997), lo que provoca una torsión hacia el surco mayor de la hélice del ADN que hace que quede expuesta al exterior la tercera subunidad que compone la molécula, subunidad C, una tetrahydroisoquinolina. Dicha torsión confiere a la trabectedina un mecanismo de acción único con respecto los antineoplásicos descritos hasta el momento.

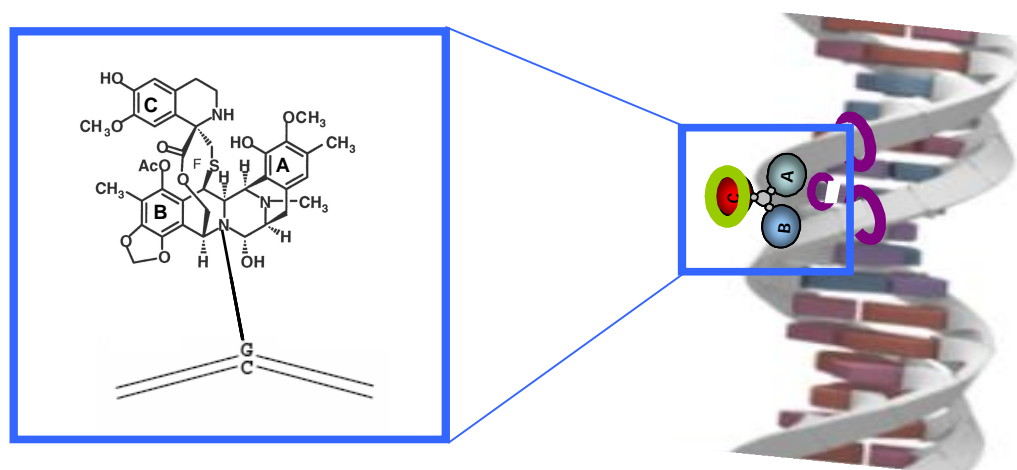


Figura 4. Mecanismo de acción de la trabectedina; en verde, proteína XPG, en morado, otras proteínas encargadas de la reparación del ADN (modificado de Takebayashi *et al.*, 2001).

La subunidad C parece ser la responsable de la actividad antitumoral de la molécula ET-743 (D'Incalci y Galmarini, 2010), ya que, al estar expuesta hacia el exterior, puede interaccionar con proteínas y, por ejemplo, inhibir promotores específicos al impedir la unión de FTs. Es el caso de TBP (*TATA Binding Protein*), E2F (*E2 Factor*), SRF (*Serum Response Factor*) y NFY (*Nuclear Factor Y*) (Bonfanti *et al.*, 1999). Así, trabectedina parece no afectar a la transcripción constitutiva pero sí a la de los genes activados (Scotto, 2002), aunque no todos (Minuzzo *et al.*, 2005), tanto inhibiendo como promoviendo su transcripción. Además, aunque trabectedina se une al surco menor del ADN, puede interferir en la unión de FTs que se unen a promotores localizados en el surco mayor (Friedman *et al.*, 2002), incluso induce la degradación de la ARN polimerasa II cuando está activa (Aune *et al.*, 2008).

Además de FTs, está descrito que trabectedina puede unirse a proteínas del sistema NER (*Nucleotide Excision Repair*), concretamente a ERCC5 o XPG, bloqueando la reparación por parte de este sistema de las lesiones producidas y causando roturas monocatenarias a cada lado del aducto trabectedina-ADN (**figura 4**). Esta fragmentación provoca la activación de procesos como la apoptosis y la muerte celular (Tavecchio *et al.*, 2008; Herrero *et al.*, 2006; Takebayashi *et al.*, 2001). Del mismo modo, el grupo del Dr. D'Incaldi (Erba *et al.*, 2001) puso de manifiesto que este fármaco produce un retraso en la fase S del ciclo celular, lo que provoca un bloqueo de las células en fase G₂/M y la consecuente apoptosis.

Otra función conocida de trabectedina a nivel del microambiente tumoral es la capacidad de inhibir la producción de mediadores proinflamatorios como CCL2 e interleuquina 6, entre otros, por parte de monocitos, macrófagos y macrófagos asociados al tumor, a nivel transcripcional (Germano *et al.*, 2010; Allavena *et al.*, 2005). Estos factores

favorecen el reclutamiento de monocitos a la zona del tumor y son factores de crecimiento para el propio tumor.

Gracias a la potente actividad antitumoral detectada en los ensayos preclínicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Riccardi *et al.*, 2005; D'Incalci *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2002; Pommier *et al.*, 1996), se llevaron a cabo diversos ensayos clínicos que culminaron con la aprobación por parte de la EMA (*European Medicines Agency*) de trabectedina para el tratamiento de sarcoma de tejido blando en 2007 y para cáncer de ovario platino-sensible con recaída, en combinación con DOXIL[®]/Caelvx[®] en 2009 además de la asignación por parte de la FDA (*Food and Drug Administration*) y la CE (Comisión Europea) como medicamento huérfano para sarcoma de tejido blando y cáncer de ovario. En la actualidad, se está realizando un ensayo clínico fase III utilizando Yondelis[®] en primera línea en pacientes con sarcomas con traslocaciones, así como diversos estudios en combinación con otros fármacos antitumorales.

1.3.2. Zalypsis[®]

Zalypsis[®] (o PM00104) es un nuevo alcaloide sintético que está relacionado estructuralmente con diversos compuestos de origen marino como las juromicinas que se encuentran en el mucus y la piel del nudibranquio del océano Pacífico *Jorunna funebris* (Fontana *et al.*, 2000; Rinehart *et al.*, 1990) (**figura 5**); con renieramicinas de esponjas marinas y tunicados (Oku *et al.*, 2003; Frincke y Faulkner, 1982), con safracinas y saframocinas aisladas de bacterias y esponjas marinas, así como con ecteinascidinas de tunicados marinos (Rinehart *et al.*, 1990; Kishi *et al.*, 1984). Se trata de un antibiótico que posee un grupo carbinolamino reactivo diferente al de los otros dos fármacos TAICAs, capaz de formar uniones covalentes con el grupo amino de ciertas guaninas en el ADN, tanto en presencia como en ausencia de citosinas metiladas (Leal *et al.*, 2009). El aducto formado se estabiliza mediante puentes de hidrógeno con nucleótidos adyacentes de la cadena opuesta así como por interacciones de van der Waals dentro del surco menor.

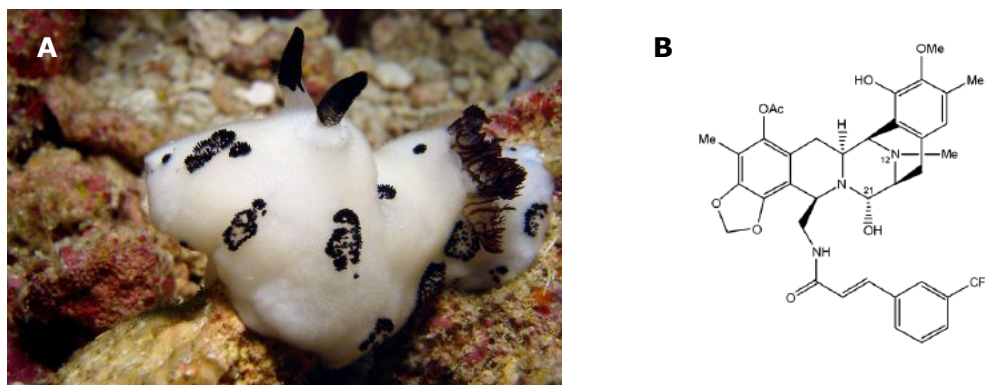


Figura 5. *Joruna funebris* (molusco) (A) y estructura molecular de Zalypsis[®] (B).

Este fármaco presenta una elevada citotoxicidad *in vitro* en diferentes líneas tumorales establecidas y en células primarias (Colado *et al.*, 2011; Valeri *et al.*, 2010; Leal *et al.*, 2009; Ocio *et al.*, 2009), además de haber demostrado actividad antitumoral en múltiples modelos de xenotrasplante en ratón (Guillen *et al.*, 2009; Ocio *et al.*, 2009; Greiner *et al.*, 2007; LePage *et al.*, 2007a, b; Elices *et al.*, 2005a, b). Zalypsis[®] es capaz de inducir apoptosis, parada de ciclo celular y formación de RDC (Colado *et al.*, 2011; Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009; Ocio *et al.*, 2009). Estas RDC, que pueden visualizarse mediante la formación de focos nucleares de la histona H2AX fosforilada (γ -H2AX) (Rogakou *et al.*, 1998), pueden estar generadas por daño en el ADN asociado a la replicación y son independientes del sistema de reparación NER (*Nucleotide Excision Repair*) en el caso de Zalypsis[®] (Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha observado en mieloma múltiple (Ocio *et al.*, 2009) y en leucemia mieloide aguda (Colado *et al.*, 2011) que este compuesto es capaz de desequilibrar la expresión de determinados genes implicados en la respuesta al daño en el ADN.

Se han llevado a cabo varios ensayos clínicos en fase I, en pacientes con tumores sólidos y linfomas (Yap *et al.*, 2012), fijándose la pauta de administración para realizar un ensayo en fase II en pacientes con cáncer cervical y de endometrio metastático y/o avanzado. Recientemente se ha finalizado el reclutamiento de pacientes para un ensayo clínico en fase II en Sarcoma de Ewing y está en marcha un ensayo fase II en mieloma múltiple.

1.3.3. PM01183

PM01183 es un nuevo alcaloide sintético estructuralmente relacionado con las ecteinascidinas (Manzanares *et al.*, 2001; Rinehart *et al.*, 1990), lo que hace que tenga

similitudes con la trabectedina excepto por la subunidad C, que, en el caso del PM01183, corresponde a una tetrahidro- β -carbolina (**figura 6**), y que hace que tenga diferentes propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas en pacientes con cáncer (Ratain *et al.*, 2010). Además, presenta preferencia para unirse a determinados tripletes del ADN con una guanina central (Leal *et al.*, 2010).

A nivel celular, PM01183 presenta una elevada toxicidad a dosis nanomolar e induce bloqueo del ciclo celular en fase S y apoptosis, además de presentar actividad antitumoral *in vivo* (Leal *et al.*, 2010).

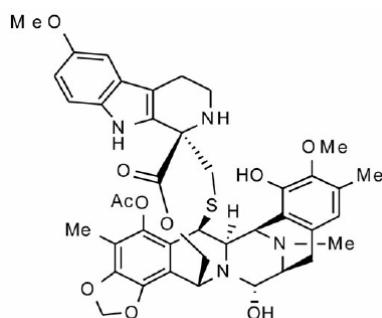


Figura 6. Estructura molecular de PM01183.

Actualmente, existen varios ensayos clínicos en fase I en los que se estudia la eficacia de PM01183 y su influencia en el control tumoral de pacientes con leucemia aguda y cáncer no colorrectal, además de un ensayo en fase II para pacientes con cáncer pancreático que no hayan respondido a tratamientos previos.

Recientemente ha comenzado un ensayo clínico en fase II para cáncer de mama con o sin mutaciones en *BRCA1/2*, tras haber tenido éxito en un ensayo en fase I de tumores sólidos avanzados.

1.3.4. Antecedentes sobre la implicación de la ruta de AF en la respuesta celular a los fármacos TAICAs

Tanto trabectedina como Zalypsis[®] y PM01183 se unen de forma covalente y reversible al surco menor de la doble hélice del ADN formando monoadductos (Leal *et al.*, 2010; Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009; Leal *et al.*, 2009; Casado *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2007) que simulan la generación de ICLs, lesiones que unen covalentemente las dos cadenas del ADN, en el material genético de las células expuestas a estos fármacos (Casado *et al.*, 2008; Tavecchio *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2007; Herrero *et al.*, 2006). Dado que la ruta de AF está relacionada con la reparación de ICLs y la RH (Harper y Elledge, 2007; Patel y Joenje, 2007; Kennedy y D'Andrea, 2005; Hussain *et al.*, 2004), cabría esperar que esta ruta jugase algún papel en la reparación del daño en el ADN inducido por los fármacos TAICAs mencionados. Hasta el momento, los datos al respecto son escasos y no existen para todos los compuestos.

En el caso de trabectedina, se ha demostrado que células de mamífero con mutaciones en genes *FANC*, como *BRCA2* (Soares *et al.*, 2007) además de *FANCA*, *FANCC*, *FANCF* o *FANCG* (Casado *et al.*, 2008), son más sensibles al fármaco antitumoral que células competentes en la ruta de AF. Asimismo, la trabectedina induce aberraciones cromosómicas en células deficientes en la ruta de AF; sin embargo, no produce el bloqueo en fase G₂/M, lo cual es una respuesta típica a MMC en células AF.

Por otro lado, Zalypsis[®] es capaz de regular la expresión de algunos genes de la ruta de AF (*FANCF*, *FANCG*, *FANCL*, *BRCA2*) en células tumorales como parte de su mecanismo de acción (Colado *et al.*, 2011). Esta disminución en los niveles de expresión, además de otros genes implicados en procesos fundamentales de la célula como la transcripción o la replicación, indican que Zalypsis[®] provoca daño en el ADN, que, junto con otros pasos intermedios, puede llegar a generar inestabilidad genómica.

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo ha sido el estudio de la implicación de la ruta de AF en la respuesta de células no transformadas y de células tumorales a tres fármacos de la familia de las tetrahidroisoquinolinas antitumorales que interaccionan con el ADN (TAICAs), trabectedina, Zalypsis® y PM01183, comparando estas respuestas con las de un agente entrecruzante del ADN como es la mitomicina C (MMC).

Con intención de responder al objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- ✦ Determinar la sensibilidad de **células no transformadas**, deficientes y competentes en la ruta de AF, a los fármacos TAICAs.
- ✦ Determinar la sensibilidad de **células tumorales**, deficientes y competentes en la ruta de AF, a los fármacos TAICAs.
- ✦ Analizar el efecto de los fármacos TAICAs sobre la funcionalidad de la ruta de AF en diferentes modelos celulares competentes en dicha ruta; en particular, sobre una proteína crítica de esta ruta como es FANCD2.
- ✦ Estudiar el efecto de la combinación de los fármacos TAICAs con agentes entrecruzantes del ADN (ej. MMC, cisplatino) en diferentes tipos de líneas tumorales.

3. Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Células primarias

Las células primarias de origen murino que se han empleado proceden de diferentes cepas de ratón. Todos fueron ratones macho de 12 a 14 semanas de edad:

- **Balb/C**: cepa control para los ratones con mutaciones en el gen *Brca2*. Fueron adquiridos al Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME). Para mayor facilidad de lectura, se les nombrará como **células o ratones control de FA-D1**.
- ***Brca2*^{Δ27/Δ27}**: el ratón transgénico fue generado en el laboratorio del Dr. Wiseman (*Laboratory of Women's Health, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC*) (McAllister *et al.*, 2002) delecionando el exón 27 del gen *Brca2/Fancd1*. Ésta es una mutación hipomórfica compatible con la vida, ya que la expresión nula de *Brca2/Fancd1* produce letalidad embrionaria (Sharan *et al.*, 1997). Los ratones se derivaron a un fondo genético Balb/C en el estabulario del Cimat. Se les nombrará como **células o ratones FA-D1**.
- **FVB.129**: cepa control para los ratones con mutaciones en el gen *Fanca*. Fueron adquiridos al Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME). Se les nombrará como **células o ratones control de FA-A**.
- ***Fanca*^{-/-}**: fueron generados por el grupo del Dr. Arwert (*Department of Clinical Genetics and Human Genetics, Free University Medical Center, Ámsterdam, Holanda*) (Cheng *et al.*, 2000) mediante la eliminación de los exones 4 al 7 del gen *Fanca* y su sustitución por el gen marcador de fusión *LacZ-Neo*, mediante recombinación homóloga. Los ratones se derivaron a un fondo genético FVB.129 en el estabulario del Cimat. Se les nombrará como **células o ratones FA-A**.

Todas las cepas se mantuvieron en el estabulario del Cimat y su estado de salud se controló rutinariamente mediante análisis en animales centinela, de acuerdo con los procedimientos recomendados por FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*). Todos los experimentos se realizaron siguiendo la legislación europea y española vigente sobre uso y tratamiento de animales de experimentación (Ley 32/2007 y RD 1201/2005 del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y Convenio

Europeo ETS 1-2-3) y de acuerdo a los principios éticos y de bioseguridad de nuestro Centro.

Una vez sacrificados los animales mediante monóxido de carbono, se extrajeron sus fémures y tibias. La médula ósea (MO) se obtuvo perfundiendo los huesos con medio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS; Lonza, Braine-l'Alleud, Bélgica), utilizando jeringas de 1 ml con agujas de 0,5 x 16 mm para disgregar convenientemente las células. Una vez obtenida la suspensión celular, se contaron las células mononucleadas con solución Turk (2% ácido acético con 0,01% de azul de metileno en agua destilada) lo que permite eliminar las células enucleadas. Este recuento se hizo con cámara de Neubauer en microscopio óptico (aumento de 10x). En MO de ratones control, se obtuvieron entre 12-15 x 10⁶ células por hueso y, en el caso de los ratones deficientes en genes *Fanc*, la media fue de 9 x 10⁶ células por hueso. Toda la manipulación se llevó a cabo en cabinas de seguridad biológica clase II.

3.2. Líneas celulares

Todas las líneas celulares utilizadas fueron de origen humano y se cultivaron en incubadores a 37°C, en una atmósfera al 90% de humedad relativa y con 5% de CO₂. Las líneas celulares fueron controladas periódicamente para descartar contaminación por micoplasma mediante la utilización del kit comercial Venor[®]GeM (Minerva Biolabs GMBH, Berlin, Alemania). Excepto en los casos que se indique lo contrario, la mayoría de las líneas fueron adquiridas en la *American Type Culture Collection* (ATCC).

Tanto las células adherentes como las que crecían en suspensión, se cultivaron en botellas de plástico (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Para su correcto crecimiento fue necesario realizar subcultivos unas tres veces por semana.

Se utilizaron **líneas celulares linfoblastoides (LCLs)** generadas a partir de linfocitos B de donantes sanos y de pacientes con Anemia de Fanconi pertenecientes a los grupos de complementación FA-A y FA-J (Casado *et al.*, 2007). Todas las LCLs fueron cultivadas en RPMI 1640 con GlutaMAX[™] (GIBCO Life Technologies) suplementado con 10% de FBS, 100U/ml penicilina y 100µg/ml estreptomicina (Pen-Strep, Life Technologies).

Asimismo, se utilizó la línea de **fibroblastos humanos MRC5** (ATCC: CCL-171), que se cultivó utilizando medio DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) GlutaMAX™ (GIBCO Life Technologies) suplementado con 10% de FBS, 100U/ml penicilina y 100µg/ml estreptomicina.

En el caso de las **células tumorales**, se utilizaron diferentes líneas celulares:

- **Células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello: EUFA1365 FA-A y EUFA1131 FA-C**, que fueron cedidas por el Dr. Hans Joenje (*Polikliniek Klinische Genetica, Vrije Universiteit Medical Center, Ámsterdam, Holanda*) (van Zeeburg *et al.*, 2005). Son células adherentes y poseen mutaciones bialélicas en el gen *FANCA* y en el gen *FANCC*, respectivamente. El medio de cultivo empleado para la línea EUFA1365 FA-A fue MEMα (*Minimum Essential Medium Alpha*) con GlutaMAX™ (GIBCO Life Technologies) suplementado con 10% FBS, 100U/ml penicilina y 100µg/ml estreptomicina. La línea EUFA1131 FA-C se cultivó en RPMI 1640 con GlutaMAX™ suplementado con 5% FBS, 100U/ml penicilina y 100µg/ml estreptomicina.

- **Células de leucemia mieloide aguda (LMA): CHR28811 FA-F y Kasumi-1**; ambas líneas celulares crecen en suspensión. La línea **CHR28811 FA-F** deriva de un paciente con leucemia megacarioblástica aguda. En esta línea, la expresión del gen *FANCF* se encuentra silenciada por hipermetilación de su promotor (Fugman *et al.*, 1990). Fue amablemente cedida por el laboratorio del Dr. Hanenberg. El medio de cultivo utilizado para esta línea, así como para la complementada, fue IMDM con GlutaMAX® suplementado con 10% FBS, 100U/ml penicilina y 100µg/ml estreptomicina.

La línea **Kasumi-1** (ATCC: CRL-2724) corresponde a una leucemia mieloide aguda con la translocación (8:21), lo que genera el oncogén de fusión *AML1-ETO* (Asou *et al.*, 1991). Fue cultivada en RPMI 1640 con GlutaMAX® suplementado con 10% FBS, 100U/ml penicilina y 100µg/ml estreptomicina.

- **Células de cáncer de ovario: IGROV1** (Benard *et al.*, 1985), con crecimiento en adherencia. El medio de cultivo empleado fue RPMI 1640 con GlutaMAX® suplementado con 10% FBS, 100U/ml penicilina y 100µg/ml estreptomicina.

- **Células de cáncer de vejiga: UM-UC-3** (ATCC: CRL-1749). Se trata de una línea con crecimiento en adherencia y se cultivó en EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*) con GlutaMAX™ (GIBCO Life Technologies) suplementado con 10% FBS, 100U/ml penicilina y 100µg/ml estreptomicina.

- **Células de cáncer de riñón: 293T** (ATCC: CRL-11268), con crecimiento en adherencia. El medio empleado DMEM con GlutaMAX™ suplementado con 10% FBS, 100U/ml penicilina y 100µg/ml estreptomicina.

3.3. Modificación de líneas celulares mediante transducción de vectores retrovirales y lentivirales

3.3.1. Vectores retrovirales

3.3.1.1. Producción y titulación de sobrenadantes retrovirales

Los vectores retrovirales utilizados fueron cedidos por el Dr. Hanenberg (*Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Zentrum für Kinderheilkunde, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Alemania*). Su estructura esquemática se muestra en la **figura 8**:

- **MFFIEG**: contiene el ADN complementario del gen humano *FANCF* y el gen marcador *EGFP* (Chandra *et al.*, 2005).
- **LEG1**: contiene el ADN complementario del gen marcador *EGFP* (Hanenberg *et al.*, 2002).
- **LFAPN**: contiene el ADN complementario del gen humano *FANCA* y el gen *NEO^R*, que codifica para la resistencia al antibiótico neomicina (Hanenberg *et al.*, 2002).
- **LFCPN**: contiene el ADN complementario del gen humano *FANCC* y el gen *NEO^R*, que codifica para la resistencia al antibiótico neomicina.

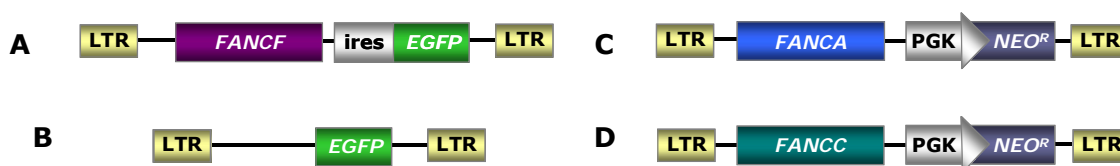


Figura 8. Esquema de las construcciones retrovirales MFFIEG (A), LEG1 (B), LFAPN (C) y LFCPN (D). Abreviaturas: LTR, repeticiones terminales largas; IRES, sitio interno de entrada al ribosoma; PGK, promotor del gen fosfoglicerato quinasa.

Los sobrenadantes retrovirales fueron producidos mediante la transfección transitoria de la línea celular Nxe. Las células se sembraron a una densidad de $4,5 \times 10^6$ células en placas de 100 cm² (Corning® Inc., Corning, NY) en medio de cultivo DMEM suplementado. Después de 24 horas, se alcanzó una confluencia del 60–70% y se procedió a la

transfección utilizando Fugene (FuGENE® Transfection Reagent, Roche, Indianápolis, IN), un agente de transfección basado en la introducción del ADN a través de lípidos, siguiendo las instrucciones indicadas por la casa comercial. Al día siguiente, se cambió el medio de cultivo por medio IMDM fresco suplementado. Tras 24 horas, se recogieron los sobrenadantes con las partículas retrovirales, se filtraron por 0,45 µm para eliminar restos celulares y se conservaron en alícuotas a -80°C.

El título de los sobrenadantes lentivirales se determinó mediante el análisis de la expresión de *EGFP* en células de la línea de fibrosarcoma humano HT1080 (ATCC: CCL-121) por citometría de flujo, siguiendo protocolos previamente descritos (Funke *et al.*, 2008; Pandya *et al.*, 2001; Naldini *et al.*, 1996).

3.3.1.2. Complementación génica de células deficientes en genes *FANCF* mediante vectores retrovirales

Para complementar o corregir genéticamente la **línea leucémica CHRF28811 FA-F** que contiene el promotor hipermetilado del gen *FANCF* se utilizó el vector retroviral MFFIEG (**figura 8A**). Los pocillos de una placa p-6 (ref.: 35 1146, Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NY) se recubrieron con retronectina 20 µg/ml (Takara Biomedicals, Otsu, Japón) durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se retiró y se añadió una precarga de sobrenadante retroviral, tanto para el vector control LEG1 como para MFFIEG, durante 4 horas a 37°C. La precarga se retiró antes de la infección y las células se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml. Transcurridas 24 horas, se llevó a cabo un segundo ciclo de infección añadiendo sobrenadante retroviral en una proporción v/v. Al día siguiente, se lavaron las células, se seleccionaron las células *EGFP*⁺ y se mantuvieron en cultivo para realizar los ensayos de sensibilidad. Para mayor facilidad de lectura, las células transducidas con el vector MFFIEG se nombrarán como "línea complementada" y con el vector LEG1, "línea control".

En el caso de las líneas celulares de **carcinoma escamoso de cabeza y cuello EUFA1365** deficiente en el gen *FANCA* y **EUFA1131** deficiente en el gen *FANCC*, se sembraron 1000 células/pocillo en placas tratadas con gelatina al 0,1% y se realizaron dos ciclos de infección espaciados 24 horas con los vectores LFAPN y LFPCN, respectivamente. Posteriormente, se procedió a la selección de las células transducidas mediante la adición al medio de geneticina 400 µg/ml (Life Technologies), análogo de la neomicina, lo que permitió la supervivencia únicamente de aquellas células que habían sido transducidas y

que, por lo tanto, llevaban el gen de resistencia a neomicina además del gen de interés. En adelante, para mayor facilidad de lectura se nombrarán como "líneas complementadas".

3.3.2. Vectores lentivirales

3.3.2.1. Producción y titulación de sobrenadantes lentivirales

Se han utilizado vectores lentivirales de tercera generación, autoinactivantes y sin capacidad de generar virus replicativos (Zufferey *et al.*, 1998). Para la producción de sobrenadantes lentivirales se cotransfectaron transitoriamente células 293T con 4 plásmidos diferentes. Los plásmidos utilizados fueron los siguientes:

- Plásmido de transferencia (desarrollados en nuestro grupo por Rocío Baños (DEA) a partir de un vector lentiviral generado por el grupo del Dr. Aebischer (Szulc *et al.*, 2006)):

- **pLVTHM.shscramble**: expresa constitutivamente *EGFP* y *shscramble* ARN.
- **pLVTHM.shFANCA**: expresa constitutivamente *EGFP* y *sh7FANCA* ARN.

- Plásmido de la envuelta **pMD2.VSV.G**: obtenido a través de PlasmidFactory GMBH & Co (Bielefeld, Alemania), contiene una secuencia que codifica para la glicoproteína G, proteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) (Verhoeven y Cosset, 2004).

- Plásmidos empaquetadores (PlasmidFactory GMBH & Co):

- **pMDLg-pRRE**: expresa los genes *gag* (codifica para la proteína de la matriz p17, del antígeno "core" p24, de la nucleocápside p7) y *pol* (codifica para la transcriptasa inversa p51 y p66, la integrasa p32 y la proteasa p11).
- **pRSV-REV**: expresa el gen *rev* (codifica la glicoproteína 120 y 41).

Las células 293T se sembraron a una densidad de $4,5 \times 10^6$ células en placas de 100 cm² pretratadas con gelatina al 0,1% para favorecer su adhesión. El medio de cultivo usado fue DMEM suplementado. Después de 24 horas en cultivo, las células alcanzaron el 60-70% de confluencia y se sustituyó el medio de cultivo por medio fresco para realizar la cotransfección de los 4 plásmidos utilizando Fugene.

A las 24 horas de la transfección, se sustituyó el medio con los complejos virales por medio IMDM suplementado y se recogieron los sobrenadantes con las partículas virales infectivas 24 horas después, filtrándose por 0,45 μ m para eliminar restos celulares y concentrándose las partículas virales mediante ultracentrifugación a 20.000 rpm durante 2 horas a 4°C en una centrífuga Avanti J30I (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) en rotor L24.38. Los virus sedimentados se resuspendieron en PBS y se almacenaron a -80°C.

El título de los sobrenadantes lentivirales se determinó del mismo modo que en el apartado 3.3.1.1.

3.3.2.2. Transducción de células con vectores lentivirales

Con objeto de establecer un modelo de Anemia de Fanconi en una línea tumoral mediante ARN de interferencia, la línea leucémica Kasumi-1 se transdujo con los vectores LV:*shFANCA* y LV:*shscramble*, como control. Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células por pocillo en una placa de 24 pocillos previamente tratada con retronectina a una concentración de $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, paso que aumenta la colocalización de los virus y las células, favoreciéndose de este modo la transducción. Las células se incubaron con un volumen de sobrenadante viral apropiado para obtener una MOI (*Multiplicity of Infection*) = 50 virus/célula. Se realizaron dos ciclos de infección cada 24 horas centrifugando la placa durante 2 horas a 2500 rpm a 37°C . Después de cada infección, el medio fue sustituido por medio fresco. Seguidamente, por citometría de flujo, se seleccionaron las células con alta expresión de *EGFP* y se mantuvieron en cultivo para realizar los ensayos de sensibilidad.

