



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Grup d'inestabilitat genòmica i reparació del DNA

RECERCA TERAPÈUTICA EN L'ANÈMIA DE FANCONI

TESI DOCTORAL

Helena Montanuy Escribano

Setembre, 2017



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Grup d'instabilitat genòmica i reparació del DNA

RECERCA TERAPÈUTICA EN L'ANÈMIA DE FANCONI

Memòria presentada per

HELENA MONTANUY ESCRIBANO

En el marc del programa d'Estudis de Doctorat en GENÈTICA realitzat a la Universitat Autònoma de Barcelona per optar al Grau de Doctora amb la Menció de Doctorat Internacional.

El Director i Tutor de
Tesi,

Dr. Jordi Surrallés
Calonge
Catedràtic de Genètica

El Director de Tesi,

Dr. Jordi Minguillón
Pedreño
Doctor en Ciències de
la Salut i de la Vida

L'autora,

Helena Montanuy
Escribano

*Als meus pares, per confiar plenament en mi i
fomentar la meva curiositat i motivació per aprendre.*

*Al Joan, per ensenyar-me a estimar intensament
i compartir els meus somnis.*

“No ens adonem mai del que hem fet, només del que ens queda per fer.”

Marie Curie

Agraïments

M'agradaria agrair aquest treball especialment als meus directors de tesi Jordi Surrallés i Jordi Minguillón, per donar-me l'oportunitat de formar part d'aquest grup de recerca, per fer-me viure la ciència més bàsica amb motivació i il·lusió i al mateix moment poder veure la cara més humana estan a prop dels pacients i les seves famílies. També, a la Maria José Ramírez, per tota l'ajuda i suport incondicional sempre amb un somriure als llavis. Al Thomas Helleday i científics del *Science for Life Laboratory* per obrir-me les portes del seu centre i permetre que utilitzéssim la plataforma de cribatges de fàrmacs per intentar curar una malaltia rara com es l'anèmia de Fanconi, especialment al Jordi Carreras per coordinar tot el projecte i per tot l'esforç que hi va dedicar. Al Juan Bueren, José Antonio Casado i Paula Río del CIEMAT i al Diego Arango i l'Àgueda Martínez de Vall d'Hebron per l'esforç i temps invertit en els estudis *in vivo*. També a la Victòria Moiseeva, Xabier Vergara, Pilar Bustamante, Llorenç Rovirosa i Cristina Camps per ajudar a desenvolupar aquest projecte. A la resta del grup pel suport durant aquests anys i als tècnics Glòria, Lourdes, Cristian i Montse per ser imprescindibles al laboratori. Després de 5 anys, m'enduc molt bones amistats, sobretot la de les "Mutas", de les que hem compartit moltes hores de feina però també hem sabut celebrar de la millor de les maneres els nostres petits triomfs. Espero seguir gaudint de la vostra amistat durant molts anys!

Al Joan, a tota la meva família i als meus amics per les bones estones i perquè em feu feliç!

Moltes gràcies a tots!!!

Abreviatures

α-LA	<i>α-Lipoic acid</i> ; Àcid α -lipoic
5HT1B	<i>5-hydroxytryptamine receptor 1B</i> ; Receptor de la 5-hidroxitriptamina 1B
AC50	<i>Half-maximal activity concentration</i> ; Concentració mitjana de màxima activitat
ADH	<i>Alcohol dehydrogenase</i> ; Alcohol deshidrogenasa
ALDH	<i>Aldehyde dehydrogenase</i> ; Aldehid deshidrogenasa
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i> ; Cinasa de limfoma anaplàsic
ALL	<i>Acute lymphoblastic leukemia</i> ; Leucèmia limfoblàstica aguda
AML	<i>Acute myeloid leukemia</i> ; Leucèmia mieloide aguda
APS	<i>Ammonium persulfate</i> ; Persulfat amònic
ATG	<i>Anti-thymocyte globulin</i> ; Globulina antitimòcit
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia mutated</i> ; Atàxia telangiectàsia mutada
ATP	<i>Adenosine 5'-triphosphate</i> ; Adenosina 5'-trifosfat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i> ; Proteïna relacionada amb atàxia telangiectàsia i Rad3
BBS	<i>Bicarbonate-buffered saline solution</i> ; Solució salina tamponada amb bicarbonat
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> ; Àcid bicinconínic
BLA	<i>Biologics license applications</i> ; Llicències per productes biològics
BRCA	<i>Breast cancer</i> ; Càncer de mama
BRIP1	<i>BRCA1-interacting protein 1</i> ; Proteïna d'interacció 1 amb BRCA1
cAMP	<i>Cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate</i> ; 3', 5'-adenosinmonofosfat cíclic
CAT	<i>Antitumoral candidate</i> ; Candidat Antitumoral
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i> ; Cinases dependents de ciclins
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> ; Àcid desoxiribonucleic complementari
CFU-GM	<i>Colony forming unit-granulocyte/macrophage</i> ; Unitats formadores de colònies de granulòcits/macròfags
CHK1	<i>Checkpoint kinase 1</i> ; Cinasa de punt de control 1
CIEMAT	<i>Center for Research in Energy, Environment and Technology</i> ; Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas

CML	<i>Chronic myeloid leukemia</i> ; Leucèmia mieloide crònica
CO2	<i>Carbon dioxide</i> ; Diòxid de carboni
Complex ID	<i>FANCD2/FANCI complex</i> ; Complex FANCD2/FANCI
CRD	<i>Redox candidate</i> ; Candidat Redox
CXCR	<i>Chemokine receptor type 4</i> ; Receptor de quimiocines tipus 4
D2R	<i>Dopamine receptor D2</i> ; Receptor de dopamina D2
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> ; 4',6-diaminodino-2-fenilindol
DEB	<i>Diepoxybutane</i> ; Diepoxibutà
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> ; Medi de cultiu Eagle modificat de Dulbecco
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> ; Dimetil Sulfòxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Àcid desoxiribonucleic
DSB	<i>Double-strand break</i> ; Trencaments de doble cadena
EC50	<i>Half maximal effective concentration individually</i> ; Concentració mitjana màxima efectiva individualment
ED50	<i>Half maximal effective concentration of a population</i> ; Concentració mitjana màxima efectiva en una població
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; Àcid etilendiaminotetraacètic
EEUU	<i>United States</i> ; Estats Units
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> ; Receptor del factor de creixement epidèrmic
EMA	<i>Ethidium monoazide bromide</i> ; Bromur d'etidi monoazida
EPH	<i>Ephrin receptor</i> ; Receptor efrin
EU	<i>European Union</i> ; Unió Europea
FA/BRCA	<i>Fanconi anemia / breast cancer</i> ; Anèmia de Fanconi / càncer de mama
FAAP	<i>Focal adhesion-associated protein</i> ; Proteïna associada amb l'adhesió focal
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> ; Cinasa d'adhesió focal
FANCD2-Ub	<i>Ubiquitinated FANCD2</i> ; FANCD2 ubiquitinada
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> ; Sèrum fetal boví
FCM	<i>Flow Cytometric Micronucleus Assay</i> ; Assaig de micronuclis per citometria de flux
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ; Administració de medicaments i aliments
FSC	<i>Forward scatter</i> ; Dispersió frontal
G2/M	<i>G2/M phase cell cycle arrest</i> ; Bloqueig del cicle cel·lular en fase G2/M

G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> ; Factor estimador de colònies de granulòcits
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> ; Proteïna fluorescent verda
GSH	<i>Glutathione</i> ; Glutatió
HCl	<i>Hydrochloric acid</i> ; Àcid clorhídric
HCS	<i>High-content screenings</i> ; Cribatges d'alt contingut
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> ; Antigen leucocitari humà
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i> ; Carcinomes de cèl·lules escamoses de coll i cap
HPC	<i>Hematopoietic progenitor cells</i> ; Cèl·lules progenitores hematopoètiques
HR	<i>Homologous recombination</i> ; Recombinació homòloga
HSC	<i>Hematopoietic stem cells</i> ; Cèl·lules mare hematopoètiques
HSPC	<i>Hematopoietic stem and progenitor cells</i> ; Cèl·lules mare i precursors hematopoètiques
HTS	<i>High-throughput screenings</i> ; Cribatges d'alt rendiment
HU	<i>Hydroxyurea</i> ; Hidroxiurea
IBB	<i>Institute of Biotechnology and Biomedicine</i> ; Institut de Biotecnologia i Biomedicina
IC50	<i>Half-maximal inhibitory concentration</i> ; Concentració mitjana màxima inhibidora
ICL	<i>Interstrand crosslink</i> ; Enllaç creuat entre cadenes
IFAR	<i>International Fanconi Anemia Registry</i> ; Registre Internacional d'Anèmia de Fanconi
IFN-γ	<i>Interferon gamma</i> ; Interferó gamma
IL	<i>Interleukin 6</i> ; Interleucina
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i> ; Cèl·lules mare totipotents induïdes
IRDiRC	<i>International Rare Diseases Research Consortium</i> ; Consorci Internacional de la Recerca en Malalties Rares
JAK	<i>Janus kinase</i> ; Cinasa Janus
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> ; Cinasa c-Jun N-terminal
Kd	<i>Dissociation constant</i> ; Constant de dissociació
Ki	<i>Inhibitory constant</i> ; Constant d'inhibició
LFA	<i>Lymphoblastoid cell line</i> ; Línia cel·lular limfoblastoid
MAO-A	<i>Monoamine oxidase A</i> ; Monoaminoxidasa A
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> ; Proteïna cinasa activada per

	mitògens
MDS	<i>Myelodysplastic syndrome</i> ; Síndrome mielodisplàstica
MHF	<i>FANCM-associated factors</i> ; Factors associats a FANCM
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> ; Amplificació múltiple depenent de lligació
MMC	<i>Mitomycin C</i> ; Mitomicina C
MN	<i>Micronucleus</i> ; Micronuclis
NAC	<i>N-Acetyl cysteine</i> ; N-acetilcisteïna
NaCl	<i>Sodium chloride</i> ; Clorur de sodi
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> ; Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat (forma reduïda)
NAHCO3	<i>Sodium bicarbonate</i> ; Bicarbonat de sodi
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome protein 1</i> ; Proteïna causant del síndrome 1
NER	<i>Nucleotide excision repair</i> ; Escissió de nucleòtids
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> ; Factor nuclear potenciador de les cadenes lleugeres kappa de les cèl·lules B activades
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i> ; Unió d'extremes no homòlegs
NME	<i>New molecular entities</i> ; Noves entitats moleculars
NON/SCID	<i>Nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice</i> ; Ratolí obès no diabètic / immunodeficiència severa
ORF	<i>Open reading frame</i> ; Marc de lectura obert
PALB2	<i>Partner And Localizer Of BRCA2</i> ; Soci i localitzador de BRCA2
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i> ; Tampó fosfat salí
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> ; Antigen nuclear de cèl·lules en proliferació
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Reacció en cadena de la polimerasa
PDGFβ	<i>Platelet-derived growth factor subunit B</i> ; Subunitat B del factor de creixement derivat de plaquetes
PFA	<i>Paraformaldehyde</i> ; Paraformaldehid
PI	<i>Propidium iodide</i> ; Iodur de propidi
PKA	<i>Protein kinase A</i> ; Proteïna cinasa A
PKC	<i>Protein kinase C</i> ; Proteïna cinasa C
RFP	<i>Red fluorescent protein</i> ; Proteïna fluorescent vermella
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Àcid ribonucleic

ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; Espècies reactives d'oxigen
RPA	<i>Replication protein A</i> ; Proteïna de replicació A
RPM	<i>Revolutions per minute</i> ; Revolucions per minut
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> ; Medi de cultiu Roswell Park Memorial Institute
RTK	<i>Receptor tyrosine kinase</i> ; Receptor tirosina cinasa
S1PR	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor</i> ; Receptor de la esfingosina-1-fosfat
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> ; Dodecilsulfat sòdic
SEM	<i>Standard error</i> ; Error estàndard
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i> ; Sirtuina 1
SOD	<i>Superoxide dismutase</i> ; Superòxid dismutasa
SRB	<i>Sulforhodamine B</i> ; Sulforodamina B
SSC	<i>Side scatter</i> ; Dispersió lateral
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i> ; DNA de cadena senzilla
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> ; Tampó salí Tris
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> ; Àcid tricloracètic
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i> ; Tetrametiletilediamina
TLR	<i>Toll like receptor</i> ; Receptor Toll-like
TLS	<i>Translesion synthesis</i> ; Síntesi de translesió del DNA
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> ; Factor de necrosi tumoral alfa
TRF	<i>Terminal restriction fragment</i> ; Fragment de restricció terminal
TRP53	<i>Transformation related protein 53</i> ; Proteïna relacionada amb la transformació 53
UAB	<i>Autonomous University of Barcelona</i> ; Universitat Autònoma de Barcelona
UAF	<i>Upstream activation factor</i> ; Factor d'activació d'aigües amunt
UBE2T	<i>Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 T</i> ; Enzim conjugador d'ubiquitina E2 T
USP1	<i>Ubiquitin specific peptidase 1</i> ; Peptidasa específica d'ubiquitina 1
VACTERL	<i>Vertebral defects, anal atresia, tracheoesophageal fistula with esophageal atresia, cardiac defects, renal and limb anomalies</i> ; Anomalies vertebrals, atrèsia anal, fístula tràqueoesofàgica amb atrèsia de l'esòfag, anormalitats cardíacques i anomalies renals
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> ; Factor de creixement endotelial vascular
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> ; Receptor del factor de

	creixement endotelial vascular
WB	<i>Western blot</i> ; Western blot
WES	<i>Whole-exome sequencing</i> ; Seqüenciació de l'exoma
WGS	<i>Whole-genome sequencing</i> ; Seqüenciació del genoma
WT	<i>Wild-type</i> ; Salvatge
XC50	<i>Half-maximal biochemical effective concentration</i> ; Concentració mitjana màxima efectiva bioquímicament
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum group F</i> ; Xerodèrmia pigmentosa grup F
XRCC	<i>X-ray repair cross-complementing</i> ; Reparació de raigs X per complementació creuada
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i> ; Proteïna fluorescent groga

Abstract

Much effort is being made on Fanconi anemia therapeutics to treat bone marrow failure and cancer, the most life threatening signs of the disease. There are also studies searching for prevention, with chronic treatment proposals. As mortality rate by bone marrow failure has been dramatically reduced in the last years, thanks to improved hematopoietic stem cell transplantation protocols, and with the promise of new approaches such as gene therapy, the next step in the horizon of Fanconi anemia treatment may be focused on malignancies. Patients have very low survival rate after solid tumors appear, and no effective therapy currently exists beyond surgical resection. That is the reason why we developed two drug screening assays to measure different Fanconi biomarkers with the purpose of finding new drugs that ameliorate or cure the Fanconi anemia disorder and could be investigated in preclinical studies as a new therapy. We adapted the flow cytometric *in vitro* micronucleus test to screen drugs for their ability to reduce chromosome fragility and cell cycle arrest in FANCA-deficient cells. Screening of 10 candidate drugs based on literature search and a redox library of 84 antioxidants/antiinflammatory compounds identified several drugs that consistently restored chromosome fragility and G2/M cell cycle arrest in lymphoblast cell lines from 3 independent FANCA-deficient patients. We selected two drugs, CRD3 and CRD8, widely used in clinics, to test in Fanca-deficient mice *in vivo*. One year later 60 % of placebo-treated mice died. Only 20 % mice of CRD3 treated group were sacrificed due to excess weight loss while all CRD8 treated mice were alive and healthy at the end of the experiment. In a second assay, we set up a cell system based on FANCD2-Ub foci detection in FANCA-deficient cells and we screened 3802 drugs, which included all FDA-approved, kinase inhibitors and chemical diversity compounds in search of a drug to cure Fanconi anemia by re-activating the FA/BRCA pathway. We selected 7 hits and none of them could be validated on phenotypic assays. Taking advantage of this screening, we searched for drugs that killed cells by a non-genotoxic mode of action. Selected drugs were tested in Fanconi anemia patient-derived head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) cell lines and primary fibroblasts. Two potential drugs, CAT2 and CAT29, were especially relevant as they are highly selective for cancer cells. They are already approved for cancer treatment and their mechanism of action does not involve DNA damage. Neither CAT2 nor CAT29 induced chromosome fragility in FANCA-deficient lymphoblastoid cell line or activate FANCD2 ubiquitination suggesting that the Fanconi anemia pathway is not involved in the cellular response to these drugs. *In vivo* experiments of tumor xenografts in mice showed that CAT2 and CAT29 inhibited the growth of HNSCC Fanconi VU1131-T2.8 in a highly significant

manner. Given the results presented in this PhD thesis, we propose to continue the preclinical studies in order to finally repurpose CRD3 and CRD8 to treat Fanconi anemia and CAT2 and CAT29 to treat Fanconi HNSCC.