3.4. Fármacos antitumorales

Los fármacos TAICAs (trabectedina, Zalypsis® y PM01183) fueron suministrados por PharmaMar S.A. (Colmenar Viejo, España) como polvo para ser reconstituido en DMSO (Dimetil sulfóxido; Sigma-Aldrich, Munich, Alemania). La mitomicina C (MMC), que fue utilizada como control, se compró a Sigma-Aldrich y se reconstituyó en PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich), así como el cisplatino.

Todos los compuestos se diluyeron a una concentración de 1mM y se mantuvieron en alícuotas a -80°C . Las diluciones de trabajo se prepararon antes de cada experimento para evitar la degradación de los mismos.

3.5. Exposición a los fármacos antitumorales

Las exposiciones a los fármacos siempre se realizaron *in vitro* y los tiempos de exposición de los fármacos TAICAs variaron según el modelo celular utilizado y el parámetro estudiado. Estos tiempos se especifican en cada uno de los ensayos que se explican a

continuación. En todos los casos, tanto las dosis empleadas como los tiempos de exposición, fueron clínicamente relevantes.

En general, se han utilizado dos esquemas de exposición. En los estudios de efectos celulares, se han utilizado exposiciones más largas que varían entre 3 y 7 días, según el modelo celular. En lo que respecta a los estudios para detectar cambios a nivel molecular, los tiempos de exposición fueron más cortos, variando entre 6 y 24 h.

En todos los experimentos de viabilidad celular, las fracciones de supervivencia tras exposiciones a los fármacos TAICAs se calcularon respecto a la supervivencia de las células expuestas a 0,1% de DMSO, puesto que ésta es la concentración final en el cultivo del solvente utilizado para diluir estos compuestos. En el caso de MMC o cisplatino, los valores de supervivencia se calcularon respecto a células crecidas en condiciones estándar de cultivo puesto que estos compuestos no necesitan ningún solvente especial para ser disueltos.

3.5.1. Ensayos clonogénicos

3.5.1.1. Ensayos clonogénicos de progenitores hematopoyéticos murinos

Para el crecimiento de progenitores granulo-macrofágicos murinos (CFU-GM:, *Colony Forming Unit - Granulocytes and Macrophages*, Unidad Formadora de Colonias de granulocitos y macrófagos) se utilizó medio de cultivo MethoCult GF M3534 (StemCell technologies Inc., Vancouver, Canadá) cuya composición es 1% de metilcelulosa en medio IMDM, 15% de suero bovino fetal, 1% de albúmina de suero bovino, 10 µg/ml de insulina pancreática bovina, 200 µg/ml de transferrina humana (saturada de hierro), 10 mM de 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 50 ng/ml de rm SCF, 10 ng/ml de rmIL-3 y 10 ng/ml rhIL-6. A este medio de cultivo se añadieron las células y las distintas dosis del fármaco a estudiar siguiendo protocolos previamente establecidos (Pessina *et al.*, 2001).

En cada experimento se cultivaron 3 placas de cultivo de 35 mm de diámetro (Nunc) para cada condición. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 37°C, 5% CO₂ y al 95% de humedad relativa. El recuento de colonias se realizó en microscopio invertido (**figura 9**), contabilizaron aquellas CFU-GM que incluían más de 50 células por colonia según criterios internacionales estándar (Pessina *et al.*, 2001). En estas condiciones, los cultivos de células de MO control sin ningún tipo de tratamiento tuvieron una media de 79,45 ± 21,52 CFU-GM/10⁵ células sembradas. En los cultivos de las células expuestas a 0,1% de DMSO se

obtuvo una media de $61,36 \pm 12,63$ CFU-GM/ 10^5 células sembradas. En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas.

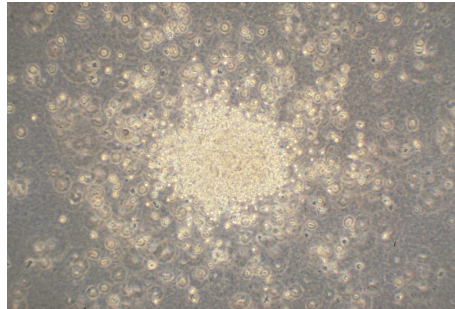


Figura 9. Microfotografía de una colonia CFU-GM murina. (Aumento: 40x).

3.5.1.2. Ensayos clonogénicos de células tumorales humanas

Previamente a los ensayos con exposición a los diferentes fármacos, y con el objeto de conseguir las condiciones idóneas para obtener un crecimiento clonogénico de las distintas líneas celulares humanas utilizadas, se realizaron curvas de crecimiento para cada una de ellas en placas de 6 pocillos (Becton Dickinson). Para el recuento de las colonias producidas, se fijaron los cultivos con metanol (Scharlau, Barcelona, España) y posteriormente se tiñeron con cristal violeta al 5% (Merck, Whitehouse Station, NJ). Las colonias (CFUs, *Colony Forming Units*) se contaron utilizando un microscopio invertido siguiendo criterios publicados previamente (Samoszuk *et al.*, 2005).

Para las células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, se sembraron 100, 250, 500, 1000 y 1500 células por pocillo, en placas previamente tratadas con 0,1% gelatina o sin gelatina (**figura 10-11**). A la vista de los resultados, se decidió realizar los ensayos posteriores de exposición a fármacos sembrando 500 células, en el caso de la línea **EUFA1365 FA-A** y su complementada, y 250 células de la línea **EUFA1131 FA-C** y su complementada en pocillos de 35 mm de diámetro (placas de 6 pocillos) tratados con gelatina al 0,1%. Los estudios de combinación de fármacos se realizaron con la línea EUFA1365 FA-A y su complementada sembrando 12.500 células/pocillo. Este aspecto se explicará con más detalle en el correspondiente apartado de resultados.

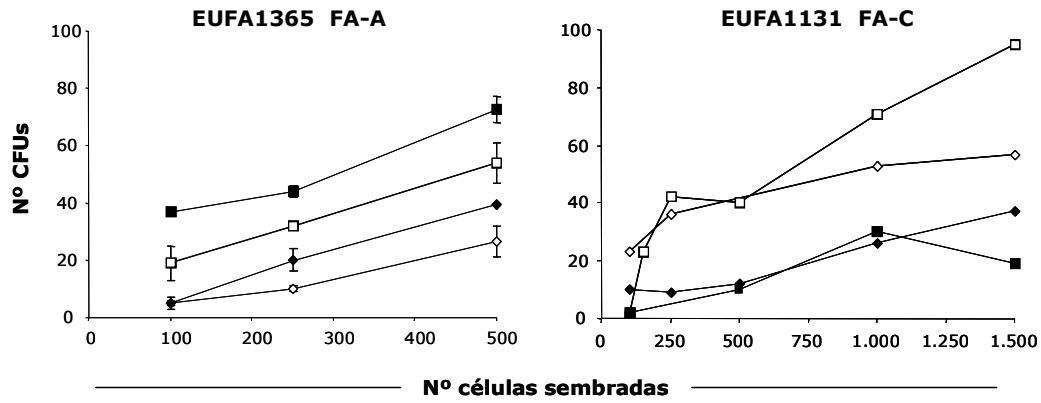


Figura 10. Clonogenicidad de líneas tumorales de carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Con la línea celular EUFA1365 FA-A (□, ■) y la complementada (◇, ◆) y la línea celular EUFA1131 FA-C (□, ■) y la complementada (◇, ◆) (en blanco: placas p6 previamente tratadas con gelatina 0,1%; en negro: placas sin gelatina).

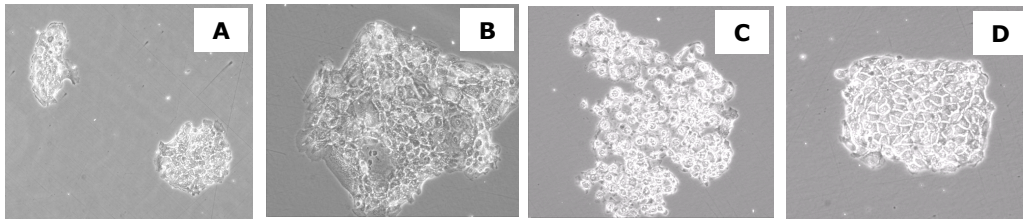


Figura 11. Microfotografías de colonias de EUFA1365 FA-A (A), la complementada (B), EUFA1131 FA-C (C) y la complementada (D). (Aumento: 10x).

En el caso de la línea de cáncer de ovario **IGROV1**, se decidió sembrar 500 células en placas tratadas previamente con gelatina (**figura 12**).

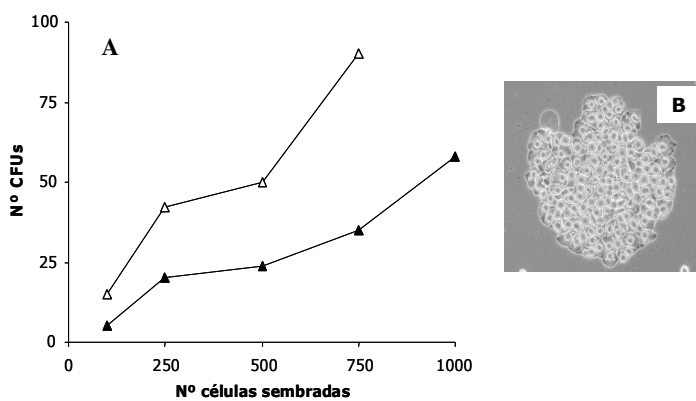
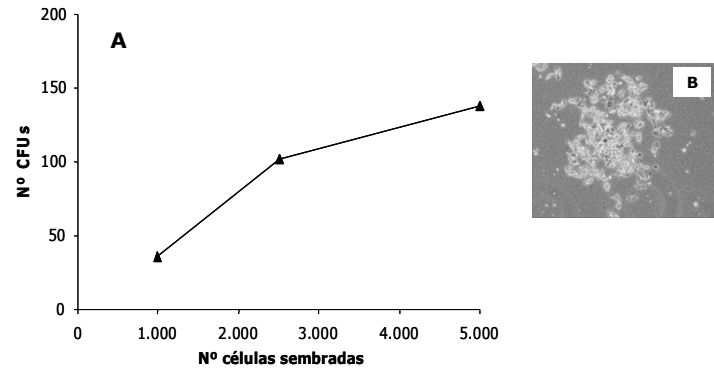


Figura 12. Clonogenicidad de la línea de cáncer de ovario IGROV1 mediante ensayos clonogénicos en placa pretratada con gelatina al 0,1% (Δ) o sin gelatina (▲). A) Gráfica. B) Microfotografía de una unidad formadora de colonia (10x).

La línea de cáncer de vejiga no generó ninguna CFU en placas tratadas con gelatina, por lo que, se decidió sembrar 500 células de la línea **UM-UC-3** en placas sin gelatina (**figura 13**).

Figura 13. Clonogenicidad de la línea tumoral de cáncer de vejiga UM-UC-3 mediante ensayos clonogénicos. Gráfica (A) y micrografía (B) de una CFU. (Aumento: 10x).



Para los experimentos con los fármacos, todas las líneas fueron expuestas durante 24 horas a dosis crecientes de los compuestos de forma individual. En el caso de las combinaciones, se utilizaron dosis isoeffectivas de los fármacos TAICAs y dosis crecientes de los agentes entrecruzantes simultáneamente durante 24 horas. Estos aspectos se explicarán con más detalle en el apartado de resultados correspondiente.

3.5.2. Análisis por citometría de flujo: viabilidad, apoptosis y ciclo celular

Para el estudio de la **viabilidad** de células en suspensión, se contaron células en crecimiento exponencial y se diluyeron a una concentración de 2×10^5 células/ml por pocillo en placas de 24 pocillos (Becton Dickinson), exponiéndose a dosis crecientes de los fármacos. Después de 3 ó 5 días, dependiendo de la línea celular, las células se resuspendieron en PBA (PBS + 1% albúmina) con 2mg/ml de yoduro de propidio (IP) y se analizó la viabilidad celular en un citómetro de flujo EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL). El número mínimo de células analizado fue 5000-10000 células viables. El análisis posterior de los datos se realizó utilizando el software CXP (Beckman Coulter Inc.). Con los datos obtenidos, se realizaron las correspondientes curvas de supervivencia y se calcularon los valores de IC.

Los estudios de **apoptosis** se llevaron a cabo en las líneas LCLs control y en la línea leucémica Kasumi-1 empleando el ensayo de Anexina V (BD Pharmingen™). Las células se expusieron durante diferentes tiempos a MMC 40nM, trabectedina 10nM, PM01183 10nM y Zalypsis® 20nM. Tras la incubación con los fármacos, se lavaron las células con PBS frío y se resuspendieron en tampón de unión a una concentración de 1×10^6 células/ml. A continuación, 100 µl de células se incubaron con 5 µl del anticuerpo anti-Anexina V conjugado con ficoeritrina (PE) y 5 µl del colorante vital 7-AAD (7-amino-actinomicina D)

durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se resuspendieron en tampón de unión para su análisis por citometría.

El **ciclo celular** se evaluó en las mismas líneas celulares que en el análisis de la apoptosis y en las mismas condiciones experimentales. En este caso, se midió la cantidad total de ADN en cada célula mediante citometría de flujo. Después de 24 horas con los diferentes tratamientos, se recogieron 1×10^6 células viables y se fijaron con etanol frío al 70% durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se eliminó el etanol de las muestras y se resuspendieron las células en 1ml de una solución de PBS + IP 40µg/ml + ARNasa 0,1mg/ml y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. La cuantificación de la fluorescencia del IP en las células fijadas mediante el programa ModFit LT™ (Verita Software House, Topsham, ME) permitió clasificar las células según el contenido de ADN: 2n (fase G₀₋₁), 4n (fase G₂) o intermedio (fase S).

3.6. Análisis de la expresión génica

Para el análisis de los niveles de ARN mensajero (ARNm) y de proteína, las células se incubaron durante 24 horas con MMC 40nM, trabectedina 10nM, PM01183 10nM y Zalypsis® 20nM, todas ellas dosis clínicamente relevantes, utilizando como control del experimento células sin tratar. Se seleccionaron estas dosis teniendo en cuenta trabajos publicados previamente con trabectedina (Casado *et al.*, 2008). En cuanto a PM01183, se seleccionó la misma dosis que en trabectedina puesto que sus perfiles de efecto celular eran similares. También en base a los datos de supervivencia celular, se utilizó una dosis dos veces superior en Zalypsis®. En ningún caso las dosis utilizadas indujeron una mortalidad superior al 50% en los tiempos establecidos.

En el caso de los cultivos líquidos, se sembraron 4×10^6 células por condición en medio fresco y, para las células adherentes, se sembraron de $2-3 \times 10^6$ células por placa de 100 x 20 mm (Corning® Inc.).

3.6.1. Análisis de los niveles de ARNm por RT-qPCR

La extracción del ARN total de los cultivos celulares se hizo siguiendo las indicaciones de la casa comercial a la que se adquirieron los reactivos (Ref: 11828665001, Roche).

Para la transcripción reversa (RT) a ADNc (ADN complementario) se utilizó el kit comercial RETROscript[®] First Strand Synthesis de Ambion (Life Technologies, San Antonio, TX), de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y se realizó con 1 µg de ARN total en un volumen final de la reacción de 20 µl, de los cuales 1µl corresponde a la retrotranscriptasa (M-MLV RT, *Moloney Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase*). La mezcla también incluía un inhibidor de ARNasas. El protocolo de temperaturas que se siguió en el termociclador fue 44 °C x 60 min, para anillado y extensión, y 92 °C x 10 min para la inactivación enzimática.

Seguidamente, se llevó a cabo una PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a tiempo real para analizar los niveles de expresión de los genes a estudiar, llevando como gen constitutivo o *housekeeping* el gen de la beta-glucuronidasa (*GUS-B*), mediante la utilización del reactivo Fast SYBR[®] Green PCR Master mix (Applied Biosystems Life Technologies) en un volumen de mezcla de 20 µl que contenía 1x Fast SYBR[®] Green Master mix, 300nM de cebadores específicos sentido y antisentido para los genes a analizar (*FANCA* y *FANCD2*), además del *GUS-B* como *housekeeping*, y 10 ng de ADNc teórico. Como control negativo de la reacción, se incluyó un punto sin ADNc. También se probaron otros genes constitutivos, como el de la β -actina y el de la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*). Finalmente se decidió utilizar *GUS-B* por su mayor estabilidad en las diferentes condiciones experimentales. Las reacciones de PCR a tiempo real (qPCR) se hicieron en el modelo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems Life Technologies) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial.

El diseño de los cebadores se realizó con el programa ProbeFinder versión 2.45 (Roche). Además, se completó con el análisis de homología entre las secuencias de los cebadores y los genes de interés mediante la herramienta para la búsqueda de alineamiento BLASTN, confirmándose que dicha homología era única (**tabla I**). La eficiencia de los cebadores fue de 1,98–2,38.

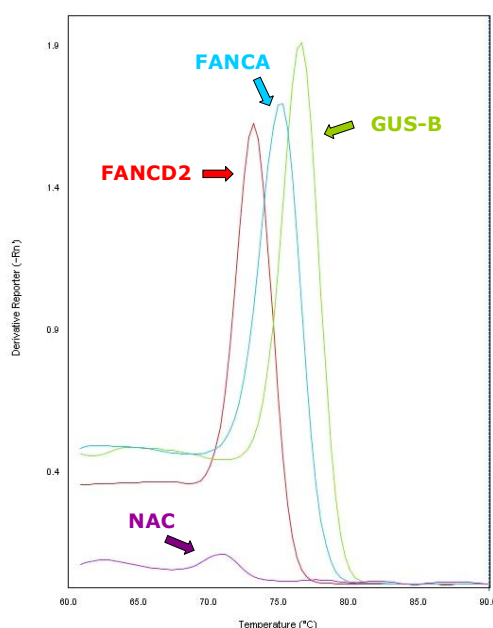


Figura 14. Ejemplo de curvas de disociación de genes amplificados mediante PCR cuantitativa (qPCR). La figura muestra las curvas de disociación obtenidas en una reacción de PCR en la que se han amplificado los genes *FANCD2* y *FANCA*, así como el gen *GUS-B*, tras retrotranscripción de 1µg de ARN de la línea celular LCL. Se observa un único pico máximo de temperatura de disociación o de *melting* (T_m), específico de cada uno de los transcritos amplificados. Como control negativo de la reacción, se incluye un punto de la reacción de retrotranscripción sin ARN (NAC, *Non Amplification Control*).

Los productos de PCR fueron analizados con el software 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems Life Technologies). El análisis de la curva de disociación o de *melting* (**figura 14**) mostraba un único pico con la temperatura de *melting* (T_m) esperada para cada muestra. Para la determinación del cambio relativo en la expresión de cada gen por qPCR, se utilizó el método del "doble delta Ct (*Cycle threshold*) ($\Delta\Delta Ct$)", generando una recta de calibrado que contenga la misma cantidad de ADNc teórico que los puntos a analizar pero además 10 y 100 veces menos (10^{-1} - $0,1$).

Especie	Gen	Genbank™	Cebadores sentido y antisentido (5' a 3')	Localización/ Tamaño amplicón	T_m (°C) amplicón
<i>Homo sapiens</i>	<i>FANCD2</i>	AF230336	CCCAGAACTGATCAACTCTCCT CCATCATCACACGGAAGAAA	3687 - 3781 95pb	73,3-74,0
	<i>FANCA</i>	NM_000135	GCTCAAGGGTCAGGGCAAC TGTGAGAAGCTCTTTTCGGG	4197 - 4293 96pb	75,9-76,6
	<i>GUS-B</i>	NM_000181	CCTGTGACCTTTGTGAGCAA AACAGATCACATCCACATACGG	1508 - 1577 70pb	74,7-75,2
	<i>GAPDH</i>	NM_002046	GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC ACGACCAAATCCGTTGACTC	99 - 214 115pb	79,3-80,2
	<i>β-actina</i>	NM_001101	ATTGGCAATGAGCGGTTCC CACAGGACTCCATGCCCA	832 - 902 70pb	77,8-79,9

Tabla I. Cebadores utilizados en la reacción de PCR a tiempo real (qPCR).

3.6.2. Análisis de los niveles de proteína por *Western Blot*

Para la extracción de proteína total, $2-4 \times 10^6$ células fueron lisadas utilizando un tampón de lisis compuesto por: 1M Tris [tris(hidroximetil)aminometano] HCl, pH 8; 5M NaCl; 10% Nonidet NP40 (Roche), suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatas de Roche. Las células se incubaron durante 30 minutos con el tampón de lisis en hielo y, tras 20 minutos de centrifugación a máxima velocidad a 4°C, se recogieron los sobrenadantes. La cuantificación de proteínas se realizó según el método Bradford (Bio-Rad Laboratorios Inc., Hercules, CA) (Bradford, 1976) en un espectrofotómetro de la casa comercial Eppendorf (Madrid, España) y utilizando como curva patrón controles de concentración conocida de albúmina de suero bovino (BSA, Bio-Rad).

La separación de proteínas se realizó por electroforesis en minigeles verticales de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate* -

Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Estos geles verticales se componían de dos regiones: el gel empaquetador en la parte superior (0,5M Tris HCl pH 6,8, 4% acrilamida:bisacrilamida y 10% SDS) y el gel de resolución en la parte inferior (1,5M Tris HCl pH 8,8, 6% acrilamida:bisacrilamida y 10% SDS). Para polimerizarlos se utilizó persulfato amónico y TEMED, ambos de Bio-Rad.

Se cargó un total de 40 µg de proteína por calle, previa desnaturalización, y un marcador de peso molecular (Fermentas, York, Reino Unido). La electroforesis se realizó a voltaje constante (100V) en tampón de Tris-glicina y SDS al 1%. Tanto los tanques como los sistemas de preparación de geles y las fuentes de alimentación fueron adquiridos en Bio-Rad. A continuación, se llevó a cabo la transferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) en tampón de transferencia (tampón Tris-glicina, 20% metanol, 0,1% SDS). Finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó en el tampón de lavado TTBS (Tris-HCl 1M pH 7,8, NaCl 4M y Tween[®]-20 0.1% (v/v) (Sigma-Aldrich)) al 5% (p/v) de leche sin grasa y se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación con el anticuerpo primario correspondiente, *Rabbit* anti-FANCD2 (dilución 1:1000) o *Mouse* anti-vinculina (dilución 1:2000).

Tras realizar tres lavados con TTBS, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario apropiado (*Goat* anti-*rabbit* conjugado con peroxidada o *Sheep* anti-*mouse* conjugado con peroxidasa), durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Todos los anticuerpos utilizados fueron adquiridos en Abcam (Cambridge, Reino Unido). Finalmente, se realizaron tres lavados con TTBS y las proteínas se visualizaron con el sistema quimioluminiscente Supersignal de Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL). Se realizó una medición por densitometría mediante el programa ImageJ.

3.7. Análisis de formación de focos nucleares de FANCD2 por inmunofluorescencia

Las células (LCLs control y EUFA1365 complementada) fueron sembradas en portaobjetos cubiertos tratados previamente con gelatina al 0,1%, en el caso de células adherentes, o con retronectina diluida 1:100, en el caso de células en suspensión. Las células fueron incubadas durante 24 horas con MMC 40nM, trabectedina 10nM, PM01183 10nM y Zalypsis[®] 20nM, dejando un pocillo con células sin tratar. Después de 24 horas de exposición a los fármacos, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 3,7% en PBS. A continuación, se permeabilizaron las células con Triton X-100 (Merck) al

0.5% en agua durante 5 minutos. Después de 30 minutos en un tampón de bloqueo (suero bovino fetal al 10% y NP-40 al 0,1% en PBS), las células fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario *Rabbit* anti-FANCD2 (1:250; Abcam).

Posteriormente, las células fueron lavadas tres veces con TBS (Tris HCl 1M, pH 7,8, NaCl 4M en agua) e incubadas con el colorante fluorescente nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI, 1:1000, Roche) y el anticuerpo secundario, bien *Donkey* anti-*rabbit* conjugado con *Texas Red* (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) a 1:500 o bien *Goat* anti-*rabbit* conjugado con Alexa Fluor® 488 (1:1000; Invitrogen Life Technologies, Paisley, Reino Unido), durante 45 minutos en oscuridad. A continuación, se llevaron a cabo tres lavados con TBS y se montaron las preparaciones con Moviol (Sigma-Aldrich). Se analizaron como mínimo 200 células por condición mediante un microscopio de fluorescencia Axioplan 2 (Carl Zeiss Microscopy LLC, Thornwood, NY) y se consideraron positivas aquellas células con más de 10 focos de reparación (Casado *et al.*, 2007).

3.8. Ensayos de actividad promotora

Para analizar el efecto de los fármacos TAICAs sobre el promotor del gen *FANCD2*, se utilizó el plásmido pGL2-FANCD2, plásmido reportero con luciferasa pGL2-Basic (Promega, Fitchburg, WI) en el que se subclonó 1Kb de la región 5' del promotor del gen *FANCD2*. Asimismo, se nos facilitó el plásmido control pGL2-Basic vacío (**figura 15**). Ambos vectores fueron cedidos por el grupo de la Dra. Wells (*Division of Hematology/Oncology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH*) (Hoskins *et al.*, 2008).

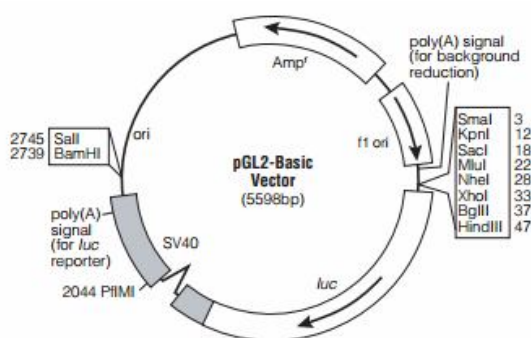


Figura 15. Plásmido pGL2-Basic (Promega).

Previamente a realizar los experimentos con las células, las construcciones se confirmaron tanto por digestión como por secuenciación.

Para los ensayos de luciferasa, se probaron dosis crecientes de ADN para transfectar de forma transitoria con Fugene las siguientes líneas celulares: MRC5, EUFA1365 FA-A

complementada y 293T. Aproximadamente 24 horas antes de la transfección, se sembraron 10.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos con fondo plano transparente y las paredes del pocillo opacas (PerkinElmer, Waltham, MA) con el objetivo de conseguir una confluencia alrededor del 70-80 % al día siguiente. Para la transfección, se preparó, por cada 3 pocillos, una mezcla de 50 μ l medio fresco y 1,5 μ l Fugene y, tras 5 minutos de estabilización, se añadieron 50 μ l de medio fresco y la cantidad de ADN correspondiente. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 20 μ l mezcla/pocillo gota a gota. Como control negativo de la transfección, se incluyó una condición sin ADN. Los ensayos de luciferasa se realizaron por triplicado. Se analizó la actividad promotora 48 horas post-transfección con el kit Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) en el lector de placas multifuncional GENios Pro de Tecan Group Ltd. (Männedorf, Suiza).

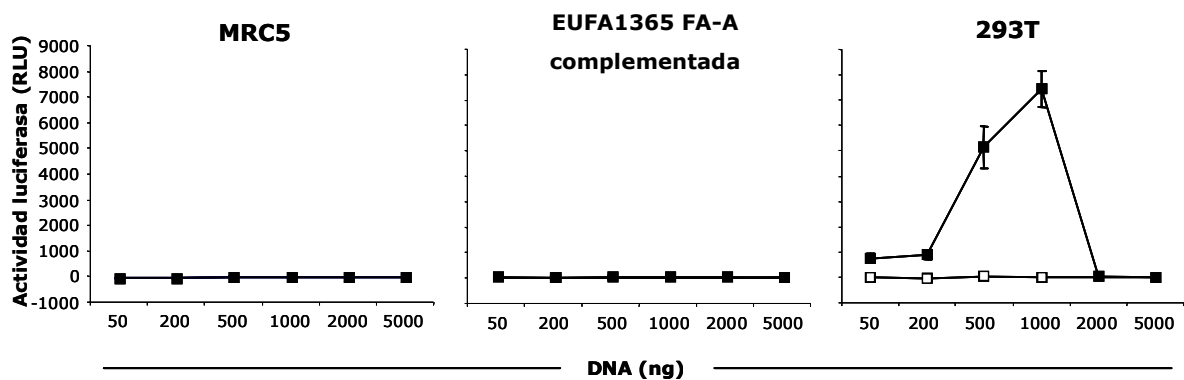


Figura 16. Curva de cantidad de ADN a transfectar de los plásmidos pGL2-BASIC (□) y pGL2-FANCD2 (■) en diferentes líneas celulares (RLU: *Relative Light Units*).

Como resultado de esta primera aproximación (**figura 16**), para los experimentos con fármacos se transfectaron células 293T con 1 μ g del plásmido pGL2-Basic o pGL2-FANCD2 por cada tres pocillos durante 24 horas. A continuación, se expusieron las células a MMC 40nM, trabectedina 10nM, PM01183 10nM y Zalypsis[®] 20nM durante 24 horas, así como una condición sin fármaco como control, y se analizó la actividad luciferasa de tres experimentos independientes. Los valores obtenidos se relativizaron a la condición control.

3.9. Análisis estadístico

Los resultados de supervivencia celular se calcularon como porcentaje respecto a los respectivos controles. Las curvas de supervivencia se obtuvieron mediante el ajuste de regresión por mínimos cuadrados sólo en aquellos casos en los que se obtuvieron, al menos, tres puntos en la zona de caída exponencial de la curva. Los valores de IC₅₀, IC₇₀ e IC₉₀ se

obtuvieron algebraicamente, resolviendo la ecuación de mínimos cuadrados resultante del ajuste anterior para porcentajes de supervivencia estimados del 50, 30 y 10% respectivamente.

Todos los datos se presentan como la media aritmética \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes. La significación de las diferencias entre los grupos fue determinada utilizando el análisis de *t-Student*. El procesamiento y los análisis de los datos fueron realizados usando el programa informático Statgraphics Plus (Manugistics Inc., Roskville, MD).

En cuanto a los resultados obtenidos en los ensayos de exposición a combinaciones de fármacos TAICAs con agentes entrecruzantes del ADN, se expresan de dos formas complementarias:

- Mediante el cálculo del **Índice de Combinación (CI, Combination Index)** con el algoritmo de Chou-Talalay (Chou and Talalay, 1984):

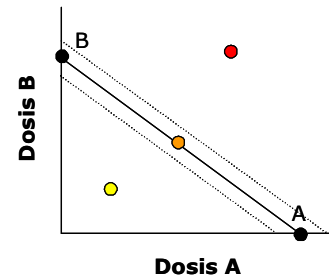
$$CI = \frac{(D)_1}{(Dx)_1} + \frac{(D)_2}{(Dx)_2}$$

donde los denominadores $(Dx)_1$ y $(Dx)_2$ son las dosis de cada fármaco expuesto de manera única y que produce una inhibición en el crecimiento de $x\%$; los numeradores $(D)_1$ y $(D)_2$, las dosis de esos mismos compuestos administrados en combinación y que producen la misma inhibición del crecimiento ($x\%$), es decir, que son isoefectivos. Existen tres posibles resultados con este algoritmo: $CI < 1$, donde el efecto de la combinación es sinérgico; $CI = 1$, que implica un comportamiento aditivo; y $CI > 1$, lo que se traduce en un efecto antagónico.

- Mediante la expresión de los resultados en **Isobogramas**: representaciones gráficas en un eje de coordenadas de dosis que producen un efecto determinado de cada uno de los fármacos empleados individualmente (A, B) y de su combinación (ab), siendo válidas sólo para el nivel de efecto escogido (Williams, 1992; Berenbaum, 1989). En cada uno de los ejes se representa la dosis isoefectiva \pm error estándar de cada fármaco a estudiar y estos puntos se unen mediante una línea o isobola (también llamada línea de aditividad) (**figura 17**). Seguidamente, se representa el valor de las dosis de ambos fármacos en la combinación (ab) que presentan el mismo efecto que por separado. Si este punto se encuentra por debajo de la línea de aditividad, la combinación es sinérgica; si

está por encima, existe antagonismo y si está sobre la línea o dentro de las líneas que unen los errores estándares, el efecto es aditivo.

Figura 17. Isoblograma teórico. A, Dosis de fármaco A para un efecto determinado; B, dosis de fármaco B para el mismo efecto que A; ●, cuando la combinación de A y B (ab) es sinérgica; ●, ab es aditiva; ●, ab es antagónica.



4. Resultados

4. RESULTADOS

4.1. La inactivación de la ruta de AF sensibiliza a progenitores hematopoyéticos y líneas linfoblásticas frente a los fármacos TAICAs

Para el estudio de células no tumorales, se eligieron dos modelos: uno de origen murino (progenitores hematopoyéticos de médula ósea) y otro humano (líneas linfoblastoides B inmortalizadas). En ambos modelos se utilizaron células competentes y células deficientes en distintos genes *FANC*.

Como fármaco control que genera ICLs, se eligió el compuesto MMC, ya que las células deficientes en genes *FANC* presentan una hipersensibilidad característica (Oostra *et al.*, 2012). En este apartado se describen los resultados de la respuesta de estas células frente a trabectedina, Zalypsis® y PM01183.

4.1.1. Precursores hematopoyéticos murinos

En la **figura 18** se recogen las curvas de supervivencia de los precursores mieloides (CFU-GM) de MO de ratones con mutaciones en los genes *Fanca* y *Brca2/Fancd1* y de sus respectivos ratones control, tras su exposición *in vitro* a distintas concentraciones de trabectedina, Zalypsis® y PM01183. Asimismo, las correspondientes concentraciones de cada compuesto que inhibieron al 50, 70 y 90% el crecimiento (IC₅₀, IC₇₀ e IC₉₀ respectivamente) se recogen en la **tabla II**.

Los progenitores hematopoyéticos de los **ratones FA-A** fueron más sensibles, tanto a trabectedina como a Zalypsis®, que los correspondientes en ratones control, de forma estadísticamente significativa. En el caso del PM01183, aunque se observó una menor sensibilidad de los precursores mieloides de los ratones deficientes, dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas ni en los valores de supervivencia ni en los valores de IC.

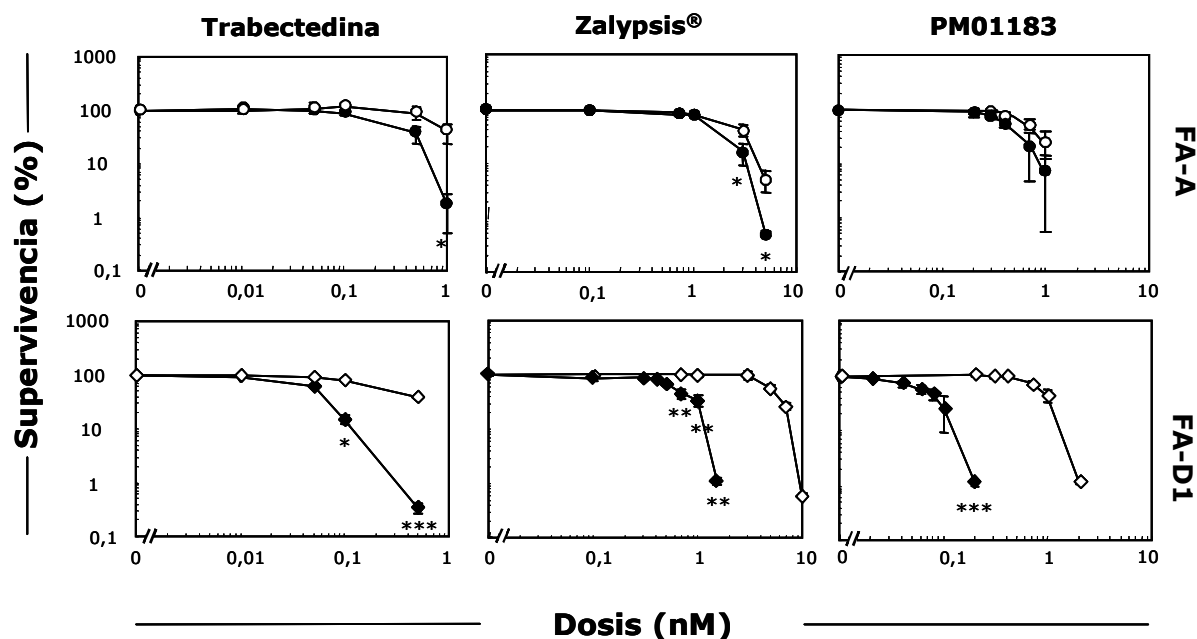


Figura 18. Curvas de supervivencia de los progenitores granulo-macrofágicos murinos de ratones deficientes en genes *Fanc* (*Fanca*^{-/-} (●), *Brca2*^{Δ27/Δ27} (◆)) versus sus respectivos controles (*Fanca*^{+/+} (○), *Brca2*^{+/+} (◇)) expuestos a los fármacos TAICAs durante 7 días. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

En el caso de los **ratones FA-D1**, la diferencia de sensibilidad con su control fue considerablemente mayor a la obtenida en los resultados descritos anteriormente con cualquiera de los tres fármacos estudiados. En todos los casos, las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas y, tal como se muestra en la **tabla II**, los mayores niveles de significación se alcanzaron en el caso de exposiciones a Zalypsis® (p<0,01 y p<0,001).

Aunque todos los compuestos utilizados mostraron efecto en el rango de nanomolar, cabe destacar que trabectedina y PM01183 fueron efectivos en los mismos rangos de concentración, mientras que las concentraciones efectivas de Zalypsis® fueron más de 3 veces superiores a las de los fármacos anteriores.

	<i>Fanca</i> ^{-/-}	<i>Fanca</i> ^{+/+}	<i>Brca2</i> ^{$\Delta 27/\Delta 27$}	<i>Brca2</i> ^{+/+}
Trabectedina (nM)				
IC ₅₀	0,47 ± 0,07*	0,91 ± 0,18	0,08 ± 0,02*	0,62 ± 0,21
IC ₇₀	0,65 ± 0,07*	1,20 ± 0,19	0,13 ± 0,03*	0,88 ± 0,28
IC ₉₀	0,86 ± 0,08*	1,49 ± 0,21	0,29 ± 0,06*	1,14 ± 0,34
Ratio IC ₅₀	1,94 ± 0,01 [#]		7,75 ± 0,05	
Zalypsis® (nM)				
IC ₅₀	1,88 ± 0,11*	2,49 ± 0,16	0,72 ± 0,12**	5,29 ± 0,34
IC ₇₀	2,76 ± 0,24	3,52 ± 0,25	0,90 ± 0,17**	7,01 ± 0,30
IC ₉₀	3,65 ± 0,37	4,56 ± 0,34	1,08 ± 0,23***	8,73 ± 0,26
Ratio IC ₅₀	1,32 ± 0,01 [#]		7,34 ± 0,02	
PM01183 (nM)				
IC ₅₀	0,48 ± 0,10	0,79 ± 0,17	0,08 ± 0,02**	1,00 ± 0,09
IC ₇₀	0,63 ± 0,15	1,09 ± 0,27	0,12 ± 0,04*	1,29 ± 0,15
IC ₉₀	0,78 ± 0,20	1,39 ± 0,37	0,15 ± 0,05*	1,58 ± 0,22
Ratio IC ₅₀	1,65 ± 0,01		12,5 ± 0,04	
Ratio IC ₅₀ MMC	6,83 [§]		9,80 [§]	

Tabla II. Concentraciones de inhibición del 50, 70 y 90% de los progenitores hematopoyéticos murinos expuestos a trabectedina, Zalypsis® y PM01183. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, respecto control correspondiente; Ratio IC₅₀: coeficiente entre la IC₅₀ de las células control y la IC₅₀ de las células deficientes en genes *Fanc*. (# = error estándar < 0,01; § = valores obtenidos a partir de gráficos en Navarro *et al.*, 2006 y Río *et al.*, 2002).

Datos publicados anteriormente por nuestro grupo demostraron que los precursores mieloides de estos dos modelos murinos de AF son hipersensibles al agente entrecruzante clásico MMC (Navarro *et al.*, 2006; Río *et al.*, 2002), habiéndose obtenido diferencias de sensibilidad de unas 7 y 10 veces superiores en ratones FA-A y FA-D1, respectivamente.

4.1.2. Linfoblastos humanos inmortalizados

Como modelo celular humano, se utilizaron diferentes líneas linfoblastoides derivadas de donantes sanos y pacientes con AF pertenecientes a los grupos de complementación FA-A y FA-J. Las curvas de supervivencia correspondientes se muestran en la **figura 19** y sus valores de IC se recogen en la **tabla III**.

Las curvas de supervivencia muestran que las líneas FA-A y FA-J fueron más sensibles que su control a cualquiera de los tres fármacos TAICAs. Como era de esperar, también mostraron hipersensibilidad frente al agente entrecruzante clásico MMC.

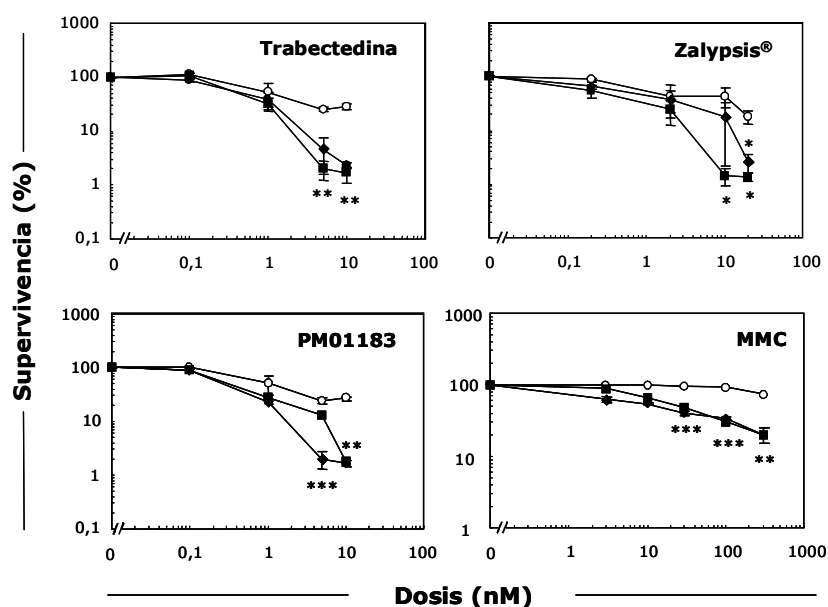


Figura 19. Curvas de supervivencia de las células linfoblastoides deficientes en genes *FANC* (FA-A (◆), FA-J (■)) y la control (○) expuestas durante 5 días a trabectedina, Zalypsis®, PM01183 y MMC. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Estas diferencias se reflejan más claramente en los valores de IC correspondientes. Mientras que existieron diferencias estadísticamente significativas en todos los valores de IC de la línea FA-J para todos los fármacos TAICAs, sólo trabectedina y PM01183 mostraron diferencias estadísticamente significativas para la línea FA-A (**tabla III**). Aunque las diferencias observadas entre los valores de IC para Zalypsis® entre control y FA-A no fueron estadísticamente significativas, los valores de p fueron muy próximos a 0,05. A pesar de no encontrarse diferencias estadísticas, cabe señalar que los valores de IC de la línea LCL FA-A para Zalypsis® son el doble de los obtenidos para los de la línea LCL FA-J.

	LCLs CT	FA-A	FA-J
Trabectedina (nM)			
IC ₅₀	4,20 ± 0,44	1,48 ± 0,52*	1,76 ± 0,10**
IC ₇₀	6,76 ± 1,12	2,91 ± 0,42*	2,97 ± 0,10*
IC ₉₀	9,31 ± 2,02	4,33 ± 0,33*	4,18 ± 0,11*
Ratio IC ₅₀		2,84 ± 0,01	2,39 ± 0,01 [#]
Zalypsis® (nM)			
IC ₅₀	9,16 ± 2,13	3,49 ± 2,18	1,44 ± 0,84*
IC ₇₀	15,96 ± 1,55	6,58 ± 3,50	3,47 ± 1,36**
IC ₉₀	22,77 ± 2,58	9,66 ± 4,85	5,93 ± 2,12**
Ratio IC ₅₀		2,62 ± 0,02	6,36 ± 0,05
PM01183 (nM)			
IC ₅₀	4,88 ± 1,10	1,49 ± 0,28*	1,57 ± 0,53*
IC ₇₀	8,75 ± 0,64	4,17 ± 0,83*	4,22 ± 0,76*
IC ₉₀	12,63 ± 0,19	6,83 ± 1,37*	6,89 ± 1,42*
Ratio IC ₅₀		3,28 ± 0,01	3,11 ± 0,02
MMC (nM)			
IC ₅₀	617,61 ± 35,54	125,80 ± 50,44**	255,56 ± 121,45*
IC ₇₀	870,26 ± 45,29	485,30 ± 33,57**	634,11 ± 77,06
IC ₉₀	1122,90 ± 59,29	1096,42 ± 76,70	1023,00 ± 26,71
Ratio IC ₅₀		4,91 ± 0,02	2,41 ± 0,01

Tabla III. Concentraciones de inhibición del 50, 70 y 90% de las células linfoblásticas humanas expuestas a trabectedina, Zalypsis®, PM01183 y MMC durante 72 horas. *p<0,05, **p<0,01, respecto LCLs control; Ratio IC₅₀: coeficiente entre la IC₅₀ de las células control y la IC₅₀ de las células deficientes en genes *FANC*. (# = error estándar < 0,01).

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos muestran que la deficiencia en genes *FANC* sensibiliza a progenitores y líneas hematopoyéticas, no sólo frente a MMC, sino también frente a cualquiera de los tres fármacos TAICAs utilizados en este estudio.

4.2. La deficiencia en genes *FANC* no afecta a la sensibilidad de células tumorales frente a los fármacos TAICAs

Con el objetivo de conocer si la implicación de los genes *FANC* en la respuesta de las células tumorales a los fármacos TAICAs era similar a la observada en células sanas, se abordaron experimentos de exposición a los mencionados fármacos en diferentes líneas celulares tumorales.

4.2.1. Células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello

La **figura 20** muestra las curvas de supervivencia obtenidas con las líneas celulares EUFA1365 FA-A y EUFA1131 FA-C tras 24 horas de exposición a los fármacos. Como era de esperar, ambas líneas fueron hipersensibles a MMC en comparación con su correspondiente línea complementada. Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas, tal como muestran los valores de IC que se recogen en la **tabla IV**. El valor de IC_{50} fue aproximadamente 5 veces inferior, en el caso de la línea EUFA1365 FA-A, y unas 8 veces inferior, para EUFA1131 FA-C, en comparación con las correspondientes líneas complementadas.

A diferencia de lo observado ante una exposición a MMC, las células deficientes en genes *FANC* mostraron una sensibilidad a los fármacos de tipo TAICA similar a la obtenida en sus respectivos controles (las mismas células complementadas genéticamente con vectores retrovirales). En la **figura 21**, a modo de ejemplo, se puede apreciar la diferencia entre la densidad de colonias de una de las líneas deficientes y su correspondiente complementada expuestas al agente entrecruzante control MMC y al fármaco antitumoral de origen marino Zalypsis®.

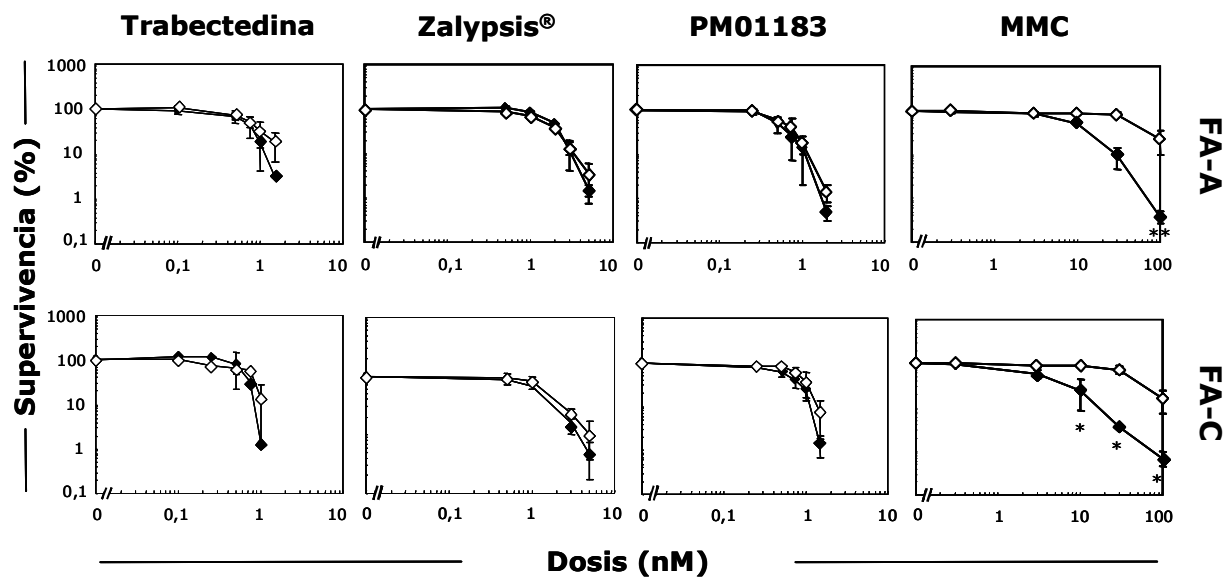


Figura 20. Curvas de supervivencia de las células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello EUFA1365 FA-A y EUFA1131 FA-C (♦) y sus respectivas líneas complementadas (◇) en respuesta a trabectedina, Zalypsis®, PM01183 y MMC. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

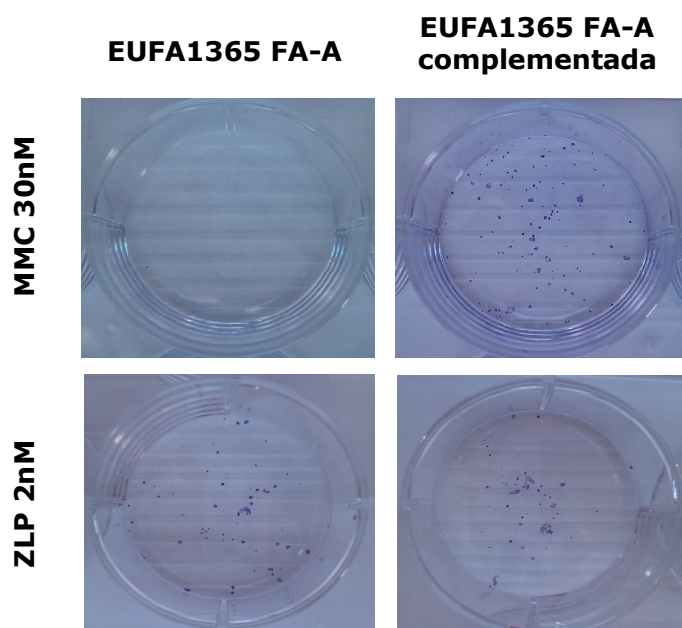


Figura 21. Imagen representativa de CFUs de células de carcinoma escamoso deficientes en el gen *FANCA* y la complementada expuestas a MMC y Zalypsis® (ZLP).

	EUFA1365 FA-A	EUFA1365 FA-A complementada	EUFA1131 FA-C	EUFA1131 FA-C complementada
Trabectedina (nM)				
IC ₅₀	0,62 ± 0,16	0,83 ± 0,20	0,57 ± 0,04	0,69 ± 0,13
IC ₇₀	0,86 ± 0,16	1,05 ± 0,24	0,74 ± 0,05	0,86 ± 0,12
IC ₉₀	1,09 ± 0,16	1,26 ± 0,28	0,92 ± 0,07	1,06 ± 0,13
Ratio IC ₅₀	1,33 ± 0,01		1,21 ± 0,01 [#]	
Zalypsis® (nM)				
IC ₅₀	2,12 ± 0,16	1,78 ± 0,11	1,85 ± 0,27	2,09 ± 0,12
IC ₇₀	2,73 ± 0,30	2,56 ± 0,24	2,69 ± 0,37	3,00 ± 0,36
IC ₉₀	3,34 ± 0,44	3,35 ± 0,38	3,52 ± 0,50	3,90 ± 0,80
Ratio IC ₅₀	0,83 ± 0,01 [#]		1,13 ± 0,01 [#]	
PM01183 (nM)				
IC ₅₀	0,64 ± 0,20	0,68 ± 0,13	0,54 ± 0,23	0,92 ± 0,17
IC ₇₀	0,85 ± 0,27	0,92 ± 0,21	0,87 ± 0,17	1,18 ± 0,23
IC ₉₀	1,04 ± 0,35	1,17 ± 0,29	1,20 ± 0,14	1,46 ± 0,30
Ratio IC ₅₀	1,06 ± 0,01		1,70 ± 0,01	
MMC (nM)				
IC ₅₀	13,24 ± 1,04*	65,86 ± 14,42	6,91 ± 2,92**	58,41 ± 8,54
IC ₇₀	21,24 ± 1,28*	95,62 ± 20,29	13,46 ± 4,08**	83,31 ± 10,94
IC ₉₀	29,23 ± 1,80*	125,38 ± 26,19	20,01 ± 5,88**	108,21 ± 13,43
Ratio IC ₅₀	4,97 ± 0,01		8,45 ± 0,05	

Tabla IV. Concentraciones de inhibición del 50, 70 y 90% de las células de carcinoma escamoso de cabeza y cuello humano expuestas a trabectedina, Zalypsis®, PM01183 y MMC. *p<0,05, **p<0,01, respecto a su correspondiente línea complementada; Ratio IC₅₀: coeficiente entre la IC₅₀ de las células complementadas y la IC₅₀ de las células deficientes en genes *FANC*. (# = error estándar < 0,01).

Los resultados obtenidos con las líneas de carcinoma escamoso estudiadas muestran que las células deficientes en genes *FANC* son más sensibles a MMC en comparación con las células complementadas genéticamente. Sin embargo, la respuesta a los fármacos TAICAs de las líneas tumorales deficientes en los genes *FANCA* y *FANCC* y las mismas células complementadas genéticamente es similar.

4.2.2. Células leucémicas

Las líneas leucémicas estudiadas fueron la línea leucémica megacarioblástica CHRF28811 FA-F, deficiente en la expresión del gen *FANCF* por hipermetilación de su promotor, y la línea Kasumi-1, con la translocación AML1-ETO, interferida en el gen *FANCA*.

En el caso de la **línea CHRF28811 FA-F**, los porcentajes de supervivencia se compararon con los de la línea parental transducida con un vector retroviral que portaba el gen *FANCF* y el gen marcador *EGFP*. Como control de la transducción, se utilizó la línea parental transducida con un vector retroviral sólo con el gen marcador *EGFP*. Esta población celular también fue estudiada para descartar que el gen marcador pudiera afectar a la sensibilidad celular frente a los compuestos estudiados. Como se puede observar, en ningún caso la introducción del gen *EGFP* marcó un comportamiento diferente en las células.

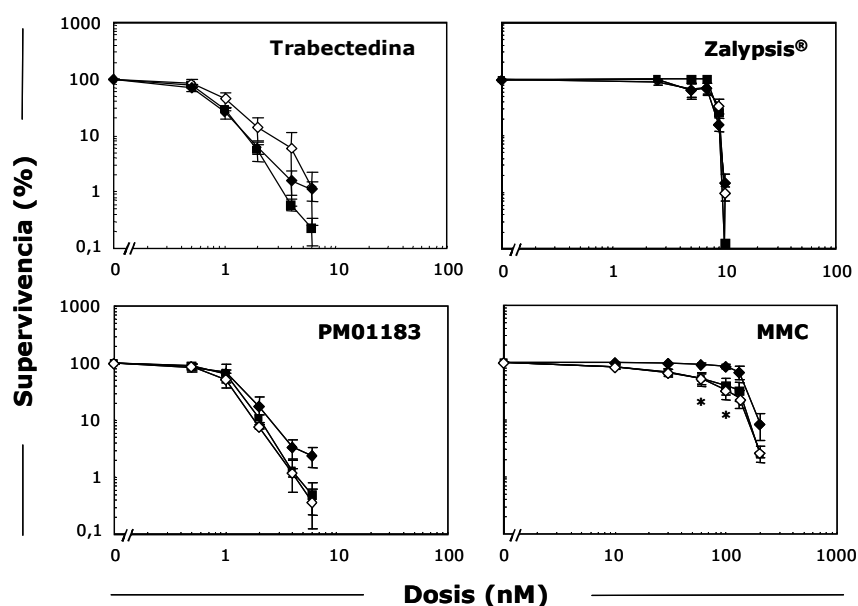


Figura 22. Curvas de supervivencia en cultivo líquido de la línea celular de LMA CHRF28811 FA-F con el promotor del gen *FANCF* hipermetilado (■), la línea complementada (♦) y la línea control de la transducción (◇) expuestas a trabectedina, Zalypsis®, PM01183 y MMC. * $p < 0,05$.

Las curvas de supervivencia obtenidas después de una exposición de 72 horas a trabectedina, PM01183, Zalypsis® o MMC se muestran en la **figura 22**, así como sus valores de IC en la **tabla V**.

	CHRF28811 FA-F	CHRF28811 FA-F complementada	CHRF28811 FA-F + vector control
Trabectedina (nM)			
IC ₅₀	0,89 ± 0,02	1,14 ± 0,36	0,66 ± 0,29
IC ₇₀	1,33 ± 0,02	1,76 ± 0,40	1,21 ± 0,17
IC ₉₀	1,78 ± 0,03	2,36 ± 0,47	1,77 ± 0,05
Ratio IC ₅₀			1,28 ± 0,01
Zalypsis® (nM)			
IC ₅₀	7,98 ± 0,30	7,45 ± 0,99	7,38 ± 0,80
IC ₇₀	8,82 ± 0,13	8,58 ± 0,59	7,39 ± 1,46
IC ₉₀	9,67 ± 0,05	9,71 ± 0,21	9,41 ± 0,14
Ratio IC ₅₀			0,93 ± 0,01 [#]
PM01183 (nM)			
IC ₅₀	1,25 ± 0,09	1,17 ± 0,47	1,09 ± 0,19
IC ₇₀	1,63 ± 0,05	1,74 ± 0,54	1,50 ± 0,12
IC ₉₀	2,01 ± 0,02	2,30 ± 0,62	1,91 ± 0,05
Ratio IC ₅₀			0,94 ± 0,01 [#]
MMC (nM)			
IC ₅₀	87,83 ± 28,75	393,04 ± 163,86	66,42 ± 26,86
IC ₇₀	136,31 ± 38,46	548,72 ± 235,42	108,40 ± 25,82
IC ₉₀	184,80 ± 48,19	704,40 ± 307,03	150,37 ± 24,97
Ratio IC ₅₀			4,48 ± 0,05

Tabla V. Concentraciones de inhibición del 50, 70 y 90% de las células de LMA con el promotor del gen *FANCF* hipermetilado expuestas a trabectedina, Zalypsis®, PM01183 y MMC. Ratio IC₅₀: coeficiente entre la IC₅₀ de las células complementadas y la IC₅₀ de las células deficientes en genes *FANCF* (# = error estándar < 0,01).