Resum

S'estan dedicant molts esforços en trobar una teràpia eficient pel tractament de les principals complicacions en l'anèmia de Fanconi, la fallada del moll de l'os i el càncer. També, hi ha estudis que es centren en la recerca de tractaments crònics per la prevenció de la malaltia. La taxa de mortalitat per la fallada del moll de l'os s'ha reduït dràsticament en els últims anys gràcies a la millora dels protocols de trasplantament de progenitors hematopoètics i també pels nous enfocaments en la recerca, com per exemple la teràpia gènica. No obstant, els pacients tenen una taxa de supervivència molt reduïda després del diagnòstic dels tumors sòlids i no existeix actualment una teràpia efectiva a banda de la resecció quirúrgica. Així doncs, el següent gran repte a abordar és el tractament de les malignitats. En aquest estudi vam desenvolupar dos assajos de cribatge de fàrmacs per mesurar diferents marcadors Fanconi amb la finalitat de trobar compostos que puguin millorar o curar la malaltia de l'anèmia de Fanconi i puguin ser investigats en estudis preclínics com a una nova teràpia. Vam adaptar el test de micronuclis *in vitro* utilitzant la citometria de flux per tal d'estudiar quins compostos reduïen la fragilitat cromosòmica i la parada del cicle cel·lular en fase G2/M de les cèl·lules Fanconi. Es va realitzar un cribatge de 10 fàrmacs candidats basats en la recerca de literatura i una biblioteca amb 84 compostos antioxidants o antiinflamatoris i es van identificar diferents fàrmacs que reduïen la fragilitat cromosòmica i la parada del cicle cel·lular en línies limfoblastoids deficients per FANCA. Vam seleccionar dos compostos, el CRD3 i CRD8, àmpliament utilitzats en la clínica, per estudiar en un model de ratolí deficient per Fanca. Un any després, el 60 % dels ratolins tractats amb placebo van morir. En canvi, només el 20 % dels ratolins del grup de tractament del CRD3 van ser sacrificats per pèrdua excessiva de pes i tots els ratolins del grup del CRD8 estaven vius i sans al final de l'experiment. En el segon assaig, vam posar a punt un sistema cel·lular basat en la formació de *foci* de la proteïna FANCD2-Ub en cèl·lules deficients per FANCA i vam realitzar un cribatge de 3802 fàrmacs, incloent tots els compostos aprovats per la FDA, inhibidors de cinases i compostos de diferent diversitat química per tal de trobar un fàrmac que pogués curar l'anèmia de Fanconi reactivant la ruta FA/BRCA. Es van seleccionar 7 compostos candidats però cap d'ells va poder ser validat en assajos fenotípics. Aprofitant que es va dur a terme aquest cribatge, vam buscar compostos que inhibissin el creixement cel·lular amb un mecanisme d'acció no genotòxic. Els fàrmacs seleccionats es van estudiar en línies cel·lulars de carcinoma escamós (HNSCC) derivades de pacients Fanconi i en fibroblasts primaris. Els fàrmacs CAT2 i CAT29 van ser especialment rellevants ja que van ser altament selectius per les cèl·lules canceroses. Aquests

fàrmacs estan aprovats pel tractament del càncer i el seu mecanisme d'acció no implica el dany en el DNA. Cap dels dos compostos tampoc va induir la fragilitat cromosòmica en una línia limfoblastoid deficient per FANCA i no van activar la monoubiquitinació de la proteïna FANCD2, suggerint que la ruta FA/BRCA no està implicada en la resposta cel·lular a aquests fàrmacs. Els experiments *in vivo* de xenoempelts tumorals en ratolins van demostrar que el CAT2 i CAT29 van inhibir el creixement de la línia de HNSCC Fanconi VU1131-T2.8 d'una manera molt significativa. Donats els resultats presentats en aquesta tesi doctoral, proposem continuar els estudis preclínics per tal de reposicionar el CDR3 i CDR8 per tractar l'anèmia de Fanconi i el CAT2 i CAT29 per tractar els HNSCC Fanconi.

Taula de continguts

Taula de continguts

1. Introducció	1
1.1. Generalitats sobre l'anèmia de Fanconi	1
1.2. Prevalença	3
1.3. Aspectes clínics de la malaltia	3
1.3.1. Malformacions congènites	3
1.3.2. Disfuncions i malignitats hematològiques	5
1.3.3. Susceptibilitat a desenvolupar tumors sòlids.....	6
1.3.4. Endocrinopatologies	8
1.4. Biologia molecular de la ruta FA/BRCA.....	8
1.4.1. Fase prèvia a l'activació del complex ID	10
1.4.2. Activació del complex ID.....	11
1.4.3. Fase posterior a l'activació del complex ID	12
1.5. Fenotip de les cèl·lules Fanconi	15
1.5.1. Fragilitat cromosòmica.....	15
1.5.2. Hipersensibilitat als agents inductors d'enllaços creuats entre cadena.....	16
1.5.3. Alteracions del cicle cel·lular.....	17
1.5.4. Sensibilitat a fonts de dany endogen, el dany oxidatiu i els aldehids	18
1.5.5. Manca de monoubiquitinació de FANCD2	20
1.5.6. Disfunció telomèrica	21
1.6. Diagnòstic.....	21
1.6.1. Mosaïcisme per reversió somàtica.....	23
1.7. Teràpies dels pacients amb anèmia de Fanconi	24
1.7.1. Trasplantament de progenitors hematopoètics	24
1.7.2. Teràpia d'andrògens.....	25
1.7.3. Tumors sòlids	27
1.7.4. Teràpies sota investigació	29
1.7.4.1. Teràpia gènica de cèl·lules mare hematopoètiques	29
1.7.4.2. Teràpia amb compostos antioxidants o antiinflamatoris	31
1.7.4.3. Teràpies antitumorals.....	35
1.8. Mètodes de detecció de fragilitat cromosòmica.....	37
1.8.1. Cromosomes metafàsics	38