Las células deficientes fueron significativamente más sensibles a dosis de 30 y 100 nM de MMC que las células complementadas en las dosis de 30 y 100 nM. En cuanto a los fármacos TAICAs, no presentaron efectos diferenciales en ningún caso.

Para el modelo de AF en la **línea leucémica Kasumi-1**, se utilizó un vector lentiviral con un ARN de interferencia para el extremo 3' del ARNm del gen *FANCA* (*shFANCA*),

además del gen marcador *EGFP*, para generar una línea con bajos niveles de proteína FANCA. Se empleó como control de la transducción un vector lentiviral que portaba un ARN de interferencia inespecífico, *shscramble*. En ningún caso el proceso de transducción produjo diferencias en la supervivencia celular frente a los fármacos estudiados.

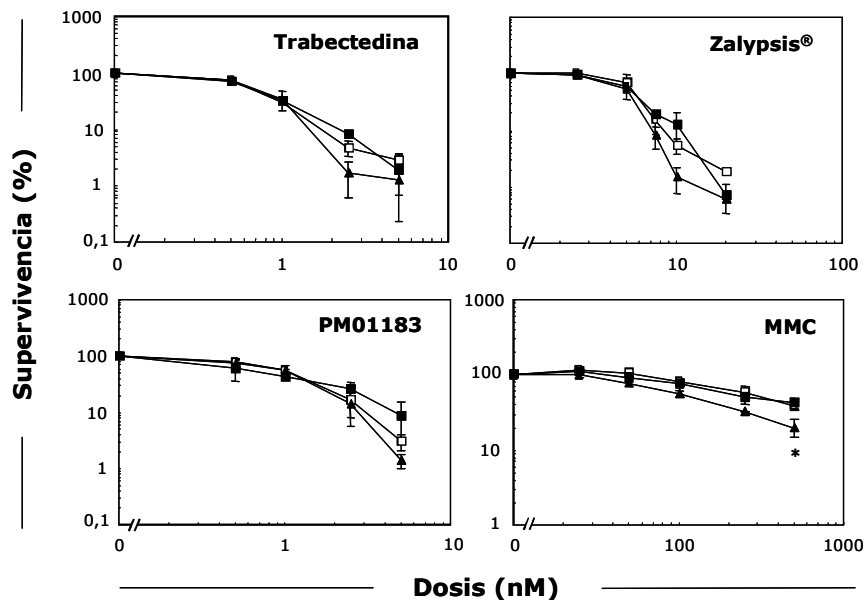


Figura 23. Curvas de supervivencia en cultivo líquido de la línea celular de LMA Kasumi-1 (■), la línea interferida con *shFANCA* (□) y la línea celular transducida con un shARN control (*shscramble*) (▲) expuestas a trabectedina, Zalypsis®, PM01183 y MMC. * $p < 0,05$.

Todas las líneas mostraron la misma sensibilidad tanto a trabectedina como a Zalypsis® y PM01183 tras 5 días de exposición a los fármacos (**figura 23**). Estos resultados se reflejaron en la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en los valores de IC (**tabla VI**). Para la MMC, la línea interferida para el gen *FANCA* mostró una sensibilidad ligeramente superior a la de las líneas control (la parental y la que portaba el ARN de interferencia inespecífico).

	Kasumi-1	Kasumi-1 + shscramble	Kasumi-1 + shFANCA
Trabectedina (nM)			
IC ₅₀	1,17 ± 0,12	1,16 ± 0,05	1,25 ± 0,05
IC ₇₀	1,84 ± 0,01	1,71 ± 0,06	1,80 ± 0,08
IC ₉₀	2,51 ± 0,10	2,27 ± 0,07	2,35 ± 0,11
Ratio IC ₅₀			0,94 ± 0,01 [#]
Zalypsis® (nM)			
IC ₅₀	6,33 ± 0,04	6,23 ± 0,69	5,76 ± 0,47
IC ₇₀	8,25 ± 0,29	7,77 ± 0,54	7,30 ± 0,34
IC ₉₀	10,17 ± 0,54	9,30 ± 0,45	8,84 ± 0,27
Ratio IC ₅₀			1,10 ± 0,01 [#]
PM01183 (nM)			
IC ₅₀	1,93 ± 0,11	2,05 ± 0,11	2,00 ± 0,22
IC ₇₀	3,52 ± 0,34	3,26 ± 0,06	3,18 ± 0,14
IC ₉₀	5,11 ± 0,58	4,48 ± 0,05	4,37 ± 0,07
Ratio IC ₅₀			0,97 ± 0,01 [#]
MMC (nM)			
IC ₅₀	433,09 ± 65,90	325,24 ± 91,44	188,81 ± 43,68*
IC ₇₀	624,00 ± 75,00	443,30 ± 117,36	332,83 ± 95,56
IC ₉₀	814,91 ± 84,09	561,35 ± 145,00	476,86 ± 154,15
Ratio IC ₅₀			2,29 ± 0,01 [#]

Tabla VI. Concentraciones de inhibición del 50, 70 y 90% de las células de LMA interferidas para el gen *FANCA* expuestas a trabectedina, Zalypsis®, PM01183 y MMC. * $p < 0,05$ respecto Kasumi-1; Ratio IC₅₀: coeficiente entre la IC₅₀ de las células control y la IC₅₀ de las células interferidas para el gen *FANCA* (# = error estándar < 0,01).

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos con líneas celulares leucémicas muestran que, en comparación con células competentes en los genes *FANCA* y *FANCF*, las células deficientes en la expresión de estos genes presentan una sensibilidad similar frente a los fármacos TAICAs, a pesar de su mayor sensibilidad a MMC.

4.3. La exposición a los fármacos TAICAs disminuye la expresión del gen *FANCD2* preferentemente en células tumorales

FANCD2 es una proteína clave dentro de la ruta de AF, ya que media entre el complejo I y el complejo III de la ruta, activándose mediante monoubiquitinización. Debido a su papel central en dicha ruta, se decidió estudiar su nivel de expresión, así como su activación, tanto en líneas tumorales como en células no transformadas. Asimismo, se analizaron los niveles de expresión de *FANCA* por ser una proteína FANC cuya función está muy bien caracterizada (Castella *et al.*, 2011).

En todos los resultados incluidos en el apartado 4.3, las células se expusieron durante 24 horas a MMC 40nM, trabectedina 10nM, PM01183 10nM y Zalypsis® 20nM, relativizándose los valores obtenidos a la condición control sin fármaco.

4.3.1. Expresión del ARNm de *FANCA* y *FANCD2*

Se analizaron los niveles del ARN mensajero (ARNm) de los genes *FANCA* y *FANCD2* en diferentes líneas celulares tumorales y no tumorales competentes en la ruta de AF. Para ello, se cuantificaron los niveles de cada ARNm mediante RT-qPCR y se relativizaron al gen constitutivo *GUS-B*, utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$.

La expresión de *FANCD2* a nivel de ARNm disminuyó de forma estadísticamente significativa tras la exposición a los fármacos TAICAs tanto en células tumorales como en la línea no tumoral (**figura 24**), a excepción de la línea de LMA Kasumi-1 donde los niveles no se vieron alterados. MMC no modificó significativamente los niveles de ARNm de *FANCD2* en ninguna de las líneas estudiadas, a excepción de la línea CHRF28811 FA-F complementada, donde aumentó significativamente.

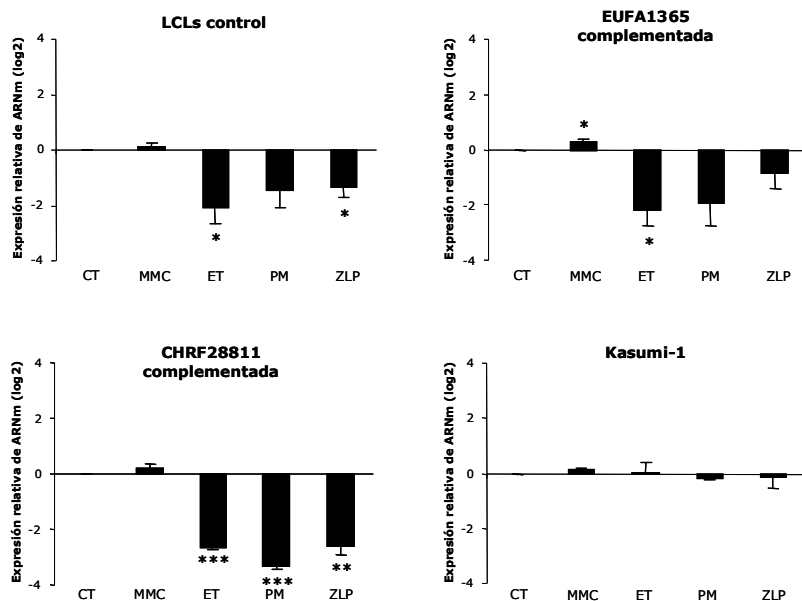


Figura 24. Efecto de la exposición a MMC, trabectedina (ET), PM01183 (PM) y Zalypsis® (ZLP) sobre la expresión de ARNm del gen *FANCD2* en diferentes líneas celulares.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;

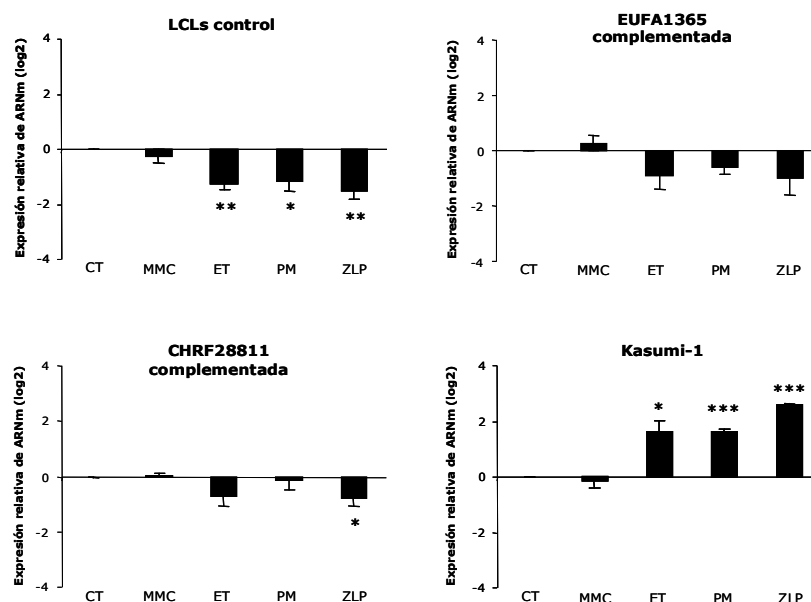
*** $p < 0,001$.

En el caso de *FANCA* (figura 25), el efecto de MMC sobre los niveles del ARNm fue similar al observado para *FANCD2*, ya que no se apreciaron variaciones estadísticamente significativas en ninguna línea celular. Sin embargo, en las LCLs todos los fármacos TAICAs produjeron una disminución significativa. Esta disminución también se produjo en las líneas tumorales EUFA1365 FA-A complementada y CHR28811 FA-F complementada aunque no resultó ser estadísticamente significativa (excepto para el PM01183 en la línea de LMA). Sorprendentemente, en la línea celular Kasumi-1 el nivel de ARNm de *FANCA* se incrementó significativamente después de la exposición a los fármacos TAICAs.

Figura 25. Efecto de la exposición a MMC, trabectedina (ET), PM01183 (PM) y Zalypsis® (ZLP) sobre el nivel de ARNm del gen *FANCA* en diferentes líneas celulares.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;

*** $p < 0,001$.



En general, puede decirse que la exposición a los fármacos TAICAs regula de forma negativa la expresión del gen *FANCD2* a nivel de ARNm en la mayoría de las líneas celulares estudiadas. Por otro lado, MMC no alteró los niveles del ARNm de este gen.

4.3.2. Expresión de la proteína FANCD2

A continuación, se estudió el efecto de los cuatro compuestos sobre la expresión de *FANCD2* a nivel de proteína, empleando como proteína de referencia la vinculina.

El efecto de la MMC sobre los niveles de proteína de FANCD2 se correlacionó con lo observado para el ARNm en todas las líneas celulares analizadas: no se apreciaron alteraciones significativas en cuanto a la cantidad de proteína total (**figura 26**). Sin embargo, los fármacos TAICAs tuvieron un efecto distinto sobre la expresión de la proteína FANCD2 dependiendo del tipo celular. Mientras que en LCLs control FANCD2 no varió tras la exposición a los fármacos TAICAs, en todas las líneas tumorales estudiadas se detectó una disminución significativa de los niveles de proteína total de FANCD2, desapareciendo drásticamente en el caso de la línea Kasumi-1.

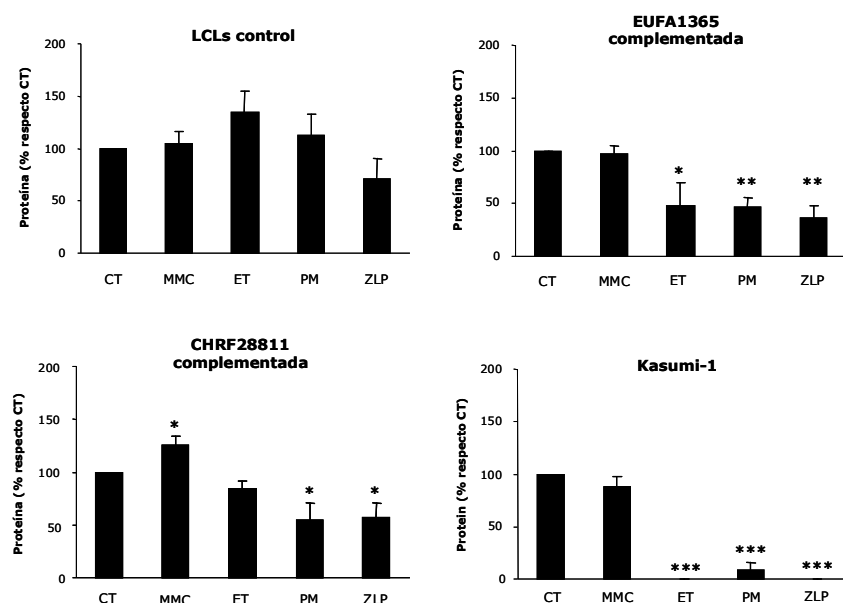


Figura 26. Efecto sobre el nivel de proteína total de **FANCD2** en distintas líneas celulares tras la exposición a MMC, trabectedina (ET), PM01183 (PM) y Zalypsis® (ZLP).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$;

*** $p < 0,001$.

Respecto a la funcionalidad de la proteína (**figura 27**), MMC indujo la activación de FANCD2 por monoubiquitinización en todas las células estudiadas, en mayor o menor medida ($U \approx 1$), detectándose la mayor activación en la línea tumoral EUFA1365 FA-A complementada. Ni trabectedina ni Zalypsis® produjeron un aumento importante de la forma monoubiquitinada (FD2-L) con respecto a la forma inactiva (FD2-S) de FANCD2 en ninguna de las líneas estudiadas. En todo caso siempre fue inferior al observado con la MMC. PM01183 únicamente consiguió activar, y de forma similar a MMC, a FANCD2 en la línea CHRF28811 FA-F complementada. En la línea Kasumi-1, no se pudo analizar el nivel de monoubiquitinización de FANCD2 debido a la ausencia prácticamente total de proteína.

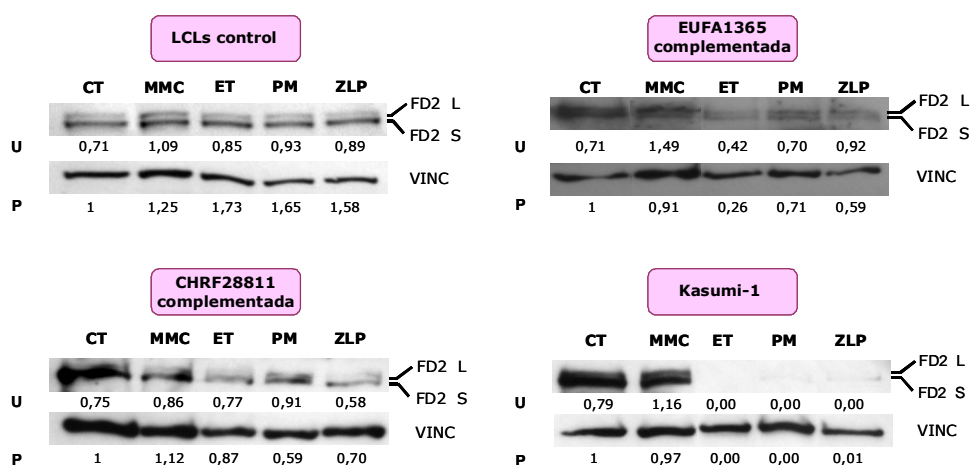


Figura 27. Imágenes de experimentos representativos en las diferentes líneas celulares estudiadas tras la exposición a MMC, trabectedina (ET), PM01183 (PM) y Zalypsis® (ZLP). U: cociente entre los niveles de FD2-L y FD2-S; P: nivel de proteína total corregido con la vinculina y relativizado al control (CT).

Los resultados de este apartado muestran que, en células tumorales, la exposición a los fármacos TAICAs induce un descenso en la proteína FANCD2 total, mientras que estos niveles no se modifican significativamente en células no transformadas. Sin embargo, la exposición a MMC no disminuye en ningún caso la expresión de esta proteína, sino que induce su activación por monoubiquitinización.

4.3.3. Formación de focos nucleares de FANCD2 tras una exposición de las células a los fármacos TAICAs y MMC

La activación de la ruta de AF por inducción de daño en el ADN (ej.: agentes entrecruzantes) provoca, entre otros efectos, la activación de FANCD2 a través de

monoubiquitinación de la lisina 561 y su traslocación a la zona dañada del ADN (focos nucleares de FANCD2 en el ADN), lo que desencadena un efecto "llamada" para el resto de proteínas de la ruta y otras encargadas de reparar la lesión.

En este apartado se recogen los resultados obtenidos del estudio de focos nucleares de FANCD2 tras la exposición de las líneas LCLs control y EUFA1365 FA-A complementada.

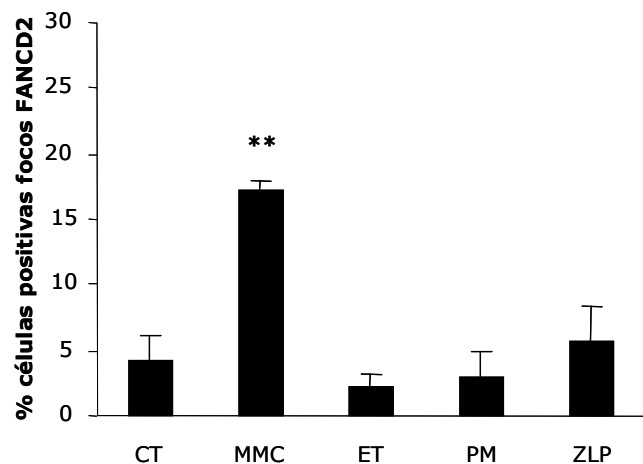
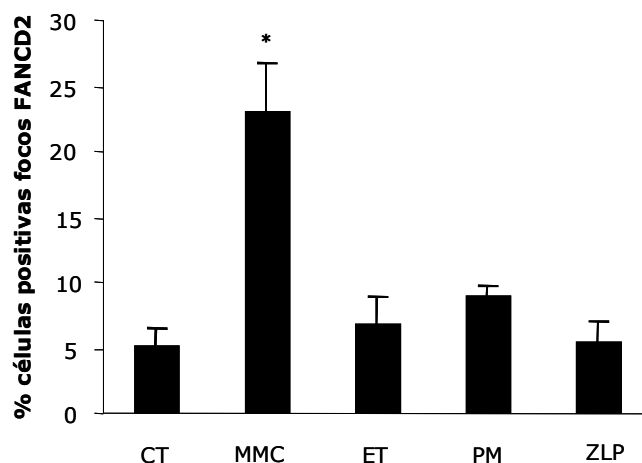


Figura 28. Análisis de la formación de focos nucleares de FANCD2 en el ADN de células no transformadas (LCLs) tras la exposición a MMC, trabectedina (ET), PM01183 (PM) y Zalypsis® (ZLP). ** $p < 0.01$.

En la **figura 28** se muestra, como era de esperar, que MMC produjo un incremento significativo en la formación de focos de FANCD2 en LCLs, mientras que el porcentaje de células positivas después de la exposición de las células a los tres fármacos TAICAs se mantuvo próximo a las células sin tratar. Del mismo modo, en las células de carcinoma escamoso EUFA1365 FA-A complementadas, tan sólo MMC produjo un aumento en los focos nucleares de FANCD2 (**figura 29**).

Figura 29. Análisis de la formación de focos nucleares de FANCD2 en el ADN de células tumorales tras la exposición a MMC, trabectedina (ET), PM01183 (PM) y Zalypsis® (ZLP). Las imágenes muestran microfotografías (40x) de experimentos representativos. * $p < 0,05$.



A diferencia de MMC, la exposición a los fármacos TAICAs no induce formación de focos nucleares de FANCD2 en ninguno de los tipos celulares estudiadas, ya sean células sanas o tumorales.

4.3.4. Actividad promotora

Los resultados obtenidos sobre la expresión del gen *FANCD2* llevaron a plantearse el estudio de la regulación transcripcional de los fármacos TAICAs a nivel de promotor. Para ello, se analizó la actividad promotora de un fragmento de 1kb del promotor del gen *FANCD2* (pGL2-FD2) facilitado por el grupo de la Dra. Susan I. Wells (Hoskins *et al.*, 2008). Según el trabajo donde se describe esta construcción, el tamaño del promotor estudiado es suficiente para activar la respuesta del mismo frente a la familia de FTs E2F/Rb. De hecho, en este fragmento se localizan tres sitios de unión a E2F, FTs capaces de activar o reprimir la expresión de diferentes genes relacionados con procesos biológicos tales como la progresión del ciclo celular, la replicación y la reparación del ADN, la diferenciación y la apoptosis (Biswas y Johnson, 2012). Alteraciones genéticas producidas en esta familia de FTs pueden contribuir a la aparición de procesos tumorales (Chen *et al.*, 2009b).

En el caso de los genes *FANC*, la familia E2F participa en la represión transcripcional de dichos genes, incluido el gen *FANCD2*, durante el bloqueo del crecimiento celular, así como de su activación ante estímulos proliferativos (Hoskins *et al.*, 2008). Otros FTs implicados en la regulación de la expresión de genes *FANC*, concretamente de los genes del complejo I de la ruta de AF, son STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), SMAD (combinación de palabras: del gen *sma* para tamaño pequeño de cuerpo de *Caenorhabditis elegans* y del gen *mad* (*mothers against decapentaplegic*) de *Drosophila melanogaster*), AP1 (*Activator Protein 1*) e YY1 (*Yin Yang 1*) (Meier y Schindler, 2011).

Tras los estudios preliminares descritos en el apartado 3.10, se transfectó la línea de cáncer de riñón 293T con 1000ng de ADN, bien del plásmido pGL2-FD2 o bien del plásmido sin promotor pGL2-Basic, y se expusieron las células durante 24 horas a MMC 40nM, trabectedina (ET) 10nM, PM01183 (PM) 10nM y Zalypsis® (ZLP) 20nM. Finalmente, se estudió la actividad promotora mediante el ensayo de luciferasa. Los valores se corrigieron con el vector sin promotor (pGL2-Basic) y se relativizaron a la condición control sin fármaco (CT).

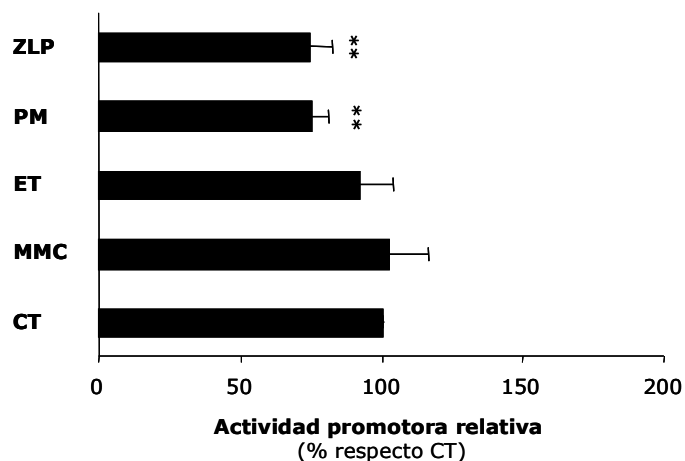


Figura 30. Efecto de los fármacos TAICAs sobre la actividad del promotor humano del gen *FANCD2* en células 293T. ** $p < 0,01$.

Como se aprecia en la **figura 30**, tan sólo PM01183 y Zalypsis® consiguieron reducir significativamente la actividad promotora del gen *FANCD2* en las células 293T. Este descenso en la actividad promotora podría explicar la represión transcripcional del gen *FANCD2* que se observa en diferentes células tumorales tras la exposición a dichos fármacos (**figuras 24, 26 y 27**). Así, existen varias posibilidades que explicarían este fenómeno, por ejemplo:

- que la interacción de los TAICAs con el ADN bloquee la unión de la ARN polimerasa II al inicio de la transcripción del gen.
- que estos fármacos se unan al promotor del gen en cuestión impidiendo la unión de FTs activadores (ej.: MGT-6a (Chiang *et al.*, 1997); nogalamicina, hedamicina y cromomicina A (Welch *et al.*, 1994); mitramicina (Snyder *et al.*, 1991)); de hecho, el grupo del Dr. Mantovani describió que la unión de trabectedina a determinadas secuencias del promotor del gen *HSP70* bloquea la interacción del FT activador NF-Y, disminuyendo la expresión de dicho gen (Minuzzo *et al.*, 2000).
- que la unión de estos fármacos al ADN esté activando la transcripción de factores represores que estén disminuyendo la expresión del gen *FANCD2*.

Tanto el agente entrecruzante clásico MMC como trabectedina, no modificaron la actividad basal del fragmento de 1kb del promotor del gen *FANCD2* estudiado.

Según los estudios de luminometría, PM01183 y Zalypsis® inducen una disminución de la actividad promotora del gen *FANCD2*.

4.4. Los fármacos TAICAs inducen apoptosis y bloquean el ciclo celular preferentemente en células tumorales

4.4.1. Apoptosis

Uno de los mecanismos que utilizan los compuestos antitumorales para ejercer su acción es la inducción de apoptosis o muerte celular programada. Está descrito que, tanto MMC como los fármacos TAICAs, inducen apoptosis en diferentes líneas tumorales (Colado *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2005; Pirnia *et al.*, 2002).

Con objeto de profundizar en el mecanismo de acción de estos fármacos en los modelos celulares estudiados, se determinó el porcentaje de células apoptóticas en la población celular no transformada (LCLs control) y tumoral (Kasumi-1) tras exposiciones a los cuatro compuestos a diferentes tiempos. Las dosis escogidas para los cuatro fármacos (las mismas que para los estudios de expresión génica) produjeron una mortalidad similar en cada línea celular (60-70% células viables).

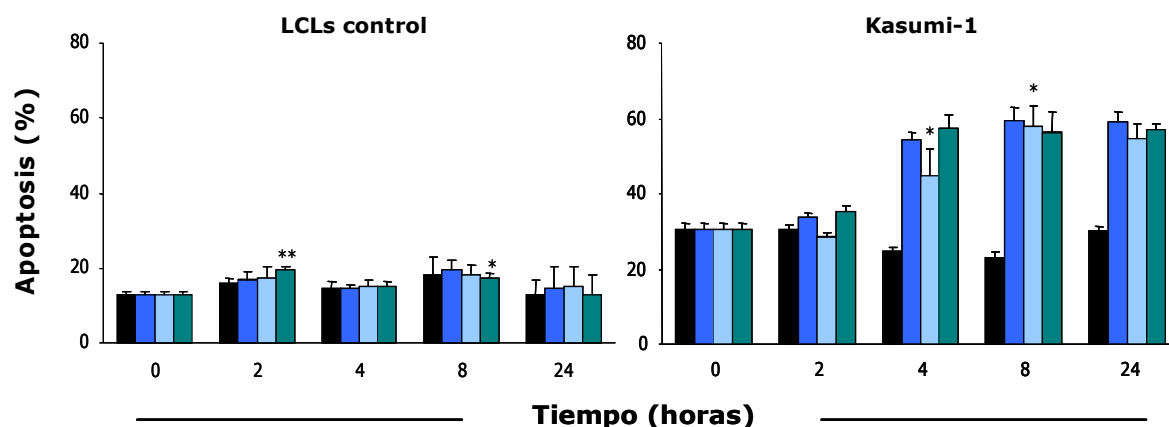


Figura 31. Análisis de la apoptosis inducida por MMC (■), trabectedina (■), PM01183 (■) y Zalypsis® (■) en células no transformadas y leucémicas durante diferentes tiempos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Cabe señalar que los niveles basales de apoptosis de las líneas estudiadas fueron diferentes: 12% en las LCLs y 30% en las células leucémicas (**figura 31**).

La dosis de MMC 40nM no alteró el porcentaje de células apoptóticas en ninguna de las dos líneas celulares. Sin embargo, los fármacos TAICAs produjeron un efecto diferente según la línea celular. Por un lado, en las LCLs (**figuras 31** y **32**) no hubo un aumento claro en la apoptosis, aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas para PM01183 a las 2 y a las 8 horas de exposición. Por otro lado, a partir de las 4 horas de incubación, se observó un incremento de aproximadamente el 100% en la fracción de

células apoptóticas en las células Kasumi-1 (**figuras 31 y 32**) que se mantuvo hasta las 24 horas, aunque únicamente se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para el PM01183 a las 4 y a las 8 horas.

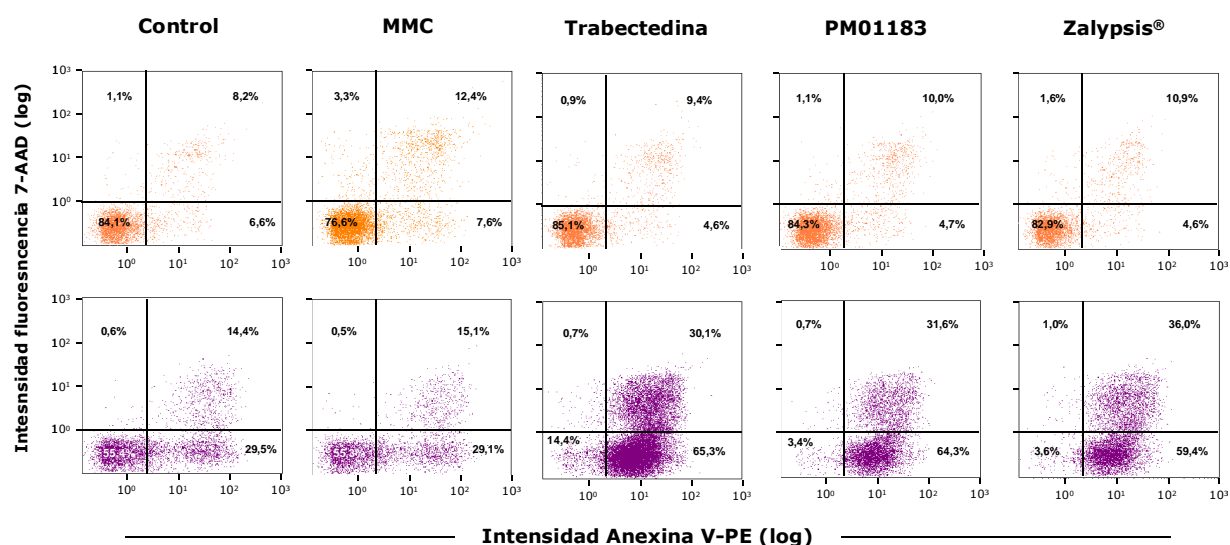


Figura 32. Imágenes de un experimento representativo de células no transformadas (naranja) y leucémicas (morado) expuestas a MMC, trabectedina, PM01183 y Zalypsis® comparadas con la condición control.

Estos resultados muestran que la exposición a dosis clínicamente relevantes de los fármacos TAICAs induce una marcada respuesta apoptótica en células leucémicas en comparación a la observada en células no transformadas.

4.4.2. Bloqueo del ciclo celular

Estudios previos realizados con los tres fármacos TAICAs, así como con MMC, muestran que todos ellos inducen parada de ciclo en determinados modelos celulares de cáncer (Leal *et al.*, 2010; Ocio *et al.*, 2009; van der Heijden *et al.*, 2004b; Li *et al.*, 2001). Por ello, se llevó a cabo el análisis del ciclo celular tanto en LCLs control como en Kasumi-1 después de 24 horas de incubación con los cuatro compuestos incluidos en este trabajo. Se utilizaron las mismas dosis de los compuestos que en los experimentos del apartado 4.4.1.

En las LCLs control (**figuras 33 y 35**), tan sólo PM01183 produjo una acumulación significativa de células en fase G_0/G_1 y una disminución en fase G_2/M . (**figura 33**). El resto de los fármacos (MMC, trabectedina y Zalypsis®) no consiguieron inducir parada de ciclo celular en las LCLs a las dosis utilizadas. En la **figura 35** (fila superior, en naranja) se muestra un ejemplo representativo de estos resultados.

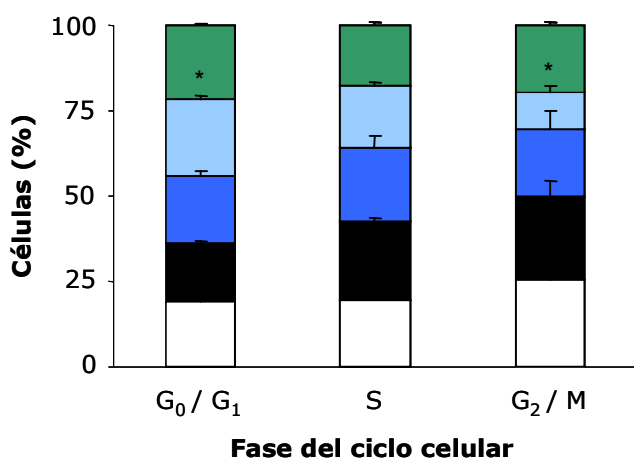
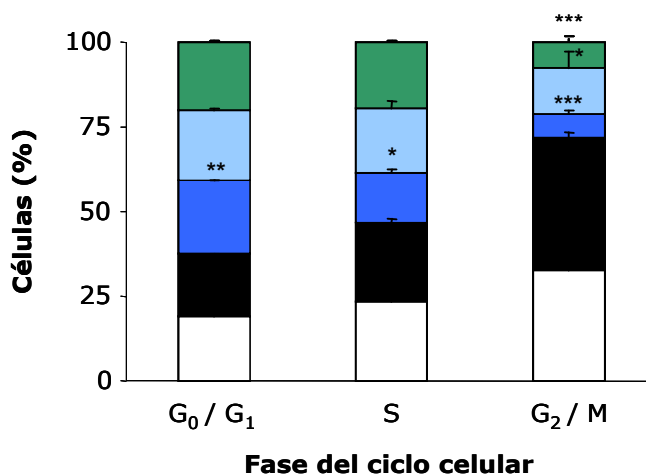


Figura 33. Efecto de la exposición a MMC (■), trabectedina (■), PM01183 (□) y Zalypsis® (■) en LCLs comparada con las células sin tratar (□) sobre todas las fases del ciclo celular. * $p < 0,05$.

Sin embargo, los fármacos TAICAs tuvieron un efecto más marcado sobre las células leucémicas: se produjo una parada de ciclo en fase G_0/G_1 , con la consecuente disminución estadísticamente significativa de células en fase G_2/M (**figura 34**). No se obtuvieron diferencias en cuanto al ciclo entre las células expuestas a MMC y la condición control. En los histogramas representativos relacionados con estos resultados de la **figura 35** (fila inferior, en morado) puede observarse cómo la fracción sub G_0/G_1 (células apoptóticas) a nivel basal es algo más elevada en la línea celular Kasumi-1 al compararla con las LCLs control. La exposición a los tres fármacos TAICAs incrementa considerablemente esta fracción en las células leucémicas, lo que concuerda con los resultados del apartado 4.4.1.

Figura 34. Efecto de la exposición a MMC (■), trabectedina (■), PM01183 (□) y Zalypsis® (■) en Kasumi-1 con las células sin tratar (□) sobre todas las fases del ciclo celular. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



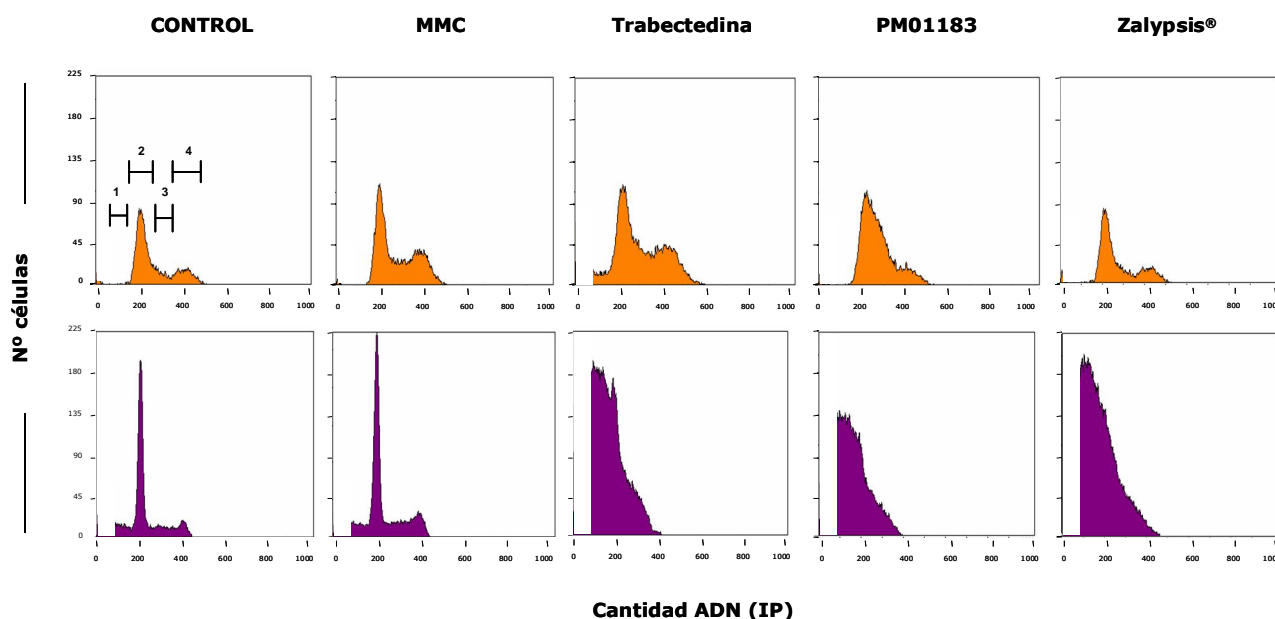


Figura 35. Imágenes de un experimento representativo del análisis del ciclo celular en **LCLs** control (naranja) y en **Kasumi-1** (morado) tras la exposición a los diferentes fármacos. En el primer gráfico (superior izquierda) se ejemplifican las fases del ciclo celular: 1 = SubG₀/G₁, 2 = G₀/G₁, 3 = S, 4 = G₂/M; el pico a 200 del eje de abscisas corresponde a las células 2n, mientras que el pico a 400, a las células 4n.

Dosis clínicamente relevantes de los fármacos TAICAs provocan un bloqueo del ciclo celular en células tumorales, produciéndose una acumulación de células en fase G₀/G₁, mientras que, en células no transformadas, el ciclo celular no se vé alterado por estos fármacos.

4.5. Adición/Sinergia de los fármacos TAICAs en combinación con agentes entrecruzantes del ADN

Las líneas de desarrollo de los compuestos antitumorales habitualmente incluyen, no sólo su aplicación como tratamiento único, sino también en combinación con otros compuestos. Con esta estrategia, muy común en los tratamientos de quimioterapia, se consigue aumentar la presión tóxica sobre el tumor desde diferentes ángulos, según sean los mecanismos de acción de los compuestos que se combinen.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la naturaleza de los compuestos utilizados, se decidió abordar también estudios para determinar la implicación de la ruta de AF en el tipo de efecto (antagónico, sinérgico o de adición) producido por los fármacos TAICAs en combinación con agentes entrecruzantes del ADN.

4.5.1. Estudios preliminares

Un prerrequisito para la determinación de sinergismo o antagonismo es el conocimiento tanto de la potencia como de la forma de la curva de supervivencia para cada uno de los compuestos a estudiar (Chou, 2006). En este apartado se describen los resultados obtenidos a este respecto con las líneas incluidas en este estudio.

La **línea celular de cáncer de ovario IGROV1** se utiliza ampliamente para estudios de toxicidad y efectividad de fármacos antitumorales (Richards *et al.*, 2012; Banzato *et al.*, 2008; Goldwasser *et al.*, 1999), por lo que fue incluida como parte de este estudio. Se analizó su sensibilidad a los fármacos TAICAs y a dos agentes entrecruzantes, MMC y cisplatino, mediante ensayos clonogénicos. El cisplatino se utiliza de rutina en la quimioterapia de pacientes con cáncer de ovario, por lo que se utilizó como control para comparar su efecto con el de los fármacos TAICAs.

La **figura 36** muestra las curvas de supervivencia de esta línea tumoral tras 24 horas de incubación con dosis crecientes de los distintos fármacos por separado. Todos los fármacos TAICAs fueron más efectivos que los dos agentes entrecruzantes, siendo el cisplatino el compuesto para el cual se debieron utilizar las dosis más elevadas. Trabectedina y PM01183 fueron los fármacos que mostraron efecto a dosis más bajas, encontrándose ambos en el mismo rango. Sin embargo fue necesario aumentar un logaritmo las dosis de Zalypsis® para ver efecto.

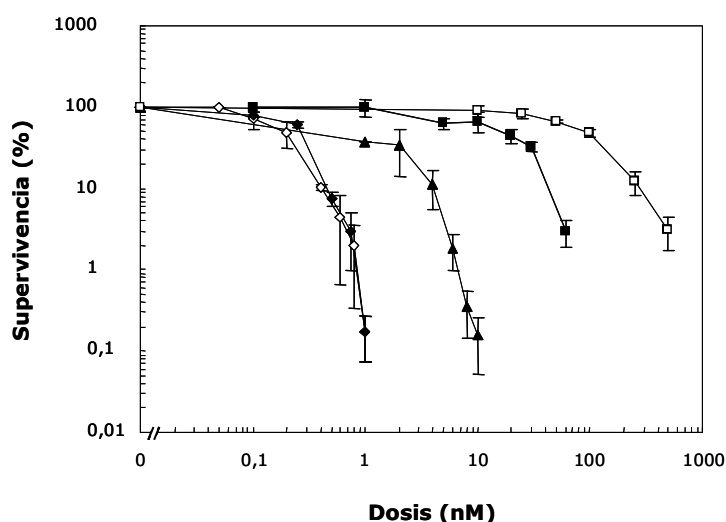


Figura 36. Curvas de supervivencia de la línea **IGROV1** expuesta a trabectedina (◇), Zalypsis® (▲), PM01183 (◆), MMC (■) y cisplatino (□).

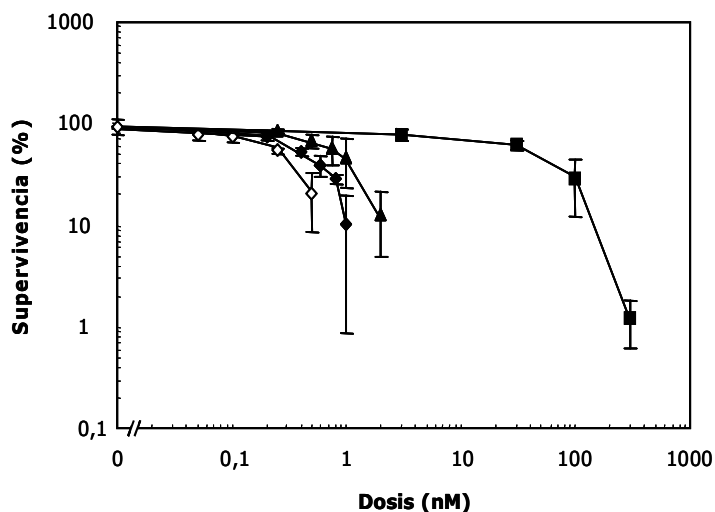
Se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas para todos los valores de IC de los fármacos TAICAs comparados con los obtenidos para MMC, así como para cisplatino. De la misma forma, los valores de IC para MMC fueron significativamente menores que los de cisplatino (**tabla VII**).

(nM)	Trabectedina	Zalypsis®	PM01183	Cisplatino	MMC
IC ₅₀	0,22 ± 0,07*/	3,59 ± 1,64**/	0,34 ± 0,05**/	176,23 ± 34,09	19,43 ± 7,49*
IC ₇₀	0,40 ± 0,08**/**	6,58 ± 2,42**/**	0,49 ± 0,08**/**	281,59 ± 56,29	35,20 ± 4,04*
IC ₉₀	0,57 ± 0,11**/**	6,95 ± 3,09**/**	0,63 ± 0,10**/**	386,95 ± 80,74	50,98 ± 1,23*

Tabla VII. Concentraciones de inhibición del 50, 70 y 90% de la línea celular de cáncer de ovario **IGROV1** expuesta a trabectedina, Zalypsis®, PM01183, MMC y cisplatino. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 respecto MMC primero y cisplatino después; * de MMC respecto cisplatino, p<0,05.

Durante la realización de este trabajo, se publicó un estudio sobre el efecto de la combinación de PM01183 con un agente entrecruzante *in vivo* en xenotransplantes (Vidal *et al.*, 2012). Con la intención de analizar esta interacción *in vitro*, se realizaron ensayos clonogénicos con la línea de **cáncer de vejiga UM-UC-3** exponiéndola a los fármacos TAICAs y a MMC, siendo este último un fármaco que resulta beneficioso en pacientes con este tipo de cáncer (Sylvester *et al.*, 2004). Se observó que las células fueron más sensibles a los fármacos TAICAs que a la MMC (**figura 37**). De los tres fármacos TAICAs, trabectedina mostró el mayor efecto y Zalypsis® el menor.

Figura 37. Curvas de supervivencia de la línea **UM-UC-3** expuesta a trabectedina (\diamond), Zalypsis[®] (\blacktriangle), PM01183 (\blacklozenge) y MMC (\blacksquare).



La **tabla VIII** muestra las concentraciones inhibitorias del 50, 70 y 90% de los compuestos estudiados. Se observaron diferencias estadísticamente significativas para todos los fármacos TAICAs respecto a MMC.

(nM)	Trabectedina	Zalypsis[®]	PM01183	MMC
IC ₅₀	0,287 ± 0,02*	1,06 ± 0,28*	0,53 ± 0,02*	131,52 ± 35,22
IC ₇₀	0,54 ± 0,16**	1,46 ± 0,40**	0,79 ± 0,06**	205,55 ± 27,86
IC ₉₀	0,79 ± 0,29***	1,86 ± 0,51***	1,04 ± 0,10***	279,59 ± 21,33

Tabla VIII. Concentraciones de inhibición del 50, 70 y 90% de la línea **UM-UC-3** expuesta a trabectedina, Zalypsis[®], PM01183 y MMC. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; respecto MMC.

4.5.2. Estudios de combinaciones de fármacos

La interacción entre dos fármacos puede ser diferente dependiendo de las dosis que se utilicen y el efecto que se estudie. En este caso, al estar trabajando con fármacos antitumorales, los efectos de las combinaciones a dosis elevadas podrían resultar terapéuticamente más relevantes que a dosis más bajas (Erickson-Miller *et al.*, 1997; Ghilmini *et al.*, 1997). Asimismo, es fundamental tener en cuenta que las dosis utilizadas sean consistentes con las concentraciones que puedan ser alcanzadas en el cuerpo humano.

Teniendo todo esto en cuenta y a la vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se llevaron a cabo aproximaciones para estudiar el efecto de la combinación de los fármacos TAICAs con los agentes entrecruzantes. Se eligió una exposición simultánea a dos fármacos utilizando una dosis fija de los fármacos TAICAs y dosis crecientes de los compuestos entrecruzantes. Las dosis fijas de los fármacos TAICAs produjeron inhibiciones del crecimiento entre el 70 y el 90%.

En relación con las células de **cáncer de ovario IGROV1**, sus curvas de supervivencia, recogidas en la **figura 38**, muestran un mayor efecto de las combinaciones de los fármacos TAICAs tanto con MMC como con cisplatino en comparación con los agentes entrecruzantes por separado.

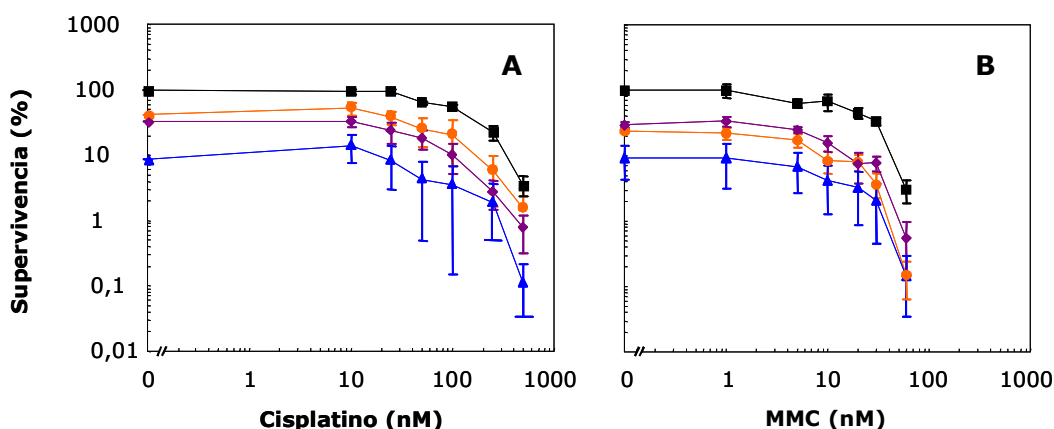


Figura 38. Supervivencia de células de cáncer de ovario **IGROV1** expuestas a trabectedina 0,2nM (●), PM01183 0,4nM (◆) o Zalypsis® 4nM (▲) en combinación con dosis crecientes de cisplatino (A) o MMC (B) comparado con los agentes entrecruzantes del ADN por separado. ■

Los datos obtenidos de los análisis de combinación mediante el cálculo del coeficiente de interacción (CI) con el algoritmo de Chou-Talalay se muestran en la **tabla IX**, además de los valores de IC obtenidos en las combinaciones. Tanto para las combinaciones de cisplatino con los fármacos TAICAs como las de MMC, el CI indicó una relación de adición.

En cuanto a los valores de IC, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las combinaciones de Zalypsis® o PM01183 con cisplatino respecto a la incubación de cisplatino como único fármaco, mientras que las combinaciones de trabectedina o Zalypsis® con MMC fueron significativamente más efectivas que la MMC por separado.

(nM)	Trabectedina 0,2nM	Zalypsis® 4nM	PM01183 0,4nM	----	
+ Cis-Pt	IC ₅₀	62,81 ± 24,32	9,09 ± 1,38**	37,73 ± 16,60*	176,23 ± 34,09
	IC ₇₀	111,52 ± 42,01	17,22 ± 4,06**	76,10 ± 33,69*	281,59 ± 56,29
	IC ₉₀	160,23 ± 59,93	25,35 ± 6,75	114,48 ± 50,79*	386,95 ± 80,74
	CI	1,17	1,04	1,05	
+ MMC	IC ₅₀	5,63 ± 1,50	3,93 ± 1,38	10,21 ± 0,50	19,43 ± 7,49
	IC ₇₀	13,00 ± 1,92**	9,57 ± 3,58*	22,73 ± 3,49	35,20 ± 4,04
	IC ₉₀	20,51 ± 2,30***	15,22 ± 5,81**	35,23 ± 6,48	50,98 ± 1,23
	CI	1,06	1,06	1,02	

Tabla IX. Concentraciones de inhibición del 50, 70 y 90% de la línea **IGROV1** expuesta a trabectedina, Zalypsis® o PM01183 y dosis crecientes de cisplatino y MMC. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; respecto cisplatino o MMC como agente único. **CI** = coeficiente de interacción. En gris se remarcan los valores de IC para cisplatino y MMC por separado.

También se estudiaron los efectos de las combinaciones mediante análisis con isoblogramas (**figura 39**). Estos resultados corroboraron los resultados obtenidos por el cálculo del CI para PM01183 y Zalypsis® expuestos simultáneamente con cisplatino o MMC: una relación de adición. Sin embargo, se observó un efecto sinérgico para la combinación de trabectedina, tanto con cisplatino como con MMC, al localizarse el punto de los datos de la combinación por debajo de la isobola.

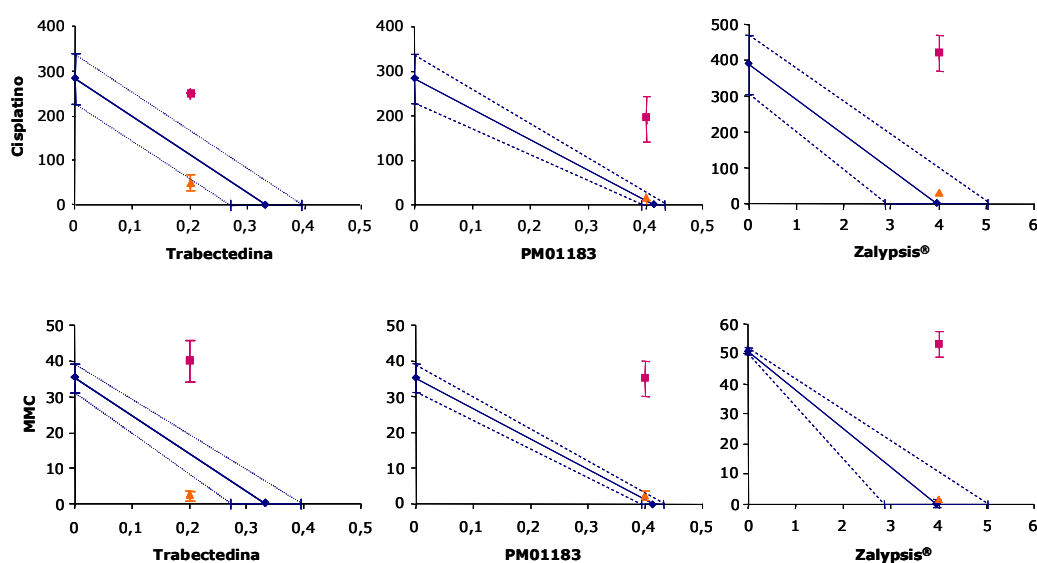
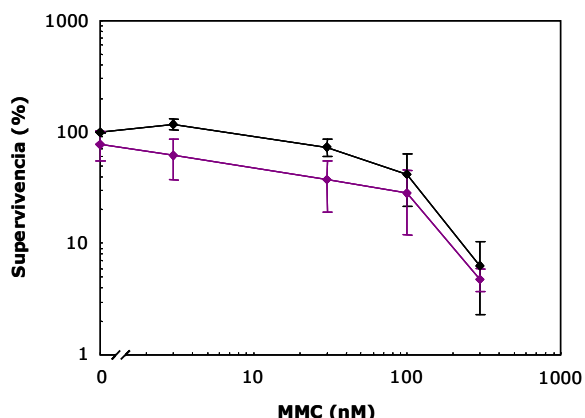


Figura 39. Isoblogramas de las combinaciones de los tres fármacos TAICAs con cisplatino y con MMC en la línea de cáncer de ovario **IGROV1** (morado: dosis únicas; naranja: dosis en combinación).

Las curvas de supervivencia de los estudios de combinación obtenidas con la línea de cáncer de vejiga **UM-UC-3** se recogen en la **figura 40**.

Figura 40. Supervivencias de la línea de cáncer de vejiga **UM-UC-3** expuesta a PM01183 0,4nM (♦) en combinación con dosis crecientes de MMC o únicamente con MMC (◆).



Los valores de IC para la MMC en combinación con PM01183 0,4nM fueron: $IC_{50} = 12,76nM$; $IC_{70} = 56,61nM$ y $IC_{90} = 133,48nM$. Si comparamos estos valores con los obtenidos en las curvas de supervivencia de células expuestas sólo a MMC, recogidos en la tabla IX, se puede observar que son significativamente menores. El cálculo del valor de CI fue 0,63, lo que mostró que la acción simultánea de ambos fármacos sería sinérgica. El isoblograma mostró un efecto aditivo pero es de destacar que estadísticamente estaría al límite de ser sinérgico, tal y como se ve en la **figura 41**.

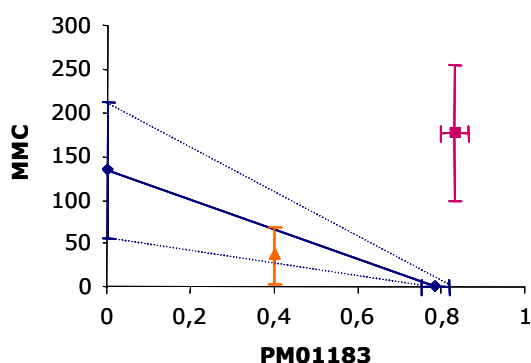


Figura 41. Isoblograma de la combinación de PM01183 y MMC en la línea de cáncer de vejiga **UM-UC-3**. (morado: dosis únicas; naranja: dosis en combinación).

Los estudios de exposición celular combinada de los fármacos TAICAs y agentes entrecruzantes del ADN muestran una interacción principalmente de tipo aditiva, tendiendo a la sinergia en algunos casos. Nunca se detectaron efectos antagónicos.

4.5.3. Efecto de la combinación de Zalypsis® y MMC en líneas de carcinoma escamoso

Al observar un efecto beneficioso en la combinación de los fármacos TAICAs con agentes entrecruzantes del ADN en los modelos anteriormente descritos, se estudió esta combinación en la línea de **carcinoma escamoso EUFA1365 FA-A complementada** para determinar el efectos de la combinación de estos fármacos.

En la **figura 42** se recogen las curvas de supervivencia obtenidas con las células de carcinoma escamoso EUFA1365 FA-A y la complementada tras exponerlas a Zalypsis® 20nM y dosis crecientes de MMC. La elección de la dosis de Zalypsis® utilizada en los estudios de combinación de fármacos se hizo basándose en los estudios de expresión de los genes *FANC* expuestos en el apartado 4.3.

La combinación de Zalypsis® y MMC produjo un descenso drástico en la sensibilidad de la línea complementada con respecto la exposición únicamente a MMC, llegando a niveles de supervivencia similares a los de la línea deficiente en el gen *FANCA* a dosis de 30 y 100nM de MMC.

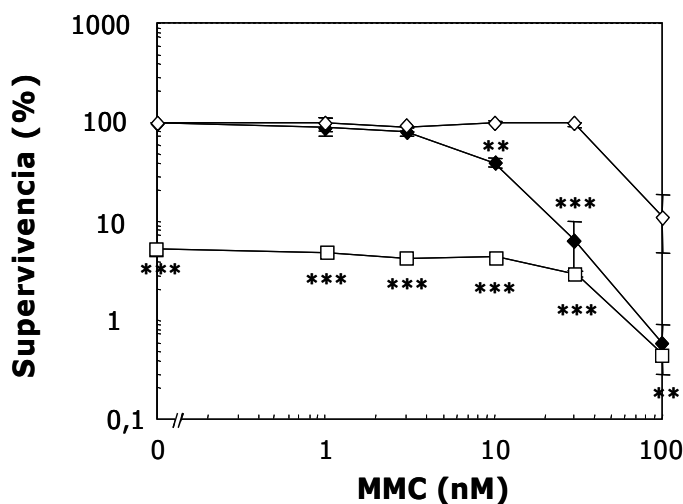


Figura 42. Supervivencia de células de carcinoma escamoso **EUFA1365 FA-A** (negro) y la complementada (blanco) tras la exposición a dosis crecientes de MMC (◇,♦) o a Zalypsis® y MMC (□).