1.8.2.	Test de micronuclis.....	38
	1.8.2.1. Mètode clàssic	39
	1.8.2.2. Citometria de flux	39
1.9.	Cribatges de fàrmacs	40
	1.9.1. Cribatges d'alt contingut en models cel·lulars	42
	1.9.2. Cribatges de compostos en l'anèmia de Fanconi.....	43
2.	Objectius	46
3.	Materials i mètodes	47
	3.1. Reactius i compostos	47
	3.2. Línies cel·lulars i cultiu	48
	3.3. Assaig de micronuclis per citometria de flux.....	49
	3.4. Assaig de supervivència cel·lular	52
	3.4.1. Comptador Beckman-Coulter.....	52
	3.4.2. Assaig de sulforodamina en plaques de 96 pous	52
	3.5. Assaig de <i>Western blot</i>	53
	3.6. Anàlisi de la localització de FANCD2 al lloc del dany	55
	3.6.1. Observació de <i>foci</i> nuclears de YFP-FANCD2 al lloc del dany per microscopia	55
	3.6.2. Observació de <i>foci</i> nuclears de FANCD2 endògena al lloc del dany per immunofluorescència	55
	3.7. Cribatge de fàrmacs per millorar el fenotip Fanconi	56
	3.7.1. Validació de la tècnica adaptada a plaques de 96 pous utilitzant fàrmacs ja descrits en la literatura com a compostos amb efectes beneficiosos per les cèl·lules Fanconi.....	56
	3.7.2. Cribatge d'una biblioteca de compostos redox.....	56
	3.7.3. Anàlisi estadístic	57
	3.8. Estudi <i>in vivo</i> en model de ratolí <i>Fanca^{-/-}</i> tractat amb fàrmacs candidats	58
	3.9. Algoritmes <i>in silico</i> per predir els mecanismes d'acció comuns dels fàrmacs candidats CRD3 i CRD8	59
	3.10. Sistema cel·lular de detecció de <i>foci</i> de FANCD2 per microscopia de fluorescència.....	60
	3.10.1. Generació de la línia cel·lular U2OS <i>FANCA^{-/-}</i>	60
	3.10.2. U2OS <i>FANCA^{-/-}</i> estables per YFP-FANCD2	62
	3.11. Cribatge d'alt contingut per reactivar la ruta FA/BRCA.....	63

3.11.1.	Transferència dels compostos a les plaques, plaqueig i fixació de les cèl·lules per l'obtenció de les imatges	63
3.11.2.	Obtenció d'imatges per microscopia	65
3.11.3.	Validació dels fàrmacs candidats reactivadors de la ruta FA/BRCA.....	67
3.12.	Cribatge d'alt contingut per trobar fàrmacs antitumorals pel tractament dels carcinomes de cèl·lules escamoses de cap i coll Fanconi	67
3.12.1.	Primera validació dels compostos antitumorals del cribatge	68
3.12.2.	Segona validació dels compostos antitumorals del cribatge	69
3.13.	Estudi <i>in vivo</i> dels fàrmacs CAT2 i CAT29 en la disminució del volum de xenoempelts tumorals Fanconi injectats en el llom de ratolí.....	70
4.	Resultats	71
4.1.	Validació de l'assaig de micronuclis per citometria de flux en les cèl·lules Fanconi.....	72
4.2.	Efecte dels fàrmacs ja descrits en la literatura com a compostos beneficiosos en les cèl·lules Fanconi i cribatge d'una biblioteca redox.	73
4.3.	Estudi <i>in vivo</i> en model de ratolí <i>Fanca^{-/-}</i> amb els fàrmacs candidats... ..	77
4.3.1.	Anàlisi de marcadors de fragilitat <i>in vivo</i> en sang de ratolí.....	77
4.3.2.	Supervivència i seguiment dels ratolins <i>Fanca^{-/-}</i> amb els compostos CRD3 i CRD8	80
4.4.	Algoritmes <i>in silico</i> per predir els mecanismes d'acció comuns dels fàrmacs candidats CRD3 i CRD8	82
4.5.	Cribatge d'alt contingut per recuperar la deficiència de la proteïna FANCA.....	84
4.5.1.	Generació de la línia cel·lular U2OS <i>FANCA^{-/-}</i> amb expressió estable de la proteïna fluorescent YFP-FANCD2.....	84
4.5.1.1.	Producció de la línia U2OS <i>FANCA^{-/-}</i> amb la tecnologia TALEN	85
4.5.1.2.	Seqüenciació de FANCA dels clons obtinguts.....	85
4.5.1.3.	Anàlisi de la viabilitat cel·lular dels clons obtinguts.....	86
4.5.1.4.	Obtenció de la línia U2OS <i>FANCA^{-/-}</i> estable per l'expressió de YFP-FANCD2.....	87
4.5.1.5.	Observació de <i>foci</i> nuclears per microscopia confocal	88
4.5.2.	Cribatge d'alt contingut per reactivar la ruta FA/BRCA	89
4.5.3.	Validació dels fàrmacs candidats reactivadors de la ruta FA/BRCA.....	94