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En relación con los niveles de proteína de FANCD2, la combinación de los dos fármacos produjo una disminución de su expresión, comparada con la observada tras la exposición de los compuestos por separado, aunque esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa (**figura 43A**). Asimismo, la formación de focos nucleares de FANCD2 en el ADN inducida por la MMC fue inhibida por la combinación con Zalypsis® (**figura 43B**).

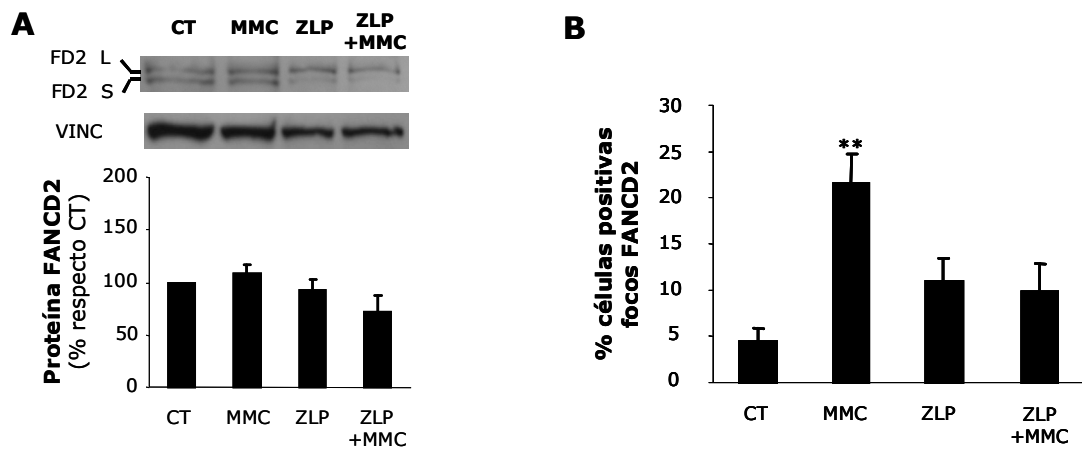


Figura 43. Efecto de la combinación de Zalypsis® 20nM (ZLP) y mitomicina C 40nM (MMC) sobre la proteína FANCD2 en la línea de carcinoma escamoso **EUFA1365 FA-A complementada** (A) y sobre la formación de focos nucleares de FANCD2 en el ADN (B). **p<0,01.

Tomando en conjunto los resultados de este apartado, puede decirse que Zalypsis® inhibe la ruta de AF en las células tumorales ensayadas, lo que se traduce en una mayor mortalidad cuando se combina con MMC.

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

En estudios previos, se ha descrito que la unión covalente a una de las cadenas del ADN y la unión por puentes de hidrógeno a la otra cadena de cualquiera de los tres TAICAs analizados en este trabajo (trabectedina, Zalypsis[®] y PM01183) da lugar a:

- Estabilización de la doble hélice del ADN, tal como se muestra en experimentos de desnaturalización de oligonucleótidos de ADN (Leal *et al.*, 2010; Leal *et al.*, 2009; Casado *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2007).
- Generación de roturas de doble cadena *in vivo* (Leal *et al.*, 2010; Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009; Leal *et al.*, 2009; Casado *et al.*, 2008; Soares *et al.*, 2007).
- Bloqueo del inicio de la transcripción y la elongación de determinados genes (Feuerhahn *et al.*, 2011).
- Inducción de apoptosis y bloqueo del ciclo celular (Colado *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2010; Ocio *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2001).

Algunos de estos resultados sugirieron que el efecto de estos fármacos TAICAs sobre el ADN debía ser similar al de los agentes entrecruzantes del ADN como la MMC (Bueren-Calabuig *et al.*, 2011; Feuerhahn *et al.*, 2011; Casado *et al.*, 2008; Gago y Hurley, 2002). Como consecuencia, se hipotetizó que las células con una ruta de AF, implicada en la reparación de ICLs en el ADN (Nakanishi *et al.*, 2011), defectuosa deberían ser más sensibles a los TAICAs respecto a células homólogas con una ruta de AF funcional. Así, estudios previos han mostrado que fibroblastos humanos no transformados con mutaciones bialélicas en alguno de los genes *FANC* eran hipersensibles a trabectedina (Casado *et al.*, 2008). De este modo, cabría esperar que células tumorales con alteraciones en esta ruta fueran hipersensibles a los TAICAs, tal como sucede con agentes entrecruzantes como cisplatino, MMC o melfalán (Palagyi *et al.*, 2010; Hess *et al.*, 2008; Koul *et al.*, 2004; Taniguchi *et al.*, 2003).

Por todo lo anteriormente comentado, el objetivo del presente trabajo ha sido el estudio de la implicación de la ruta de AF en la respuesta de células no transformadas y transformadas a fármacos de la familia TAICA tales como trabectedina, Zalypsis[®] y PM01183, teniendo como referencia la respuesta celular a los agentes entrecruzantes del ADN, como MMC o cisplatino.

5.1. La inactivación de la ruta de AF sensibiliza a progenitores hematopoyéticos primarios y líneas linfoblásticas frente a los fármacos TAICAs, mientras que esta sensibilización no ocurre con células tumorales, en particular de carcinoma escamoso y leucemia mieloide aguda

Los resultados obtenidos con células no transformadas con mutaciones en alguno de los genes *FANC* mostraron una mayor sensibilidad a los fármacos TAICAs al compararla con células competentes en la ruta de AF (ver **figuras 18 y 19**). Sin embargo, en el caso de las células tumorales estudiadas (ver **figuras 20, 22 y 23**), estos fármacos no produjeron una respuesta diferencial entre las células deficientes en diferentes genes *FANC* y las competentes en la ruta de AF. Por otro lado, todas las líneas celulares estudiadas deficientes en dicha ruta fueron más sensibles al agente entrecruzante clásico MMC respecto a las líneas con una ruta de AF funcional.

Los resultados obtenidos con MMC son coincidentes con la hipersensibilidad de las células que presentan mutaciones bialélicas en alguno de los 15 genes *FANC* frente a agentes inductores de ICLs, siendo ésta una de las características utilizadas para el diagnóstico genético de la enfermedad de Anemia de Fanconi (Valeri *et al.*, 2011; D'Andrea, 2010; Moldovan y D'Andrea, 2009; Niedernhofer *et al.*, 2005). Asimismo, se ha descrito una mayor sensibilidad a MMC en diversas líneas tumorales donde la ruta de AF está alterada (Palagyi *et al.*, 2010; Hess *et al.*, 2008; van der Heijden *et al.*, 2004a). No obstante, la disparidad observada en la respuesta a los TAICAs en las células no transformadas y transformadas en virtud de su integridad en la ruta de AF ha sido inesperada.

En lo que se refiere a **células no transformadas** (CFU-GMs de ratón y LCLs humanas), las diferencias en sensibilidad a los TAICAs entre las células deficientes en genes *FANC* y sus respectivos controles fueron estadísticamente significativas en la mayor parte de los casos. Estos resultados concuerdan, al menos en el caso de trabectedina, con los obtenidos con diferentes líneas de fibroblastos y otras LCLs de pacientes de AF (Casado *et al.*, 2008). Utilizando dosis parecidas de PM01183 y trabectedina se obtuvieron efectos similares, lo que no es de extrañar si se tiene en cuenta que PM01183 es un compuesto sintético derivado de trabectedina y con una relación estructural muy estrecha. Sin embargo, para conseguir los mismos niveles de mortalidad celular con Zalypsis[®], fue necesario duplicar todas las dosis respecto a trabectedina, ya que, a pesar de que los tres

compuestos son tetrahidroisoquinolinas, su diferente estructura química puede conferir propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas distintas. Esta particularidad se mantuvo en los dos modelos de AF utilizados, murino y humano. El diferente sistema experimental utilizado, así como las diferentes características de los modelos celulares (tipo de ensayo, tiempo de exposición, grado de diferenciación, etc.) justificarían que haya sido necesario incrementar las dosis de todos los TAICAs en las LCLs respecto a los progenitores de ratón (Niles *et al.*, 2008; Chou, 2006; Hassan *et al.*, 2001; Ekwall *et al.*, 1990).

Ratio IC ₅₀ (nM)	Células no transformadas				Células tumorales			
	MO <i>Fanca</i> ^{-/-}	MO <i>Brca2</i> ^{Δ27/Δ27}	LCL FA-A	LCL FA-J	EUFA1365 FA-A	EUFA1131 FA-C	CHRF28811 FA-F	KASUMI-1 shFANCA
ET	1,94±0,01 [#]	7,75±0,05	2,84±0,01	2,39±0,01 [#]	1,33±0,01	1,21±0,01 [#]	1,73±0,01	0,93±0,01 [#]
ZLP	1,32±0,01 [#]	7,34±0,02	2,62±0,02	6,36±0,05	0,83±0,01 [#]	1,13±0,01 [#]	1,01±0,01 [#]	1,08±0,01 [#]
PM	1,65±0,01	12,5±0,04	3,28±0,01	3,11±0,02	1,06±0,01	1,70±0,01	1,07±0,01	1,03±0,01 [#]
MMC	6,83 §	9,80 §	4,91±0,02	2,41±0,01	4,97±0,01	8,45±0,05	5,92±0,04	1,72±0,01

Tabla X. Ratios IC₅₀ entre las células con una ruta de AF funcional y con alguna alteración después de la exposición *in vitro* a diferentes concentraciones de trabectedin, Zalypsis®, PM01183 y MMC. (# = error estándar < 0,01; § = valores obtenidos a partir de gráficos en Navarro *et al.*, 2006 y Rio *et al.*, 2002).

Cabe señalar que no todas las células con mutaciones en diferentes genes *FANCA* presentaron la misma sensibilidad a los fármacos. Así, los progenitores hemapoyéticos de MO de ratones **FA-D1** (con mutaciones en el gen *Brca2*; complejo III de la ruta de AF), fueron mucho más sensibles a los TAICAs que los progenitores de ratones **FA-A**, con mutaciones en el gen *Fanca* (complejo I de la ruta de AF). La conexión de la proteína BRCA2/FANCD1 con otras rutas de señalización dentro de la célula, por ejemplo de reparación del ADN, podría explicar la elevada sensibilidad de las células deficientes en el gen *Brca2* a los TAICAs, del mismo modo que se ha descrito para otros fármacos (Treszezamsky *et al.*, 2007; Rahden-Staron *et al.*, 2003; Tutt *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 1997). A pesar de todas estas consideraciones, las dosis empleadas para los tres fármacos estuvieron dentro del rango nanomolar.

Como se ha comentado anteriormente, los diferentes **modelos tumorales humanos** estudiados mostraron una respuesta a MMC dependiente de la ruta de AF, pero no así a los TAICAs (**figuras 20, 22 y 23**). En las líneas de carcinoma escamoso, este comportamiento es particularmente evidente (ver **apartado 4.2.1**), bien por el tipo de línea celular o bien

debido al tipo de ensayo utilizado (Winters *et al.*, 1974). En los últimos años, el amplio conocimiento generado sobre el perfil genético de los tumores ha permitido organizar consorcios internacionales constituidos por múltiples centros y redes de ensayos multiinstitucionales para aumentar este conocimiento y también para intentar estudiar la respuesta a la quimioterapia con fármacos convencionales, así como con fármacos de nueva generación, según la firma genética y el tipo de tumor⁴. De hecho, existen algunas mutaciones somáticas en ciertos genes, muchos relacionados con la reparación del daño en el ADN, en diversos tumores humanos que están asociadas a una mayor sensibilidad a un determinado agente quimioterapéutico, lo que ha supuesto un avance muy importante en el éxito del tratamiento de pacientes con cáncer (Dancey *et al.*, 2012; Stratton, 2011). Un ejemplo sería el vemurafenib para pacientes con melanoma metastático que presenten la mutación V600E en el gen *BRAF* (Stuart y Sellers, 2009).

En el caso de los genes *FANC*, se han detectado mutaciones en aproximadamente el 10% de los tumores sólidos y hematológicos (Valeri *et al.*, 2011), existiendo estudios preclínicos que demuestran que células tumorales deficientes en alguno de los 15 genes de la ruta de AF son más sensibles a ciertos fármacos, concretamente agentes entrecruzantes del ADN, respecto a las células competentes en esta ruta (Palagyi *et al.*, 2010; Hess *et al.*, 2008; Koul *et al.*, 2004; Taniguchi *et al.*, 2003). De hecho, se han llevado a cabo ensayos clínicos en los que se ha analizado la efectividad de agentes entrecruzantes del ADN, como las antraciclinas (Chappuis *et al.*, 2002), en pacientes con cáncer que presentan mutaciones en genes *FANC*. Sin embargo, los TAICAs no han tenido este efecto (ver **apartado 4.2**). Por un lado, sí que se ha descrito una sensibilidad variable de células tumorales de pacientes con AF en función del gen *FANC* que tengan afectado, poniendo de manifiesto el diferente grado de implicación de los múltiples componentes de la ruta de AF en la respuesta a fármacos (Kachnic *et al.*, 2010). Es más, en el trabajo del grupo del Dr. Van Waes (Snyder *et al.*, 2007) se describe como alteraciones en la expresión o la inactivación de la ruta de AF no siempre están asociadas a una variabilidad en la sensibilidad al agente entrecruzante cisplatino en un panel de 10 líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

5.2. La respuesta diferencial de las células tumorales a los fármacos TAICAs se corresponde con una inhibición de la ruta de AF

5.2.1. Los fármacos TAICAs y su efecto sobre FANCD2

El análisis de la expresión del gen *FANCD2*, un componente clave dentro de la ruta de AF, después de la exposición a los cuatro fármacos estudiados de células competentes en dicha ruta reveló un efecto diferencial dependiendo de la línea celular y del fármaco (TAICAs o MMC) ensayado. En la **tabla XI**, se muestra un resumen de los resultados recogidos en los apartados 4.3.1, y 4.3.2. Asimismo, y teniendo en cuenta que la inducción de focos nucleares de γ -H2AX y RAD51 en el ADN por parte de los fármacos TAICAs se había descrito previamente (Colado *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2010; Guirouilh-Barbat *et al.*, 2009; Casado *et al.*, 2008), se procedió a analizar la activación de la ruta de AF a través de la detección de focos nucleares de FANCD2 en el ADN.

En células no transformadas (LCLs control), ninguno de los cuatro fármacos alteró significativamente la cantidad de proteína total de FANCD2, aunque la exposición a los TAICAs sí disminuyó el nivel de ARNm de este gen. Esto puede explicarse por mecanismos de traducción o post-traduccionales implicados en regular los niveles de la proteína FANCD2 en esta línea celular (Vadnais *et al.*, 2012). Por otro lado, tan sólo MMC fue capaz de inducir activación de FANCD2, detectada tanto por WB (aumento en la banda monoubiquitinada, FANCD2-L) (**figura 27**) como por un incremento en la formación de focos nucleares en el ADN (**figura 28**), en consistencia con estudios publicados previamente (Gonzalez-Murillo *et al.*, 2010; Kalb *et al.*, 2007).

	ARNm ($\log_2^{\Delta\Delta Ct}$)				Proteína (% respecto CT)			
	LCL CT	EUFA1365 +FANCA	CHRF28811 +FANCF	Kasumi-1	LCL CT	EUFA1365 +FANCA	CHRF28811 +FANCF	Kasumi-1
ET	0,27±0,08*	0,25±0,08*	0,16±0,01***	1,09±0,27	133,72±21,61	47,67±22,02*	85,01±7,04**	0,00±0,00***
ZLP	0,41±0,09*	0,64±0,24	0,17±0,04**	1,00±0,25	71,20±19,51	36,38±11,19**	57,53±13,37	0,00±0,00***
PM	0,43±0,14	0,38±0,23	0,10±0,01***	0,90±0,04	112,30±20,25	46,58±9,13**	55,20±15,11*	7,80±7,80***
MMC	1,08±0,15	1,24±0,08*	1,16±0,13	1,08±0,05	104,99±11,56	96,62±7,40	125,59±8,32*	87,82±9,60

Tabla XI. Efecto de la exposición a trabectedina (ET), Zalypsis® (ZLP), PM01183 (PM) y MMC sobre la expresión del gen *FANCD2* en diferentes líneas celulares. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, respecto control correspondiente.

En lo que concierne a las células tumorales, el efecto de los fármacos TAICAs y MMC no es el mismo: mientras que MMC no afectó el nivel de ARNm ni de proteína de *FANCD2* de forma marcada, en las diferentes líneas tumorales que se expusieron a los fármacos TAICAs se observó una disminución en la expresión de *FANCD2*. Esto indica que la disminución de la proteína *FANCD2* no es específica de un único modelo tumoral. Al analizar más en detalle estos resultados, se observó que este descenso es más drástico a nivel de ARNm que a nivel de proteína, a excepción de la línea de LMA Kasumi-1, donde el ARNm no varió después de la exposición a los fármacos TAICAs, si bien los niveles de proteína fueron prácticamente indetectables. Este hecho podría explicarse por la implicación de mecanismos postranscripcionales o de maduración de la proteína en la regulación de la expresión de *FANCD2* en esta línea celular (Imai *et al.*, 2005; Sugimoto *et al.*, 2005).

Por otro lado, ninguno de los TAICAs ensayados fue capaz de activar la ruta de AF tal y como demuestra la ausencia de un incremento en la formación de focos de *FANCD2* en el ADN (**figura 29**) o los resultados de WB (**figura 27**) en células competentes en la ruta de AF. A diferencia de los TAICAs, MMC resultó ser un potente activador de *FANCD2* en todos los tipos celulares estudiados.

En nuestro trabajo, los resultados obtenidos en los estudios de formación de focos nucleares de *FANCD2* en el ADN guardan correspondencia tanto con la falta de activación (ausencia de mono Ub-*FANCD2*) como de bajada en los niveles de proteína total de *FANCD2* en el caso de las células tumorales estudiadas. En cuanto a las células no transformadas, la falta de activación en la formación de focos de *FANCD2* en el ADN tras la exposición a los fármacos TAICAs tan sólo se correlaciona con la ausencia de activación de *FANCD2* por monoubiquitinización.

Basándonos en las observaciones anteriormente comentadas, es posible especular sobre la posibilidad de que la respuesta a los fármacos TAICAs relacionada con la ruta de AF podría deberse principalmente al efecto de estos compuestos sobre la expresión de FANCD2, mientras que las consecuencias de que FANCD2 no se active en focos en el ADN podrían depender del estado de transformación de la célula. Esta hipótesis podría explicar el hecho de que las células tumorales deficientes y competentes en la ruta de AF tienen una respuesta similar a los fármacos TAICAs, mientras que la sensibilidad de las células no transformadas a estos compuestos depende de la integridad de la ruta de AF. De este modo, al comparar los niveles de expresión de FANCD2 y la sensibilidad a los cuatro fármacos analizados en las células tumorales se observa que la mayor sensibilidad frente a los fármacos TAICAs va acompañada de una disminución significativa en los niveles de proteína FANCD2, mientras que la sensibilidad de células deficientes en la ruta de AF a MMC fue independiente de los niveles de expresión de FANCD2. Por otro lado, en las células no transformadas no puede establecerse esta asociación (**tabla XII**).

	LCL CT		EUFA1365 + FANCA		CHRF28811 + FANCF		Kasumi-1	
	IC ₅₀	PROT.	IC ₅₀	PROT.	IC ₅₀	PROT.	IC ₅₀	PROT.
ET	4,20	133,72	0,83	47,67	1,14	85,01	1,16	0,00
ZLP	9,16	71,20	1,78	36,38	7,45	57,53	6,23	0,00
PM	4,88	112,30	0,68	46,58	1,17	55,20	2,05	7,80
MMC	617,61	104,99	65,86	96,62	393,04	125,59	325,24	87,82

Tabla XII. Valores de IC₅₀ (nM) y niveles de expresión de proteína total FANCD2 (% respecto CT) tras la exposición a trabectedina (ET), Zalypsis® (ZLP), PM01183 (PM) y MMC en diferentes líneas celulares.

Corroborando nuestras observaciones de una bajada significativa de la expresión de FANCD2 debido a la exposición a los fármacos TAICAs, estudios previos han demostrado que la trabectedina está implicada en la regulación de la transcripción (David-Cordonnier *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2000; Minuzzo *et al.*, 2000). Del mismo modo, un estudio reciente mostró, en dos líneas diferentes de LMA, una disminución de la expresión de diferentes genes de RDA por Zalypsis® (Colado *et al.*, 2011). Desde un punto de vista mecanístico, recientemente se ha descrito que trabectedina y Zalypsis® pueden inhibir la síntesis de ARN mediante el bloqueo de la unión de factores de transcripción a regiones reguladores del ADN, tales como Sp1, así como bloqueo de la elongación de ARN polimerasa II en la horquilla de transcripción (Feuerhahn *et al.*, 2011). Además, los resultados obtenidos sobre la actividad del promotor del gen humano *FANCD2* apuntan a una regulación negativa de la

expresión por parte de Zalypsis® y PM01183 (**figura 30**). Esta región posee sitios de unión a la familia de factores de transcripción E2F (Hoskins *et al.*, 2008), que están relacionados con la regulación del ciclo celular y proliferación (Cobrinik, 2005), de modo que los fármacos podrían estar bloqueando la unión de los E2F activadores de la expresión al promotor del gen *FANCD2*. Sin embargo, serán necesarios más estudios (CHIP, EMSA, inhibidores de E2F) para poder confirmar esta hipótesis.

El hecho de no haber observado un efecto inhibitorio sobre el fragmento del promotor del gen *FANCD2* por parte del fármaco trabectedina no implica necesariamente que este fármaco no regule la actividad promotora del gen, pues tan sólo se ha estudiado 1kb del promotor. Un estudio más detallado del promotor, como se realizó con los genes *FANC* correspondientes al complejo I de la ruta de AF (Meier y Schindler, 2011), sería necesario para poder caracterizar mejor esta regulación.

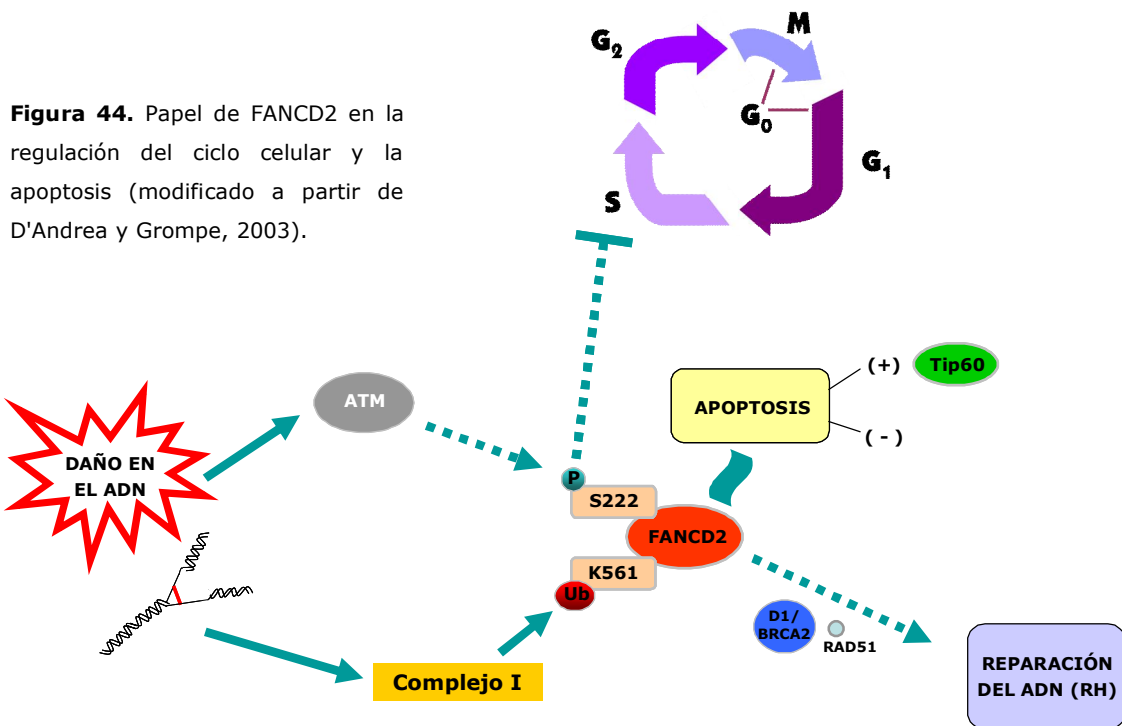
5.2.2. Los fármacos TAICAs y su efecto sobre la apoptosis y el ciclo celular

Muchos agentes antitumorales son capaces de generar estrés genotóxico en las células cancerosas, provocando el bloqueo del ciclo celular para intentar reparar las lesiones en el ADN. Cuando esta reparación no se produce, las células entran en apoptosis como consecuencia de las múltiples mutaciones que están presentes en genes implicados en mecanismos reguladores de la célula tales como RDA, ciclo celular, etc. (Medema y Macurek, 2012). Estudios previos llevados a cabo con los tres TAICAs, así como con MMC, muestran que todos ellos son capaces de inducir parada de ciclo y apoptosis en diferentes modelos celulares de cáncer (Vidal *et al.*, 2012; Colado *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2010; Ocio *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2005; van der Heijden *et al.*, 2004b; Pirnia *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2001).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la interacción de la ruta de AF con los procesos de regulación del ciclo celular y de la apoptosis (Kaddar y Carreau, 2012; Andreassen y Ren, 2009; D'Andrea y Grompe, 2003). Por ejemplo, FANCC se asocia con la quinasa Cdc2, encargada de regular la progresión del ciclo celular (Kupfer *et al.*, 1997), e interacciona con Hsp70 (*Heat shock protein 70*), paso necesario para proteger a las células de la apoptosis inducida por citoquinas como TNF- α e IFN- γ (Pang *et al.*, 2001).

La proteína FANCD2 no es una excepción, ya que su fosforilación vía ATM/ATR en varios aminoácidos críticos (S222, S717, T691) (Ho *et al.*, 2006; Taniguchi *et al.*, 2002)

activa el punto de control de la fase S del ciclo celular, en respuesta a una lesión en el ADN producida por agentes entrecruzantes o radiaciones ionizantes.



Igualmente, FANCD2 está vinculada a apoptosis ya que, dependiendo de las necesidades de la célula, puede activarla a través de una interacción con la enzima acetiltransferasa de histonas Tip60 (Hejna *et al.*, 2012) o bien inhibirla con el objeto de proteger a la célula (Hays *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2003).

En este trabajo, se ha observado que las dosis utilizadas de los fármacos TAICAs inducen apoptosis y un bloqueo del ciclo celular preferentemente en células tumorales. En el caso de MMC, la dosis equitóxica empleada no indujo ningún efecto, ni en células tumorales ni en células no transformadas (**apartado 4.4**). En base a los resultados obtenidos, podría pensarse que la bajada en la expresión de FANCD2 podría estar contribuyendo al aumento en la apoptosis, en consonancia con estudios previos (Hays *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2003). De hecho, está descrito que estos fármacos activan la apoptosis vía caspasa-dependiente, además de afectar a la expresión de otros genes implicados en regular este proceso (Colado *et al.*, 2011).

Por otro lado, la acumulación de las células tumorales en fase G₀/G₁ inducida por la exposición a los fármacos TAICAs podría deberse a la activación de los procesos de control del ciclo celular en esta fase, que intentan evitar que las células con lesiones en su material

genético, producidas por la incorporación de los fármacos al ADN, y que no han muerto por apoptosis, continúen dividiéndose. Este fenómeno se ha detectado con anterioridad en células tumorales expuestas a trabectedina (Martinez-Serra *et al.*, 2011) y a Zalypsis® (Ocio *et al.*, 2009), aunque la parada en fase S (Leal *et al.*, 2009) o G₂/M (Romano *et al.*, 2011; Beaugrand *et al.*, 2011; Erba *et al.*, 2001) también ha sido descrita para los tres compuestos en función de la dosis y el modelo celular utilizado.

5.3. Adición/Sinergia de los fármacos TAICAs en combinación con agentes que producen entrecruzamientos en el ADN

Una práctica muy común en el tratamiento de pacientes con cáncer es la utilización de combinaciones de dos o más fármacos antitumorales. Se trata de evitar que se desarrollen resistencias frente al tratamiento gracias al uso de compuestos con diferentes mecanismos de acción, al mismo tiempo que se intenta reducir la incidencia y la severidad de los efectos indeseables asociados a dichos compuestos, empleando dosis inferiores de cada uno de los fármacos. De hecho, las autoridades reguladoras se preocupan por este tipo de aproximaciones para el desarrollo de nuevas terapias⁵.

Los ensayos preclínicos sirven para estudiar el tipo de interacción que se establece entre dos o más fármacos al administrarlos simultáneamente: aditiva, si el efecto observado corresponde a la suma de los efectos que cada uno de ellos produce por separado; sinérgico, si es mayor, y antagónico, si es menor (Chou, 2006).

Dada la preocupación por desarrollar nuevas terapias combinadas, se planteó estudiar las posibles interacciones entre los fármacos TAICAs y agentes entrecruzantes del ADN basándose en una disminución en la cantidad de proteína FANCD2 en las células tumorales (**tabla XII**). Por ello, la combinación de los TAICAs con agentes entrecruzantes clásicos sensibilizaría a las células tumorales frente a agentes productores de ICLs en el ADN. Apoyando esta propuesta, un estudio reciente ha mostrado el efecto sinérgico de PM01183 con cisplatino, tanto en líneas de cáncer de ovario sensibles a cisplatino como resistentes (Vidal *et al.*, 2012). Un concepto similar fue propuesto previamente para los inhibidores de quinasas wortmanina, H-9 y alsterpaullona en combinación con curcumina, un fármaco que inhibe la monoubiquitinización de FANCD2 (Chirnomas *et al.*, 2006). Del mismo modo, el tratamiento de células de MM con inhibidores del proteosoma como bortezomib consigue

una reducción drástica de la expresión de FANCD2, lo que resulta en un aumento de la sensibilidad al melfalán (Yarde *et al.*, 2009). Asimismo, un estudio ha demostrado recientemente que el fármaco antitumoral 5-fluoracilo (5-FU), inductor de RDCs, produce una disminución en la expresión de FANCD2 en células de cáncer gástrico y que esto podría explicar la sinergia producida al combinar oxaliplatino y 5-FU en los pacientes con cáncer de colon y gástrico, siendo éste un tratamiento habitual para estos pacientes (Mori *et al.*, 2012).

El análisis de la interacción de trabectedina, Zalypsis® y PM01183 con agentes entrecruzantes del ADN, como MMC o cisplatino, en los diferentes modelos tumorales que se recogen en este trabajo muestra un efecto beneficioso de la combinación, siendo aditivo en la mayoría de los casos con una tendencia a la sinergia. Los dos métodos utilizados para este tipo de análisis mostraron, en general, concordancia en cuanto a la clasificación de la interacción; es decir, si el valor de CI para la combinación de PM01183 y MMC en la línea de cáncer de ovario IGROV1 indicaba adición, con los isoblogramas se obtuvo el mismo resultado. Sin embargo, en algunos casos hubo ciertas discrepancias (ej.: UM-UC-3 y MMC+PM01183), aunque en ningún caso el efecto resultó antagónico.

En cuanto al modelo de carcinoma escamoso, puede decirse que Zalypsis® inhibe la ruta de AF en las células tumorales a través de una disminución en la expresión y en la formación de focos nucleares de FANCD2 en el ADN. Este efecto se mantiene cuando se combina con MMC (**figura 43**), lo que se traduce en una mayor mortalidad de las células tumorales cuando éstas se exponen a MMC (**figura 42**). Así, las células expuestas a Zalypsis® tendrían problemas para reparar las ICLs inducidas por MMC, debido a una disfuncionalidad en su ruta de AF al presentar niveles reducidos de FANCD2 y no facilitar la formación de focos de reparación del ADN. En este mismo año se ha descrito un mecanismo similar para explicar el efecto sinérgico de la combinación de 5-fluoracilo y oxaliplatino en cáncer gástrico (Mori *et al.*, 2012).

5.4. Hipótesis final

Teniendo en cuenta los resultados presentados en este trabajo de forma global, se ha construido una hipótesis que se recoge a grandes rasgos en la **figura 45**. A pesar de que resultados previos muestran que trabectedina, Zalypsis® y PM01183 generan aductos con el ADN que mimetizan ICLs, nuestros resultados demuestran marcadas diferencias en los efectos de los fármacos TAICAs y MMC respecto a la activación de la ruta de AF, un

mecanismo crítico en la reparación de las ICLs en el ADN. Así, mientras que MMC se define como un activador clásico de la ruta de AF, los tres fármacos TAICAs estudiados en este trabajo actúan como inhibidores de esta ruta.

De este modo, la exposición de células tumorales con una ruta de AF funcional a los fármacos TACIAs conseguiría, pues, un efecto "fanconizador" sobre las mismas al disminuir los niveles de expresión de FANCD2, conduciendo a un defecto en la reparación de entrecruzamientos en el ADN. Esto contribuiría a sensibilizarlas frente a agentes entrecruzantes clásicos, potenciando su efecto citotóxico.

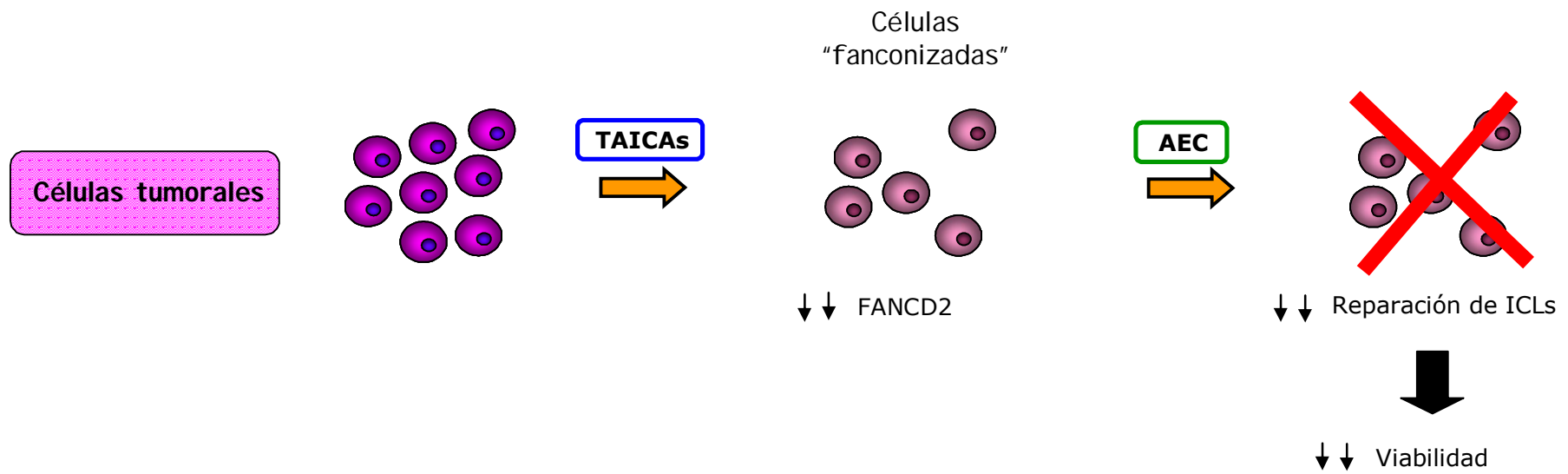


Figura 45. Esquema hipotético del efecto de la combinación de fármacos TAICAs con agentes entrecruzantes clásicos (AEC; ej.: MMC, cisplatino) en células tumorales competentes en la ruta de AF.

6. Conclusiones

1. Tal como ocurre frente a una exposición a MMC, progenitores hematopoyéticos de ratón y líneas linfoblastoides humanas deficientes en genes *FANC* son más sensibles a los fármacos TAICAs en comparación con las mismas células competentes en la ruta de AF.
2. En el caso de las células tumorales de carcinoma escamoso y de leucemia mieloide aguda ensayadas, la sensibilidad a los fármacos TAICAs no es dependiente de una ruta de AF funcional, al contrario de lo que sucede frente a exposiciones a MMC.
3. Esta respuesta diferencial se asocia a una marcada disminución en la expresión de FANCD2 tras la exposición de las células tumorales a los fármacos TAICAs, mientras que dicho efecto no se observa después de una exposición a MMC.
4. Al contrario de lo que ocurre con MMC, los fármacos TAICAs no inducen la formación de focos nucleares de FANCD2, ni en células sanas ni en células tumorales. Más aún, la exposición de células de carcinoma escamoso a Zalypsis[®], uno de los fármacos TAICAs ensayados, inhibe la formación de focos nucleares de FANCD2 que se induce después de un tratamiento con MMC.
5. La combinación de los fármacos de tipo TAICA con agentes entrecruzantes del ADN induce *in vitro* un efecto citotóxico aditivo con tendencia a la sinergia en las células tumorales ensayadas.

En su conjunto, a pesar de que trabectedina, Zalypsis[®] y PM01183 generan aductos con el ADN que mimetizan los entrecruzamientos del ADN producidos por los agentes entrecruzantes clásicos, existen marcadas diferencias en los efectos de los fármacos tipo TAICA en cuanto a su interacción con la ruta de AF. En virtud de la inhibición que ejercen los fármacos TAICAs sobre la ruta de AF, nuestros resultados nos permiten proponer el uso clínico de los mismos para “fanconizar” células tumorales, sensibilizándolas frente a agentes que producen entrecruzamientos en el ADN.

7. Bibliografía

1. Adamo, A., Collis, S.J., Adelman, C.A., Silva, N., Horejsi, Z., Ward, J.D., Martinez-Perez, E., Boulton, S.J., and La Volpe, A. (2010). Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia. *Molecular cell* 39, 25-35.
2. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
3. Ali, A.M., Singh, T.R., and Meetei, A.R. (2009). FANCM-FAAP24 and FANCI: FA proteins that metabolize DNA. *Mutation research* 668, 20-26.
4. Allavena, P., Signorelli, M., Chieppa, M., Erba, E., Bianchi, G., Marchesi, F., Olimpio, C.O., Bonardi, C., Garbi, A., Lissoni, A., *et al.* (2005). Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production. *Cancer research* 65, 2964-2971.
5. Andreassen, P.R., and Ren, K. (2009). Fanconi anemia proteins, DNA interstrand crosslink repair pathways, and cancer therapy. *Current cancer drug targets* 9, 101-117.
6. Asou, H., Tashiro, S., Hamamoto, K., Otsuji, A., Kita, K., and Kamada, N. (1991). Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood* 77, 2031-2036.
7. Aune, G.J., Takagi, K., Sordet, O., Guirouilh-Barbat, J., Antony, S., Bohr, V.A., and Pommier, Y. (2008). Von Hippel-Lindau-coupled and transcription-coupled nucleotide excision repair-dependent degradation of RNA polymerase II in response to trabectedin. *Clin Cancer Res* 14, 6449-6455.
8. Banzato, A., Bobisse, S., Rondina, M., Renier, D., Bettella, F., Esposito, G., Quintieri, L., Melendez-Alafort, L., Mazzi, U., Zanovello, P., *et al.* (2008). A paclitaxel-hyaluronan bioconjugate targeting ovarian cancer affords a potent in vivo therapeutic activity. *Clin Cancer Res* 14, 3598-3606.
9. Benard, J., Da Silva, J., De Blois, M.C., Boyer, P., Duvillard, P., Chiric, E., and Riou, G. (1985). Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice. *Cancer research* 45, 4970-4979.
10. Berenbaum, M.C. (1989). What is synergy? *Pharmacological reviews* 41, 93-141.
11. Bhatia, M., Wang, J.C., Kapp, U., Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5320-5325.
12. Bissels, U., Bosio, A., and Wagner, W. (2012). MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica* 97, 160-167.
13. Biswas, A.K., and Johnson, D.G. (2012). Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage. *Cancer research* 72, 13-17.
14. Bonfanti, M., La Valle, E., Fernandez Sousa Faro, J.M., Faircloth, G., Caretti, G., Mantovani, R., and D'Incalci, M. (1999). Effect of ecteinascidin-743 on the interaction between DNA binding proteins and DNA. *Anti-cancer drug design* 14, 179-186.
15. Bouwman, P., and Jonkers, J. (2012). The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nature reviews* 12, 587-598.
16. Bradley, T.R., and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *The Australian journal of experimental biology and medical science* 44, 287-299.
17. Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913-917.
18. Bueren-Calabuig, J.A., Giraudon, C., Galmarini, C.M., Egly, J.M., and Gago, F. (2011). Temperature-induced melting of double-stranded DNA in the absence and presence of covalently bonded antitumour drugs: insight from molecular dynamics simulations. *Nucleic acids research* 39, 8248-8257.
19. Burkitt, K., and Ljungman, M. (2008). Phenylbutyrate interferes with the Fanconi anemia and BRCA pathway and sensitizes head and neck cancer cells to cisplatin. *Molecular cancer* 7, 24.
20. Casado, J.A., Callen, E., Jacome, A., Rio, P., Castella, M., Lobitz, S., Ferro, T., Munoz, A., Sevilla, J., Cantalejo, A., *et al.* (2007). A comprehensive strategy for the subtyping of Fanconi Anemia patients: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia research network. *Journal of medical genetics* 44, 241-249.

- 21.** Casado, J.A., Rio, P., Marco, E., Garcia-Hernandez, V., Domingo, A., Perez, L., Tercero, J.C., Vaquero, J.J., Albella, B., Gago, F., *et al.* (2008). Relevance of the Fanconi anemia pathway in the response of human cells to trabectedin. *Molecular cancer therapeutics* 7, 1309-1318.
- 22.** Castella, M., Pujol, R., Callen, E., Trujillo, J.P., Casado, J.A., Gille, H., Lach, F.P., Auerbach, A.D., Schindler, D., Benitez, J., *et al.* (2011). Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. *Blood* 117, 3759-3769.
- 23.** Catlin, S.N., Busque, L., Gale, R.E., Gutter, P., and Abkowitz, J.L. (2011). The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo. *Blood* 117, 4460-4466.
- 24.** Ciccio, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular cell* 40, 179-204.
- 25.** Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24, 2796-2809.
- 26.** Colado, E., Paino, T., Maiso, P., Ocio, E.M., Chen, X., Alvarez-Fernandez, S., Gutierrez, N.C., Martin-Sanchez, J., Flores-Montero, J., San Segundo, L., *et al.* (2011). Zalypsin has in vitro activity in acute myeloid blasts and leukemic progenitor cells through the induction of a DNA damage response. *Haematologica* 96, 687-695.
- 27.** Conneally, E., Cashman, J., Petzer, A., and Eaves, C. (1997). Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9836-9841.
- 28.** Cragg, G.M., Newman, D.J., and Weiss, R.B. (1997). Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. *Seminars in oncology* 24, 156-163.
- 29.** Cragg, G.M., Newman, D.J., and Yang, S.S. (2006). Natural product extracts of plant and marine origin having antileukemia potential. The NCI experience. *Journal of natural products* 69, 488-498.
- 30.** Cuevas, C., Perez, M., Martin, M.J., Chicharro, J.L., Fernandez-Rivas, C., Flores, M., Francesch, A., Gallego, P., Zarzuelo, M., de La Calle, F., *et al.* (2000). Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafraicin B. *Organic letters* 2, 2545-2548.
- 31.** Chandra, S., Levran, O., Jurickova, I., Maas, C., Kapur, R., Schindler, D., Henry, R., Milton, K., Batish, S.D., Cancelas, J.A., *et al.* (2005). A rapid method for retrovirus-mediated identification of complementation groups in Fanconi anemia patients. *Mol Ther* 12, 976-984.
- 32.** Chappuis, P.O., Goffin, J., Wong, N., Perret, C., Ghadirian, P., Tonin, P.N., and Foulkes, W.D. (2002). A significant response to neoadjuvant chemotherapy in BRCA1/2 related breast cancer. *Journal of medical genetics* 39, 608-610.
- 33.** Chen, C.C., Kennedy, R.D., Sidi, S., Look, A.T., and D'Andrea, A. (2009a). CHK1 inhibition as a strategy for targeting Fanconi Anemia (FA) DNA repair pathway deficient tumors. *Molecular cancer* 8, 24.
- 34.** Chen, H.Z., Tsai, S.Y., and Leone, G. (2009b). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature reviews* 9, 785-797.
- 35.** Cheng, N.C., van de Vrugt, H.J., van der Valk, M.A., Oostra, A.B., Krimpenfort, P., de Vries, Y., Joenje, H., Berns, A., and Arwert, F. (2000). Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog Fanca. *Human molecular genetics* 9, 1805-1811.
- 36.** Chiang, S.Y., Bruce, T.C., Azizkhan, J.C., Gawron, L., and Beerman, T.A. (1997). Targeting E2F1-DNA complexes with microgonotropen DNA binding agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2811-2816.
- 37.** Chirnomas, D., Taniguchi, T., de la Vega, M., Vaidya, A.P., Vasserman, M., Hartman, A.R., Kennedy, R., Foster, R., Mahoney, J., Seiden, M.V., *et al.* (2006). Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Molecular cancer therapeutics* 5, 952-961.
- 38.** Chou, T.C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews* 58, 621-681.
- 39.** Chou, T.C., and Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation* 22, 27-55.
- 40.** D'Andrea, A.D. (2010). Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. *The New England journal of medicine* 362, 1909-1919.

41. D'Andrea, A.D., and Grompe, M. (2003). The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nature reviews* 3, 23-34.
42. D'Incalci, M., Colombo, T., Ubezio, P., Nicoletti, I., Giavazzi, R., Erba, E., Ferrarese, L., Meco, D., Riccardi, R., Sessa, C., *et al.* (2003). The combination of yonnelis and cisplatin is synergistic against human tumor xenografts. *Eur J Cancer* 39, 1920-1926.
43. D'Incalci, M., and Galmarini, C.M. (2010). A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action. *Molecular cancer therapeutics* 9, 2157-2163.
44. Dancey, J.E., Bedard, P.L., Onetto, N., and Hudson, T.J. (2012). The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell* 148, 409-420.
45. David-Cordonnier, M.H., Gajate, C., Olmea, O., Laine, W., de la Iglesia-Vicente, J., Perez, C., Cuevas, C., Otero, G., Manzanares, I., Bailly, C., *et al.* (2005). DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin. *Chemistry & biology* 12, 1201-1210.
46. Deans, A.J., and West, S.C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nature reviews* 11, 467-480.
47. Donawho, C.K., Luo, Y., Luo, Y., Penning, T.D., Bauch, J.L., Bouska, J.J., Bontcheva-Diaz, V.D., Cox, B.F., DeWeese, T.L., Dillehay, L.E., *et al.* (2007). ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin Cancer Res* 13, 2728-2737.
48. Edwards, S.L., Brough, R., Lord, C.J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D.A., Boyd, J., Reis-Filho, J.S., and Ashworth, A. (2008). Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature* 451, 1111-1115.
49. Elizalde, C., Fernandez-Rueda, J., Salcedo, J.M., Dorronsoro, A., Ferrin, I., Jakobsson, E., and Trigueros, C. (2012). Histone Deacetylase 3 Modulates the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells. *Stem cells and development*.
50. Erba, E., Bergamaschi, D., Bassano, L., Damia, G., Ronzoni, S., Faircloth, G.T., and D'Incalci, M. (2001). Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *Eur J Cancer* 37, 97-105.
51. Erickson-Miller, C.L., May, R.D., Tomaszewski, J., Osborn, B., Murphy, M.J., Page, J.G., and Parchment, R.E. (1997). Differential toxicity of camptothecin, topotecan and 9-aminocamptothecin to human, canine, and murine myeloid progenitors (CFU-GM) *in vitro*. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 39, 467-472.
52. Evers, B., Drost, R., Schut, E., de Bruin, M., van der Burg, E., Derksen, P.W., Holstege, H., Liu, X., van Drunen, E., Beverloo, H.B., *et al.* (2008). Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin. *Clin Cancer Res* 14, 3916-3925.
53. Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., *et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917-921.
54. Feuerhahn, S., Giraudon, C., Martinez-Diez, M., Bueren-Calabuig, J.A., Galmarini, C.M., Gago, F., and Egly, J.M. (2011). XPF-dependent DNA breaks and RNA polymerase II arrest induced by antitumor DNA interstrand crosslinking-mimetic alkaloids. *Chemistry & biology* 18, 988-999.
55. Friedman, D., Hu, Z., Kolb, E.A., Gorfajn, B., and Scotto, K.W. (2002). Ecteinascidin-743 inhibits activated but not constitutive transcription. *Cancer research* 62, 3377-3381.
56. Fugman, D.A., Witte, D.P., Jones, C.L., Aronow, B.J., and Lieberman, M.A. (1990). *In vitro* establishment and characterization of a human megakaryoblastic cell line. *Blood* 75, 1252-1261.
57. Funke, S., Maisner, A., Muhlebach, M.D., Koehl, U., Grez, M., Cattaneo, R., Cichutek, K., and Buchholz, C.J. (2008). Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Mol Ther* 16, 1427-1436.
58. Gago, F., and Hurley, L.H. (2002). Devising a structural basis for the potent cytotoxic effects of ecteinascidin 743. In *Small Molecule DNA and RNA Binders: From Synthesis to Nucleic Acid Complexes* M. Demeunynck, Bailly, C., Wilson, W. D., Eds, ed. (Wiley-VCH: Weinheim, Germany), pp. 643-675.
59. Gallmeier, E., Hucl, T., Brody, J.R., Dezentje, D.A., Tahir, K., Kasparkova, J., Brabec, V., Bachman, K.E., and Kern, S.E. (2007). High-throughput screening identifies novel agents eliciting hypersensitivity in Fanconi pathway-deficient cancer cells. *Cancer research* 67, 2169-2177.
60. Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M.S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., and D'Andrea, A.D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Molecular cell* 7, 249-262.

- 61.** Gartner, S., and Kaplan, H.S. (1980). Long-term culture of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *77*, 4756-4759.
- 62.** Germano, G., Frapolli, R., Simone, M., Tavecchio, M., Erba, E., Pesce, S., Pasqualini, F., Grosso, F., Sanfilippo, R., Casali, P.G., *et al.* (2010). Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. *Cancer research* *70*, 2235-2244.
- 63.** Ghielmini, M., Bosshard, G., Capolongo, L., Geroni, M.C., Pesenti, E., Torri, V., D'Incalci, M., Cavalli, F., and Sessa, C. (1997). Estimation of the haematological toxicity of minor groove alkylators using tests on human cord blood cells. *British journal of cancer* *75*, 878-883.
- 64.** Goldwasser, F., Bozec, L., Zeghari-Squalli, N., and Misset, J.L. (1999). Cellular pharmacology of the combination of oxaliplatin with topotecan in the IGROV-1 human ovarian cancer cell line. *Anti-cancer drugs* *10*, 195-201.
- 65.** Gonzalez-Murillo, A., Lozano, M.L., Alvarez, L., Jacome, A., Almarza, E., Navarro, S., Segovia, J.C., Hanenberg, H., Guenechea, G., Bueren, J.A., *et al.* (2010). Development of lentiviral vectors with optimized transcriptional activity for the gene therapy of patients with Fanconi anemia. *Human gene therapy* *21*, 623-630.
- 66.** Graf, T. (2002). Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* *99*, 3089-3101.
- 67.** Gregory, C.J., and Eaves, A.C. (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* *51*, 527-537.
- 68.** Guirouilh-Barbat, J., Antony, S., and Pommier, Y. (2009). Zalypsis (PM00104) is a potent inducer of gamma-H2AX foci and reveals the importance of the C ring of trabectedin for transcription-coupled repair inhibition. *Molecular cancer therapeutics* *8*, 2007-2014.
- 69.** Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., and Mulligan, R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* *401*, 390-394.
- 70.** Hanenberg, H., Batish, S.D., Pollok, K.E., Vieten, L., Verlander, P.C., Leurs, C., Cooper, R.J., Gottsche, K., Haneline, L., Clapp, D.W., *et al.* (2002). Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Experimental hematology* *30*, 410-420.
- 71.** Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular cell* *28*, 739-745.
- 72.** Harrison, D.E., Jordan, C.T., Zhong, R.K., and Astle, C.M. (1993). Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. *Experimental hematology* *21*, 206-219.
- 73.** Hassan, S.B., Jonsson, E., Larsson, R., and Karlsson, M.O. (2001). Model for time dependency of cytotoxic effect of CHS 828 in vitro suggests two different mechanisms of action. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *299*, 1140-1147.
- 74.** Hays, L.E., Zodrow, D.M., Yates, J.E., Deffebach, M.E., Jacoby, D.B., Olson, S.B., Pankow, J.F., and Bagby, G.C. (2008). Cigarette smoke induces genetic instability in airway epithelial cells by suppressing FANCD2 expression. *British journal of cancer* *98*, 1653-1661.
- 75.** Hejna, J., Bruun, D., Pauw, D., and Moses, R.E. (2012). A FANCD2 domain activates Tip60-dependent apoptosis. *Cell biology international* *34*, 893-899.
- 76.** Helleday, T. (2003). Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation research* *532*, 103-115.
- 77.** Herrero, A.B., Martin-Castellanos, C., Marco, E., Gago, F., and Moreno, S. (2006). Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin. *Cancer research* *66*, 8155-8162.
- 78.** Herzog, E.L., Chai, L., and Krause, D.S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* *102*, 3483-3493.
- 79.** Hess, C.J., Ameziane, N., Schuurhuis, G.J., Errami, A., Denkers, F., Kaspers, G.J., Cloos, J., Joenje, H., Reinhardt, D., Ossenkoppele, G.J., *et al.* (2008). Hypermethylation of the FANCC and FANCL promoter regions in sporadic acute leukaemia. *Cell Oncol* *30*, 299-306.
- 80.** Himburg, H.A., Muramoto, G.G., Daher, P., Meadows, S.K., Russell, J.L., Doan, P., Chi, J.T., Salter, A.B., Lento, W.E., Reya, T., *et al.* (2010). Pleiotrophin regulates the expansion and regeneration of hematopoietic stem cells. *Nature medicine* *16*, 475-482.

- 81.** Ho, G.P., Margossian, S., Taniguchi, T., and D'Andrea, A.D. (2006). Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance. *Molecular and cellular biology* *26*, 7005-7015.
- 82.** Hoskins, E.E., Gunawardena, R.W., Habash, K.B., Wise-Draper, T.M., Jansen, M., Knudsen, E.S., and Wells, S.I. (2008). Coordinate regulation of Fanconi anemia gene expression occurs through the Rb/E2F pathway. *Oncogene* *27*, 4798-4808.
- 83.** Hussain, S., Wilson, J.B., Medhurst, A.L., Hejna, J., Witt, E., Ananth, S., Davies, A., Masson, J.Y., Moses, R., West, S.C., *et al.* (2004). Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. *Human molecular genetics* *13*, 1241-1248.
- 84.** Ikeda, H., Matsushita, M., Waisfisz, Q., Kinoshita, A., Oostra, A.B., Nieuwint, A.W., De Winter, J.P., Hoatlin, M.E., Kawai, Y., Sasaki, M.S., *et al.* (2003). Genetic reversion in an acute myelogenous leukemia cell line from a Fanconi anemia patient with biallelic mutations in BRCA2. *Cancer research* *63*, 2688-2694.
- 85.** Imai, Y., Ishikawa, E., Asada, S., and Sugimoto, Y. (2005). Estrogen-mediated post transcriptional down-regulation of breast cancer resistance protein/ABCG2. *Cancer research* *65*, 596-604.
- 86.** Jackson, K.A., Majka, S.M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Michael, L.H., Hirschi, K.K., and Goodell, M.A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *The Journal of clinical investigation* *107*, 1395-1402.
- 87.** Jackson, K.A., Mi, T., and Goodell, M.A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 14482-14486.
- 88.** Jin, S., Gorfajn, B., Faircloth, G., and Scotto, K.W. (2000). Ecteinascidin 743, a transcription-targeted chemotherapeutic that inhibits MDR1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 6775-6779.
- 89.** Jones, S., Hruban, R.H., Kamiyama, M., Borges, M., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Palmisano, E., Brune, K., Jaffee, E.M., *et al.* (2009). Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science (New York, NY)* *324*, 217.
- 90.** Kachnic, L.A., Li, L., Fournier, L., and Willers, H. (2010). Fanconi anemia pathway heterogeneity revealed by cisplatin and oxaliplatin treatments. *Cancer letters* *292*, 73-79.
- 91.** Kaddar, T., and Carreau, M. (2012). Fanconi anemia proteins and their interacting partners: a molecular puzzle. *Anemia* *2012*, 425814.
- 92.** Kaelin, W.G., Jr. (2005). The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nature reviews* *5*, 689-698.
- 93.** Kalb, R., Neveling, K., Hoehn, H., Schneider, H., Linka, Y., Batish, S.D., Hunt, C., Berwick, M., Callen, E., Surralles, J., *et al.* (2007). Hypomorphic mutations in the gene encoding a key Fanconi anemia protein, FANCD2, sustain a significant group of FA-D2 patients with severe phenotype. *American journal of human genetics* *80*, 895-910.
- 94.** Kee, Y., and D'Andrea, A.D. (2010). Expanded roles of the Fanconi anemia pathway in preserving genomic stability. *Genes & development* *24*, 1680-1694.
- 95.** Kennedy, R.D., and D'Andrea, A.D. (2005). The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes & development* *19*, 2925-2940.
- 96.** Kishi, K., Yazawa, K., Takahashi, K., Mikami, Y., and Arai, T. (1984). Structure-activity relationships of saframycins. *The Journal of antibiotics* *37*, 847-852.
- 97.** Kitao, H., and Takata, M. (2011). Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *International journal of hematology* *93*, 417-424.
- 98.** Knipscheer, P., Raschle, M., Smogorzewska, A., Enou, M., Ho, T.V., Scharer, O.D., Elledge, S.J., and Walter, J.C. (2009). The Fanconi anemia pathway promotes replication-dependent DNA interstrand cross-link repair. *Science (New York, NY)* *326*, 1698-1701.
- 99.** Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* *91*, 661-672.
- 100.** Koul, S., McKiernan, J.M., Narayan, G., Houldsworth, J., Bacik, J., Dobrzynski, D.L., Assaad, A.M., Mansukhani, M., Reuter, V.E., Bosl, G.J., *et al.* (2004). Role of promoter hypermethylation in Cisplatin treatment response of male germ cell tumors. *Molecular cancer* *3*, 16.