4.5.3.1.	Anàlisi de la localització de FANCD2 al lloc del dany ..	94
4.5.3.2.	Estudi de la monoubiquitinació de FANCD2.....	96
4.5.3.3.	Valoració de la fragilitat cromosòmica i parada en G2/M	96
4.6.	Cribatge d'alt contingut per inhibir el creixement de línies cel·lulars tumorals Fanconi	99
4.6.1.	Primera validació dels fàrmacs antitumorals candidats.....	100
4.6.2.	Segona validació dels fàrmacs antitumorals candidats	100
4.7.	Estudi del fenotip cel·lular de fibroblasts primaris i línies de carcinoma de cèl·lules escamoses de cap i coll tractats amb els candidats antitumorals	101
4.7.1.	Assajos de supervivència cel·lular	101
4.7.2.	Ubiquitinació de FANCD2	103
4.7.3.	Fragilitat cromosòmica i parada en G2/M.....	105
4.8.	Estudi <i>in vivo</i> dels fàrmacs CAT2 i CAT29 en el creixement de carcinoma de cèl·lules escamoses de cap i coll en models murins	107
5.	Discussió.....	113
6.	Conclusions.....	125
7.	Bibliografia	127
8.	Annexos	145

Introducció

1.Introducció

1.1. Generalitats sobre l'anèmia de Fanconi

L'anèmia de Fanconi va ser descrita per primera vegada l'any 1927 pel pediatra suís Guido Fanconi quan va observar en una família de 5 germans que tres d'ells, entre 5 i 7 anys, patien una anèmia severa progressiva, infeccions recurrents, malformacions congènites i hemorràgies espontànies, que finalment va resultar amb una mort prematura dels nens (figura 1) (Fanconi, 1927). L'any 1929, G. Fanconi es va adonar que la malaltia no només afectava l'eritropoesi sinó a tots els llinatges cel·lulars hematopoètics i en aquell moment, li va semblar que patien una anèmia pernicioide i no va ser fins l'any 1931 que Otto Naegeli va proposar que el síndrome hauria de dir-se anèmia de Fanconi. Basant-se en aquestes observacions, Guido Fanconi va establir els primers criteris diagnòstics de malaltia que incloïen la pancitopènia, alteracions esquelètiques, baixa altura, anomalies urogenitals, hiperpigmentació i ocurrència familiar. Per G. Fanconi la recerca en la malaltia li va ocupar 40 anys i hi va haver molta especulació sobre la seva etiologia i el seu patró d'herència. Inicialment no va creure que aparegués per la mutació d'un sol gen però al 1964 va publicar una hipòtesis de que la malaltia era causada per una translocació cromosòmica (Lobitz and Velleuer, 2006). En aquell moment, els científics del món van intentar buscar la translocació però no la van aconseguir veure i l'any 1966, el científic Schroeder va reconèixer un patró d'herència autosòmica recessiva i va descriure que estava associada a fragilitat cromosòmica (Schroeder, 1966). Tres anys més tard, Schuler i col·laboradors van proposar observar les cèl·lules d'aquests pacients com a diagnòstic per la malaltia, ja que eren molt sensibles a agents alquilants i el seu tractament produïa una elevada fragilitat cromosòmica (Schuler *et al.*, 1969). El fet de poder utilitzar marcadors cel·lulars citogenètics per detectar la malaltia va ser una eina molt important i els investigadors van voler buscar un assaig citogenètic que permetés confirmar la sospita clínica, sobretot en aquells casos on el fenotip clínic no era molt clar. No obstant, tot i que pel diagnòstic de la malaltia es segueix utilitzant la tècnica proposada per Shuler, no va ser fins dos dècades més tard que el grup de la doctora Auerbach va demostrar la hipersensibilitat de les cèl·lules Fanconi a l'efecte clastogènic d'agents inductors d'enllaços creuats al DNA (*interstrand crosslinks*, ICL). Els estudis d'Auerbach van culminar amb l'estandardització de l'assaig de fragilitat cromosòmica i el tractament del diepoxibutà (DEB) en les cèl·lules dels pacients, el que va permetre identificar pacients que encara no havien patit l'anèmia o pacients

amb un fenotip poc clar que patien de leucèmia o tumors sòlids i es desconeixia l'etiologia de la seva malaltia (Auerbach, 2003, Auerbach, 2009).

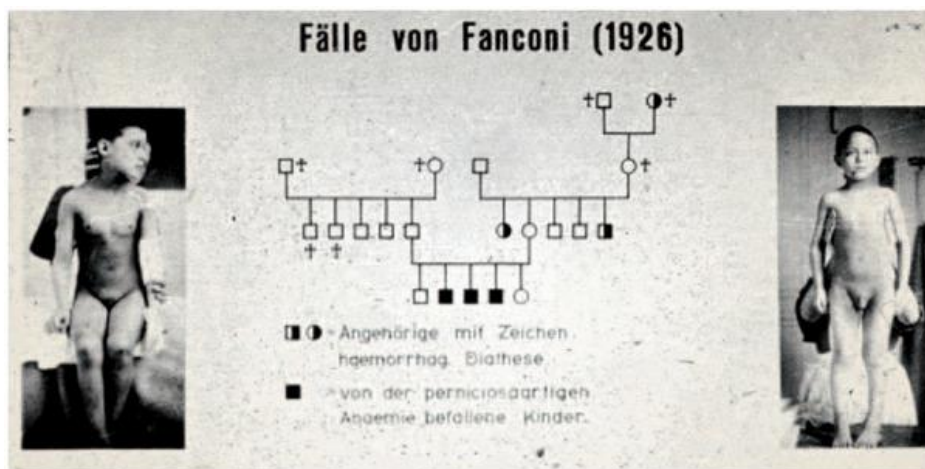


Figura 1. Diapositiva original de la lectura de Guido Fanconi mostrant dos dels tres primers pacients amb anèmia de Fanconi i el seu arbre genealògic (Lobitz and Velleuer, 2006).

L'any 1992 es va identificar el primer gen causant de la malaltia, el gen *FANCC* (Strathdee *et al.*, 1992). A partir de llavors, s'han identificat mutacions bial·lèliques en 22 gens diferents i s'estan descobrint moltes d'altres proteïnes d'interacció, el que posa de manifest la gran complexitat genètica. Els 22 gens inclouen *FANCA*, *FANCB* (*FAAP95*), *FANCC*, *FANCD1* (*BRCA2*), *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG* (*XRCC9*), *FANCI*, *FANCL*, *FANCM*, *FANCN* (*PALB2*), *FANCO* (*RAD51C*), *FANCP* (*SLX4*), *FANCQ* (*XPF/ERCC4*), *FANCR* (*RAD51*), *FANCS* (*BRCA1*), *FANCT* (*UBE2T*), *FANCU* (*XRCC2*), *FANCV* (*REV7*) i *FANCW* (*RFWD3*).

L'anèmia de Fanconi és una malaltia autosòmica recessiva per tots els gens excepte per *FANCB*, el qual es troba localitzat en el cromosoma X (Meetei *et al.*, 2004) i per *RAD51*, que té una herència autosòmica dominant. Aquests gens codifiquen per proteïnes implicades en una ruta molecular de reparació d'un tipus de dany específic en el DNA, que són els ICLs, i és anomenada anèmia de Fanconi / susceptibilitat al càncer de mama (*FA/BRCA*), per la seva interrelació amb diverses proteïnes causants de càncer de mama hereditari (*BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PALB2* i *RAD51C*) (Somyajit *et al.*, 2012, Plavetic *et al.*, 2013). L'últim gen descrit fins el moment és *FANCW* i s'ha reportat recentment en una col·laboració amb el nostre grup (Knies *et al.*, 2017).

1.2. Prevalença

L'anèmia de Fanconi és una malaltia rara i genèticament heterogènia que es troba en totes les races i grups ètnics i és la causa genètica més comú d'anèmia aplàsica i una de les causes genètiques més comuns de malignitat hematològica. Té una prevalença en la població general d'1 a 5 per cada milió d'habitants i una taxa d'incidència d'1 cada 131.000 naixements i la freqüència de portadors estimada és d'1/181 als Estats Units (*United States*, EEUU) (Rosenberg *et al.*, 2011). Poblacions específiques tenen variants fundadores amb una freqüència de portadors més elevada (<1:100) per l'alta càrrega de consanguinitat, entre les que destaquen els jueus asquenazites (FANCC, BRCA2), nord-europeus (FANCC), africans (FANCA), negres subsaharians (FANCG) i gitanos espanyols (FANCA) (Whitney *et al.*, 1993, Tipping *et al.*, 2001, Callen *et al.*, 2005). A Espanya, la població actual té uns 46 milions d'habitants i des de 2001 fins mitjans del 2017, el nostre laboratori, el qual diagnostica tots els pacients Fanconi espanyols, ha diagnosticat 201 pacients dels quals el 18 % van ser mosaics per reversió somàtica i tots ells consten com a inscrits a la Xarxa Nacional d'Anèmia de Fanconi. També, la malaltia es produeix en una relació home:dona entre 1.1 i 1.2:1, respectivament, incloent tots els grups ètnics i excloent els pacients *FANCB* que són exclusivament homes (Auerbach, 2009, Neveling *et al.*, 2009, Rosenberg *et al.*, 2011).

1.3. Aspectes clínics de la malaltia

Els pacients Fanconi presenten un espectre molt diferent del fenotip clínic, segons la proteïna mutada en la ruta (Wang, 2007). Les manifestacions clíniques de l'anèmia de Fanconi són heterogènies i la malaltia es caracteritza per múltiples defectes congènits de naixement. No obstant, un 25-40 % dels pacients té una aparença completament normal (Alter, 2005).

L'anèmia de Fanconi és un síndrome d'instabilitat cromosòmica que es caracteritza per malformacions congènites, una disfunció progressiva del moll de l'os i una predisposició a desenvolupar leucèmia mieloide aguda (*acute myeloid leukemia*, AML), tumors sòlids i infertilitat. Les característiques clíniques fan que l'esperança de vida d'aquests pacients sigui reduïda, al voltant dels 20 anys (Wu, 2013).

1.3.1. Malformacions congènites

A nivell de la biologia del desenvolupament, les anomalies congènites en pacients Fanconi poden classificar-se en majors i menors i poden ser unilaterals o bilaterals.