- 101.** Kratz, K., Schopf, B., Kaden, S., Sendoel, A., Eberhard, R., Lademann, C., Cannavo, E., Sartori, A.A., Hengartner, M.O., and Jiricny, J. (2010). Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. *Cell* *142*, 77-88.
- 102.** Krause, D.S. (2002). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene therapy* *9*, 754-758.
- 103.** Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S.J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* *105*, 369-377.
- 104.** Kupfer, G.M., Yamashita, T., Naf, D., Suliman, A., Asano, S., and D'Andrea, A.D. (1997). The Fanconi anemia polypeptide, FAC, binds to the cyclin-dependent kinase, cdc2. *Blood* *90*, 1047-1054.
- 105.** Kutler, D.I., Auerbach, A.D., Satagopan, J., Giampietro, P.F., Batish, S.D., Huvos, A.G., Goberdhan, A., Shah, J.P., and Singh, B. (2003a). High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* *129*, 106-112.
- 106.** Kutler, D.I., Singh, B., Satagopan, J., Batish, S.D., Berwick, M., Giampietro, P.F., Hanenberg, H., and Auerbach, A.D. (2003b). A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood* *101*, 1249-1256.
- 107.** Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L., and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature medicine* *6*, 1229-1234.
- 108.** Landais, I., Hiddings, S., McCarroll, M., Yang, C., Sun, A., Turker, M.S., Snyder, J.P., and Hoatlin, M.E. (2009a). Monoketone analogs of curcumin, a new class of Fanconi anemia pathway inhibitors. *Molecular cancer* *8*, 133.
- 109.** Landais, I., Sobeck, A., Stone, S., LaChapelle, A., and Hoatlin, M.E. (2009b). A novel cell-free screen identifies a potent inhibitor of the Fanconi anemia pathway. *International journal of cancer* *124*, 783-792.
- 110.** Lansdorp, P.M., Sutherland, H.J., and Eaves, C.J. (1990). Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow. *The Journal of experimental medicine* *172*, 363-366.
- 111.** Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J.C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X.L., Kato, I., *et al.* (1996). Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nature medicine* *2*, 1329-1337.
- 112.** Leal, J.F., Garcia-Hernandez, V., Moneo, V., Domingo, A., Bueren-Calabuig, J.A., Negri, A., Gago, F., Guillen-Navarro, M.J., Aviles, P., Cuevas, C., *et al.* (2009). Molecular pharmacology and antitumor activity of Zalypsis in several human cancer cell lines. *Biochemical pharmacology* *78*, 162-170.
- 113.** Leal, J.F., Martinez-Diez, M., Garcia-Hernandez, V., Moneo, V., Domingo, A., Bueren-Calabuig, J.A., Negri, A., Gago, F., Guillen-Navarro, M.J., Aviles, P., *et al.* (2010). PM01183, a new DNA minor groove covalent binder with potent in vitro and in vivo anti-tumour activity. *British journal of pharmacology* *161*, 1099-1110.
- 114.** Lemieux, M.E., Rebel, V.I., Lansdorp, P.M., and Eaves, C.J. (1995). Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures. *Blood* *86*, 1339-1347.
- 115.** Li, W.W., Takahashi, N., Jhanwar, S., Cordon-Cardo, C., Elisseyeff, Y., Jimeno, J., Faircloth, G., and Bertino, J.R. (2001). Sensitivity of soft tissue sarcoma cell lines to chemotherapeutic agents: identification of ecteinascidin-743 as a potent cytotoxic agent. *Clin Cancer Res* *7*, 2908-2911.
- 116.** Li, X., and Heyer, W.D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell research* *18*, 99-113.
- 117.** Litman, R., Gupta, R., Brosh, R.M., Jr., and Cantor, S.B. (2008). BRCA-FA pathway as a target for anti-tumor drugs. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* *8*, 426-430.
- 118.** Liu, T., Ghosal, G., Yuan, J., Chen, J., and Huang, J. (2010). FAN1 acts with FANCI-FANCD2 to promote DNA interstrand cross-link repair. *Science (New York, NY)* *329*, 693-696.
- 119.** Liu, T.X., Howlett, N.G., Deng, M., Langenau, D.M., Hsu, K., Rhodes, J., Kanki, J.P., D'Andrea, A.D., and Look, A.T. (2003). Knockdown of zebrafish *Fancd2* causes developmental abnormalities via p53-dependent apoptosis. *Developmental cell* *5*, 903-914.

- 120.** Ludwig, T., Chapman, D.L., Papaioannou, V.E., and Efstratiadis, A. (1997). Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of *Brca1*, *Brca2*, *Brca1/Brca2*, *Brca1/p53*, and *Brca2/p53* nullizygous embryos. *Genes & development* *11*, 1226-1241.
- 121.** Lyakhovich, A., and Surrallés, J. (2006). Disruption of the Fanconi anemia/BRCA pathway in sporadic cancer. *Cancer letters* *232*, 99-106.
- 122.** MacKay, C., Declais, A.C., Lundin, C., Agostinho, A., Deans, A.J., MacArtney, T.J., Hofmann, K., Gartner, A., West, S.C., Helleday, T., *et al.* (2010). Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. *Cell* *142*, 65-76.
- 123.** Manzanares, I., Cuevas, C., Garcia-Nieto, R., Marco, E., and Gago, F. (2001). Advances in the chemistry and pharmacology of ecteinascidins, a promising new class of anti-cancer agents. *Current medicinal chemistry* *1*, 257-276.
- 124.** Marsit, C.J., Liu, M., Nelson, H.H., Posner, M., Suzuki, M., and Kelsey, K.T. (2004). Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene* *23*, 1000-1004.
- 125.** Martin, G.M., Sprague, C.A., and Epstein, C.J. (1970). Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *23*, 86-92.
- 126.** Martínez-Serra, J., Maffiotte, E., Martin, J., Bex, T., Navarro-Palou, M., Ros, T., Plazas, J.M., Vogler, O., Gutierrez, A., Amat, J.C., *et al.* (2011). Yondelis(R) (ET-743, Trabectedin) sensitizes cancer cell lines to CD95-mediated cell death: new molecular insight into the mechanism of action. *European journal of pharmacology* *658*, 57-64.
- 127.** Martínez, N., Sánchez-Beato, M., Carnero, A., Moneo, V., Tercero, J.C., Fernández, I., Navarrete, M., Jimeno, J., and Piris, M.A. (2005). Transcriptional signature of Ecteinascidin 743 (Yondelis, Trabectedin) in human sarcoma cells explanted from chemo-naïve patients. *Molecular cancer therapeutics* *4*, 814-823.
- 128.** Mayer, A.M., and Gustafson, K.R. (2003). Marine pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds. *International journal of cancer* *105*, 291-299.
- 129.** Mayer, A.M., and Gustafson, K.R. (2006). Marine pharmacology in 2003-2004: anti-tumour and cytotoxic compounds. *Eur J Cancer* *42*, 2241-2270.
- 130.** Mayer, A.M., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G., and Fusetani, N. (2011). Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* *153*, 191-222.
- 131.** McAllister, K.A., Bennett, L.M., Houle, C.D., Ward, T., Malphurs, J., Collins, N.K., Cachafeiro, C., Haseman, J., Goulding, E.H., Bunch, D., *et al.* (2002). Cancer susceptibility of mice with a homozygous deletion in the COOH-terminal domain of the *Brca2* gene. *Cancer research* *62*, 990-994.
- 132.** McCabe, N., Turner, N.C., Lord, C.J., Kluzek, K., Bialkowska, A., Swift, S., Giavara, S., O'Connor, M.J., Tutt, A.N., Zdzienicka, M.Z., *et al.* (2006). Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer research* *66*, 8109-8115.
- 133.** McLeod, D.L., Shreve, M.M., and Axelrad, A.A. (1976). Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro. *Nature* *261*, 492-494.
- 134.** Medema, R.H., and Macurek, L. (2012). Checkpoint control and cancer. *Oncogene* *31*, 2601-2613.
- 135.** Meetei, A.R., de Winter, J.P., Medhurst, A.L., Wallisch, M., Waisfisz, Q., van de Vrugt, H.J., Oostra, A.B., Yan, Z., Ling, C., Bishop, C.E., *et al.* (2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nature genetics* *35*, 165-170.
- 136.** Meier, D., and Schindler, D. (2011). Fanconi anemia core complex gene promoters harbor conserved transcription regulatory elements. *PLoS one* *6*, e22911.
- 137.** Metcalf, D., MacDonald, H.R., Odartchenko, N., and Sordat, B. (1975). Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *72*, 1744-1748.
- 138.** Milyavsky, M., Gan, O.I., Trottier, M., Komosa, M., Tabach, O., Notta, F., Lechman, E., Hermans, K.G., Eppert, K., Kononova, Z., *et al.* (2010). A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal. *Cell stem cell* *7*, 186-197.

- 139.** Minuzzo, M., Ceribelli, M., Pitarque-Marti, M., Borrelli, S., Erba, E., DiSilvio, A., D'Incalci, M., and Mantovani, R. (2005). Selective effects of the anticancer drug Yondelis (ET-743) on cell-cycle promoters. *Molecular pharmacology* *68*, 1496-1503.
- 140.** Minuzzo, M., Marchini, S., Broggin, M., Faircloth, G., D'Incalci, M., and Mantovani, R. (2000). Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 6780-6784.
- 141.** Moldovan, G.L., and D'Andrea, A.D. (2009). How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annual review of genetics* *43*, 223-249.
- 142.** Moore, M.A., Williams, N., and Metcalf, D. (1973). In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: characterization of the colony-forming cells. *Journal of the National Cancer Institute* *50*, 603-623.
- 143.** Mori, R., Yoshida, K., Tanahashi, T., Yawata, K., Kato, J., Okumura, N., Tsutani, Y., Okada, M., Oue, N., and Yasui, W. (2012). Decreased FANCD1 caused by 5FU contributes to the increased sensitivity to oxaliplatin in gastric cancer cells. *Gastric Cancer*.
- 144.** Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annual review of cell and developmental biology* *11*, 35-71.
- 145.** Nakanishi, K., Cavallo, F., Perrouault, L., Giovannangeli, C., Moynahan, M.E., Barchi, M., Brunet, E., and Jasin, M. (2011). Homology-directed Fanconi anemia pathway cross-link repair is dependent on DNA replication. *Nature structural & molecular biology* *18*, 500-503.
- 146.** Nakeff, A., and Daniels-McQueen, S. (1976). In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* *151*, 587-590.
- 147.** Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (New York, NY)* *272*, 263-267.
- 148.** Navarro, S., Meza, N.W., Quintana-Bustamante, O., Casado, J.A., Jacome, A., McAllister, K., Puerto, S., Surrallés, J., Segovia, J.C., and Bueren, J.A. (2006). Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol Ther* *14*, 525-535.
- 149.** Newman, D.J., and Cragg, G.M. (2004). Advanced preclinical and clinical trials of natural products and related compounds from marine sources. *Curr Med Chem* *11*, 1693-1713.
- 150.** Newman, D.J., Cragg, G.M., and Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of natural products* *66*, 1022-1037.
- 151.** Niedernhofer, L.J., Lalai, A.S., and Hoeijmakers, J.H. (2005). Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell* *123*, 1191-1198.
- 152.** Nijman, S.M., Huang, T.T., Dirac, A.M., Brummelkamp, T.R., Kerkhoven, R.M., D'Andrea, A.D., and Bernards, R. (2005). The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Molecular cell* *17*, 331-339.
- 153.** Nishino, T., Wang, C., Mochizuki-Kashio, M., Osawa, M., Nakauchi, H., and Iwama, A. (2011). Ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells by garcinol, a potent inhibitor of histone acetyltransferase. *PLoS one* *6*, e24298.
- 154.** Notta, F., Doulatov, S., and Dick, J.E. (2010). Engraftment of human hematopoietic stem cells is more efficient in female NOD/SCID/IL-2R γ c-null recipients. *Blood* *115*, 3704-3707.
- 155.** Novershtern, N., Subramanian, A., Lawton, L.N., Mak, R.H., Haining, W.N., McConkey, M.E., Habib, N., Yosef, N., Chang, C.Y., Shay, T., *et al.* (2011). Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell* *144*, 296-309.
- 156.** Ocio, E.M., Maiso, P., Chen, X., Garayoa, M., Alvarez-Fernandez, S., San-Segundo, L., Vilanova, D., Lopez-Corral, L., Montero, J.C., Hernandez-Iglesias, T., *et al.* (2009). Zalypsis: a novel marine-derived compound with potent antimyeloma activity that reveals high sensitivity of malignant plasma cells to DNA double-strand breaks. *Blood* *113*, 3781-3791.
- 157.** Oku, N., Matsunaga, S., van Soest, R.W., and Fusetani, N. (2003). Renieramycin J, a highly cytotoxic tetrahydroisoquinoline alkaloid, from a marine sponge *Neopetrosia* sp. *Journal of natural products* *66*, 1136-1139.

- 158.** Oostra, A.B., Nieuwint, A.W., Joenje, H., and de Winter, J.P. (2012). Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia* 2012, 238731.
- 159.** Pace, P., Mosedale, G., Hodskinson, M.R., Rosado, I.V., Sivasubramaniam, M., and Patel, K.J. (2010). Ku70 corrupts DNA repair in the absence of the Fanconi anemia pathway. *Science (New York, NY)* 329, 219-223.
- 160.** Palagyi, A., Neveling, K., Plinninger, U., Ziesch, A., Targosz, B.S., Denk, G.U., Ochs, S., Rizzani, A., Meier, D., Thasler, W.E., *et al.* (2010). Genetic inactivation of the Fanconi anemia gene FANCC identified in the hepatocellular carcinoma cell line HuH-7 confers sensitivity towards DNA-interstrand crosslinking agents. *Molecular cancer* 9, 127.
- 161.** Pandya, S., Boris-Lawrie, K., Leung, N.J., Akkina, R., and Planelles, V. (2001). Development of an Rev-independent, minimal simian immunodeficiency virus-derived vector system. *Human gene therapy* 12, 847-857.
- 162.** Pang, Q., Keeble, W., Christianson, T.A., Faulkner, G.R., and Bagby, G.C. (2001). FANCC interacts with Hsp70 to protect hematopoietic cells from IFN-gamma/TNF-alpha-mediated cytotoxicity. *The EMBO journal* 20, 4478-4489.
- 163.** Parchment, R.E., Huang, M., and Erickson-Miller, C.L. (1993). Roles for in vitro myelotoxicity tests in preclinical drug development and clinical trial planning. *Toxicologic pathology* 21, 241-250.
- 164.** Patel, K.J., and Joenje, H. (2007). Fanconi anemia and DNA replication repair. *DNA repair* 6, 885-890.
- 165.** Pessina, A., Albella, B., Bueren, J., Brantom, P., Casati, S., Gribaldo, L., Croera, C., Gagliardi, G., Foti, P., Parchment, R., *et al.* (2001). Prevalidation of a model for predicting acute neutropenia by colony forming unit granulocyte/macrophage (CFU-GM) assay. *Toxicol In Vitro* 15, 729-740.
- 166.** Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., and Goff, J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science (New York, NY)* 284, 1168-1170.
- 167.** Pike, B.L., and Robinson, W.A. (1970). Human bone marrow colony growth in agar-gel. *Journal of cellular physiology* 76, 77-84.
- 168.** Pirnia, F., Schneider, E., Betticher, D.C., and Borner, M.M. (2002). Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. *Cell death and differentiation* 9, 905-914.
- 169.** Ploemacher, R.E., van der Sluijs, J.P., Voerman, J.S., and Brons, N.H. (1989). An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 74, 2755-2763.
- 170.** Pluznik, D.H., and Sachs, L. (1965). The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *Journal of cellular physiology* 66, 319-324.
- 171.** Pommier, Y., Kohlhagen, G., Bailly, C., Waring, M., Mazumder, A., and Kohn, K.W. (1996). DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry* 35, 13303-13309.
- 172.** Quintana-Bustamante, O., Alvarez-Barrientos, A., Kofman, A.V., Fabregat, I., Bueren, J.A., Theise, N.D., and Segovia, J.C. (2006). Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology (Baltimore, Md)* 43, 108-116.
- 173.** Rahden-Staron, I., Szumilo, M., Grosicka, E., Kraakman van der Zwet, M., and Zdzienicka, M.Z. (2003). Defective Brca2 influences topoisomerase I activity in mammalian cells. *Acta biochimica Polonica* 50, 139-144.
- 174.** Rego, M.A., Kolling, F.W.t., and Howlett, N.G. (2009). The Fanconi anemia protein interaction network: casting a wide net. *Mutation research* 668, 27-41.
- 175.** Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- 176.** Riccardi, A., Meco, D., Ubezio, P., Mazzarella, G., Marabese, M., Faircloth, G.T., Jimeno, J., D'Incalci, M., and Riccardi, R. (2005). Combination of trabectedin and irinotecan is highly effective in a human rhabdomyosarcoma xenograft. *Anti-cancer drugs* 16, 811-815.
- 177.** Richards, F.M., Tape, C.J., Jodrell, D.I., and Murphy, G. (2012). Anti-Tumour Effects of a Specific Anti-ADAM17 Antibody in an Ovarian Cancer Model In Vivo. *PLoS one* 7, e40597.

- 178.** Rinehart, K.L., Jr., Gloer, J.B., Hughes, R.G., Jr., Renis, H.E., McGovren, J.P., Swynenberg, E.B., Stringfellow, D.A., Kuentzel, S.L., and Li, L.H. (1981). Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a caribbean tunicate. *Science (New York, NY)* *212*, 933-935.
- 179.** Rio, P., Segovia, J.C., Hanenberg, H., Casado, J.A., Martinez, J., Gottsche, K., Cheng, N.C., Van de Vrugt, H.J., Arwert, F., Joenje, H., *et al.* (2002). In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice. *Blood* *100*, 2032-2039.
- 180.** Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* *273*, 5858-5868.
- 181.** Rottenberg, S., Jaspers, J.E., Kersbergen, A., van der Burg, E., Nygren, A.O., Zander, S.A., Derksen, P.W., de Bruin, M., Zevenhoven, J., Lau, A., *et al.* (2008). High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 17079-17084.
- 182.** Sachs, L. (1987). The molecular control of blood cell development. *Science (New York, NY)* *238*, 1374-1379.
- 183.** Sakai, W., Swisher, E.M., Karlan, B.Y., Agarwal, M.K., Higgins, J., Friedman, C., Villegas, E., Jacquemont, C., Farrugia, D.J., Couch, F.J., *et al.* (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* *451*, 1116-1120.
- 184.** Samoszuk, M., Tan, J., and Chorn, G. (2005). Clonogenic growth of human breast cancer cells co-cultured in direct contact with serum-activated fibroblasts. *Breast Cancer Res* *7*, R274-283.
- 185.** Scotto, K.W. (2002). ET-743: more than an innovative mechanism of action. *Anti-cancer drugs* *13 Suppl 1*, S3-6.
- 186.** Sekulovic, S., Gylfadottir, V., Vulto, I., Gasparetto, M., Even, Y., Brookes, C., Smith, C., Eaves, C.J., Lansdorp, P.M., Rossi, F.M., *et al.* (2011). Prolonged self-renewal activity unmasks telomerase control of telomere homeostasis and function of mouse hematopoietic stem cells. *Blood* *118*, 1766-1773.
- 187.** Sharan, S.K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D.S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., and Bradley, A. (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* *386*, 804-810.
- 188.** Shepherd, B.E., Guttorp, P., Lansdorp, P.M., and Abkowitz, J.L. (2004). Estimating human hematopoietic stem cell kinetics using granulocyte telomere lengths. *Experimental hematology* *32*, 1040-1050.
- 189.** Simmons, P.J., Levesque, J.P., and Zannettino, A.C. (1997). Adhesion molecules in haemopoiesis. *Bailliere's clinical haematology* *10*, 485-505.
- 190.** Smogorzewska, A., Desetty, R., Saito, T.T., Schlabach, M., Lach, F.P., Sowa, M.E., Clark, A.B., Kunkel, T.A., Harper, J.W., Colaiacovo, M.P., *et al.* (2010). A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair. *Molecular cell* *39*, 36-47.
- 191.** Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Ballif, B.A., Gygi, S.P., Hofmann, K., D'Andrea, A.D., *et al.* (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell* *129*, 289-301.
- 192.** Snyder, E.R., Ricker, J.L., Chen, Z., and Waes, C.V. (2007). Variation in cisplatin sensitivity is not associated with Fanconi Anemia/BRCA pathway inactivation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer letters* *245*, 75-80.
- 193.** Snyder, R.C., Ray, R., Blume, S., and Miller, D.M. (1991). Mithramycin blocks transcriptional initiation of the c-myc P1 and P2 promoters. *Biochemistry* *30*, 4290-4297.
- 194.** Soares, D.G., Escargueil, A.E., Poindessous, V., Sarasin, A., de Gramont, A., Bonatto, D., Henriques, J.A., and Larsen, A.K. (2007). Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 13062-13067.
- 195.** Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science (New York, NY)* *241*, 58-62.
- 196.** Stratton, M.R. (2011). Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science (New York, NY)* *331*, 1553-1558.
- 197.** Stuart, D., and Sellers, W.R. (2009). Linking somatic genetic alterations in cancer to therapeutics. *Current opinion in cell biology* *21*, 304-310.

- 198.** Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Ishikawa, E., and Mitsuhashi, J. (2005). Breast cancer resistance protein: molecular target for anticancer drug resistance and pharmacokinetics/pharmacodynamics. *Cancer science* *96*, 457-465.
- 199.** Sutherland, H.J., Eaves, C.J., Eaves, A.C., Dragowska, W., and Lansdorp, P.M. (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* *74*, 1563-1570.
- 200.** Sylvester, R.J., Oosterlinck, W., and van der Meijden, A.P. (2004). A single immediate postoperative instillation of chemotherapy decreases the risk of recurrence in patients with stage Ta T1 bladder cancer: a meta-analysis of published results of randomized clinical trials. *The Journal of urology* *171*, 2186-2190, quiz 2435.
- 201.** Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M.O., Trono, D., and Aebischer, P. (2006). A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nature methods* *3*, 109-116.
- 202.** Takahashi, N., Li, W., Banerjee, D., Guan, Y., Wada-Takahashi, Y., Brennan, M.F., Chou, T.C., Scotto, K.W., and Bertino, J.R. (2002). Sequence-dependent synergistic cytotoxicity of ecteinascidin-743 and paclitaxel in human breast cancer cell lines in vitro and in vivo. *Cancer research* *62*, 6909-6915.
- 203.** Takebayashi, Y., Pourquier, P., Zimonjic, D.B., Nakayama, K., Emmert, S., Ueda, T., Urasaki, Y., Kanzaki, A., Akiyama, S.I., Popescu, N., *et al.* (2001). Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature medicine* *7*, 961-966.
- 204.** Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Xu, B., Andreassen, P.R., Gregory, R.C., Kim, S.T., Lane, W.S., Kastan, M.B., and D'Andrea, A.D. (2002). Convergence of the fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell* *109*, 459-472.
- 205.** Taniguchi, T., Tischkowitz, M., Ameziane, N., Hodgson, S.V., Mathew, C.G., Joenje, H., Mok, S.C., and D'Andrea, A.D. (2003). Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nature medicine* *9*, 568-574.
- 206.** Tavecchio, M., Simone, M., Erba, E., Chiolo, I., Liberi, G., Foiani, M., D'Incalci, M., and Damia, G. (2008). Role of homologous recombination in trabectedin-induced DNA damage. *Eur J Cancer* *44*, 609-618.
- 207.** Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., and Scott, E.W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* *416*, 542-545.
- 208.** Theise, N.D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J.M., and Krause, D.S. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* (Baltimore, Md) *31*, 235-240.
- 209.** Theise, N.D., Krause, D.S., and Sharkis, S. (2003). Comment on "Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells". *Science* (New York, NY) *299*, 1317; author reply 1317.
- 210.** Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. *Radiation research* *175*, 145-149.
- 211.** Treszezamsky, A.D., Kachnic, L.A., Feng, Z., Zhang, J., Tokadjian, C., and Powell, S.N. (2007). BRCA1- and BRCA2-deficient cells are sensitive to etoposide-induced DNA double-strand breaks via topoisomerase II. *Cancer research* *67*, 7078-7081.
- 212.** Tutt, A., Bertwistle, D., Valentine, J., Gabriel, A., Swift, S., Ross, G., Griffin, C., Thacker, J., and Ashworth, A. (2001). Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. *The EMBO journal* *20*, 4704-4716.
- 213.** Vadnais, C., Davoudi, S., Afshin, M., Harada, R., Dudley, R., Clermont, P.L., Drobetsky, E., and Nepveu, A. (2012). CUX1 transcription factor is required for optimal ATM/ATR-mediated responses to DNA damage. *Nucleic acids research* *40*, 4483-4495.
- 214.** Valeri, A., Alonso-Ferrero, M.E., Cerrato, L., Martinez, S., Bueren, J.A., and Albella, B. (2010). Development of an in vitro model for the simultaneous study of the efficacy and hematotoxicity of antileukemic compounds. *Toxicology letters* *199*, 317-322.
- 215.** Valeri, A., Martinez, S., Casado, J.A., and Bueren, J.A. (2011). Fanconi anaemia: from a monogenic disease to sporadic cancer. *Clin Transl Oncol* *13*, 215-221.
- 216.** van der Heijden, A.G., Jansen, C.F., Verhaegh, G., O'Donnell M, A., Schalken, J.A., and Witjes, J.A. (2004b). The effect of hyperthermia on mitomycin-C induced cytotoxicity in four human bladder cancer cell lines. *European urology* *46*, 670-674.

- 217.** van der Heijden, M.S., Brody, J.R., Gallmeier, E., Cunningham, S.C., Dezentje, D.A., Shen, D., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (2004a). Functional defects in the fanconi anemia pathway in pancreatic cancer cells. *The American journal of pathology* *165*, 651-657.
- 218.** van Zeeburg, H.J., Snijders, P.J., Pals, G., Hermsen, M.A., Rooimans, M.A., Bagby, G., Soulier, J., Gluckman, E., Wennerberg, J., Leemans, C.R., *et al.* (2005). Generation and molecular characterization of head and neck squamous cell lines of fanconi anemia patients. *Cancer research* *65*, 1271-1276.
- 219.** Vassilopoulos, G., Wang, P.R., and Russell, D.W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* *422*, 901-904.
- 220.** Ventura Ferreira, M.S., Jahnen-Dechent, W., Labude, N., Bovi, M., Hieronymus, T., Zenke, M., Schneider, R.K., and Neurs, S. (2012). Cord blood-hematopoietic stem cell expansion in 3D fibrin scaffolds with stromal support. *Biomaterials* *33*, 6987-6997.
- 221.** Verhoeyen, E., and Cosset, F.L. (2004). Surface-engineering of lentiviral vectors. *The journal of gene medicine* *6 Suppl 1*, S83-94.
- 222.** Vidal, A., Munoz, C., Guillen, M.J., Moreto, J., Sara, P., Martinez-Iniesta, M., Figueras, A., Padulles, L., Garcia-Rodriguez, F.J., Berdiel-Acer, M., *et al.* (2012). Lurbinectedin (PM01183), a New DNA Minor Groove Binder, Inhibits Growth of Orthotopic Primary Graft of Cisplatin-Resistant Epithelial Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res.*
- 223.** Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science (New York, NY)* *297*, 2256-2259.
- 224.** Wang, J.C., Doedens, M., and Dick, J.E. (1997). Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood* *89*, 3919-3924.
- 225.** Wang, L.C., and Gautier, J. (2010). The Fanconi anemia pathway and ICL repair: implications for cancer therapy. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* *45*, 424-439.
- 226.** Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S., and Grompe, M. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* *422*, 897-901.
- 227.** Welch, J.J., Rauscher, F.J., 3rd, and Beerman, T.A. (1994). Targeting DNA-binding drugs to sequence-specific transcription factor-DNA complexes. Differential effects of intercalating and minor groove binding drugs. *The Journal of biological chemistry* *269*, 31051-31058.
- 228.** Williams, G. (1992). Comments on Miaskowski *et al.*, *Pain* *49* (1992) 137-144. *Pain* *51*, 383-387.
- 229.** Winters, W.D., Tuan, A.L., and Morton, D.L. (1974). Differential effects of rifampicin on cultured human tumor cells. *Cancer research* *34*, 3173-3179.
- 230.** Xia, B., Dorsman, J.C., Ameziane, N., de Vries, Y., Rooimans, M.A., Sheng, Q., Pals, G., Errami, A., Gluckman, E., Llera, J., *et al.* (2007). Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nature genetics* *39*, 159-161.
- 231.** Yap, T.A., Cortes-Funes, H., Shaw, H., Rodriguez, R., Olmos, D., Lal, R., Fong, P.C., Tan, D.S., Harris, D., Capdevila, J., *et al.* (2012). First-in-man phase I trial of two schedules of the novel synthetic tetrahydroisoquinoline alkaloid PM00104 (Zalypsis) in patients with advanced solid tumours. *British journal of cancer* *106*, 1379-1385.
- 232.** Yarde, D.N., Oliveira, V., Mathews, L., Wang, X., Villagra, A., Boulware, D., Shain, K.H., Hazlehurst, L.A., Alsina, M., Chen, D.T., *et al.* (2009). Targeting the Fanconi anemia/BRCA pathway circumvents drug resistance in multiple myeloma. *Cancer research* *69*, 9367-9375.
- 233.** Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P., and Smith, A.G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* *416*, 545-548.
- 234.** Zewail-Foote, M., and Hurley, L.H. (1999). Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. *Journal of medicinal chemistry* *42*, 2493-2497.
- 235.** Zhang, J., Zhao, D., Park, H.K., Wang, H., Dyer, R.B., Liu, W., Klee, G.G., McNiven, M.A., Tindall, D.J., Molina, J.R., *et al.* (2010). FAVL elevation in human tumors disrupts Fanconi anemia pathway signaling and promotes genomic instability and tumor growth. *The Journal of clinical investigation* *120*, 1524-1534.

236. Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of virology* 72, 9873-9880.

¹<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/OSU-09100>

²<http://www.zeltia.es/media/docs/ruretyid.pdf>

³<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01426633?term=yondelis&rank=10>

⁴<http://www.cancerrxgene.org/>

⁵<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM236669.pdf>.