Les malformacions congènites majors fan referència a les que produeixen una disfuncionalitat de l'individu, implicant el sistema nerviós central, l'esquelètic, el gastrointestinal, el genital i l'auditiu. Les anomalies esquelètiques més comuns són les de les extremitats superiors que afecten el radi de l'avantbraç o el dit polze, el qual pot patir tant una hipoplàsia o bé un os addicional (figura 2). L'associació VACTERL (*vertebral defects, anal atresia, tracheoesophageal fistula with esophageal atresia, cardiac defects, renal and limb anomalies*) fa referència a anomalies vertebrals, atresia anal, fístula tràqueoesofàgica amb atresia de l'esòfag, anormalitats cardíacques i anomalies renals, la qual es diagnostica per la presència d'una combinació de mínim 3 anomalies congènites. Aquesta associació representa un 5 % dels pacients Fanconi ja que en l'estudi de Alter i Rosenberg, de 2.246 pacients VACTERL reportats, 109 van ser Fanconi, dels quals 44 han sigut subtipats sent els més freqüents *FANCB*, *FANCA*, *FANCD1* i *FANCD2* (Alter and Rosenberg, 2013) i s'inclou un pacient reportat pel nostre grup l'any 2013 subtipat com a *FANCO* (Bogliolo *et al.*, 2013). D'altra banda, les anomalies auditives afecten les estructures de l'oïda com el pavelló auricular, el conducte auditiu, la membrana timpànica i la fusió dels ossos de l'oïda mitja i impliquen, a vegades, la pèrdua auditiva (Auerbach, 2009). En quan a les anomalies del tracte genital, són més freqüents en els homes i s'inclouen la criptorquídia, hipospàdies, testicles petits amb baixa espermatogènesis i retard de l'estat puberal. En canvi, en les dones, pot aparèixer l'úter unicorne o hemípter. Les anomalies anatòmiques del tracte gastrointestinal més habituals són l'atrèsia esofàgica amb o sense fístula tràqueoesofàgica, l'atrèsia duodenal i l'atrèsia anal (Eiler *et al.*, 2008).

Les malformacions congènites menors fan referència a les que poden passar per desapercebudes clínicament i, de fet, el terç de pacients que no les presenten, poden patir-les i no estar diagnosticats. Entre elles, s'inclouen una curta altura pre-natal i post-natal, baix pes al néixer, pigmentació anormal de la pell amb taques cafè amb llet, microcefàlia, hipoplàsia de l'eminència tènar i microftalmia (figura 2).



Figura 2. Característiques clíniques típiques dels pacients Fanconi: trets facials, alçada i taques de cafè amb llet a la pell.

1.3.2. Disfuncions i malignitats hematològiques

Les disfuncions hematològiques són el símptoma més característic de l'anèmia de Fanconi i l'aparició d'aquestes, moltes vegades, porta al diagnòstic. Es desenvolupa una fallada progressiva del moll de l'os amb pancitopènia, normalment iniciada per una trombocitopènia o leucopènia degut a una elevada apoptosi de les cèl·lules hematopoètiques. L'edat d'aparició de les primeres disfuncions hematològiques és molt variable, però el 75 % dels pacients l'experimenten durant la primera dècada de vida, i als 40-50 anys, la incidència acumulada estimada de la fallada del moll de l'os és del 90 % (Kutler *et al.*, 2003a, Niedernhofer *et al.*, 2005). Aquesta pancitopènia sovint resulta amb la mort per complicacions de la fallada del moll de l'os, infeccions severes o hemorràgies. Els pacients amb anèmia de Fanconi presenten una susceptibilitat al càncer per una elevada inestabilitat cromosòmica en els precursors hematopoètics, normalment afectant els cromosomes 3 i 7, associada amb la síndrome mielodisplàsica (*myelodysplastic syndrome*, MDS) i l'AML (D'Andrea and Grompe, 2003, Eiler *et al.*, 2008) i als 40 anys, la incidència acumulada de patir malignitats hematològiques és del 33 % (Butturini *et al.*, 1994, Kutler *et al.*, 2003a). Per tal d'avaluar els recomptes cel·lulars és important fer un seguiment a partir de mostres del moll de l'os com també de sang perifèrica al llarg del temps ja que la fallada medul·lar pot aparèixer a qualsevol edat i es manifesta amb nivells anormalment baixos de neutròfils, plaquetes i hemoglobina, tal i com es mostra a la taula 1, on es poden observar els diferents graus de severitat de la fallada del moll de l'os. Cal destacar que les citopènies han de ser persistents i no transients o secundàries per altres causes com infeccions, medicacions, pèrdua de sang perifèrica o deficiències nutricionals (Frohnmayr *et al.*, 2014). No obstant, en els últims 10 anys el tractament de les malignitats hematològiques ha millorat molt i la supervivència dels pacients s'ha

allargat, arribant al 70% en els donants no emparentats i al 90% en els donants emparentats (Farzin *et al.*, 2007, Chaudhury *et al.*, 2008, Huck *et al.*, 2008).

	Mild	Moderate	Severe
Absolute neutrophil count (ANC)	<1,500/mm ³	<1,000/mm ³	<500/mm ³
Platelet count	150,000-50,000/mm ³	<50,000/mm ³	<30,000/mm ³
Hemoglobin (Hb) level	≥8 g/dL*	<8 g/dL	<8 g/dL

*Less than normal for age but ≥ 8 g/dL.

Taula 1. Graus d'afectació de la fallada del moll de l'os (Frohnmayr *et al.*, 2014).

1.3.3. Susceptibilitat a desenvolupar tumors sòlids

Tot i que els pacients amb anèmia de Fanconi tenen una alta freqüència en desenvolupar malignitats hematològiques (representen un 60 % de tots els tumors), la inestabilitat cromosòmica també provoca que tinguin un alt risc de desenvolupar tumors no hematològics (40 %). De fet, el desenvolupament del càncer apareix en edats molt primerenques i, si superen la fallada hematològica, és molt probable que apareguin les malignitats. Els tumors sòlids més freqüents són els carcinomes de cèl·lules escamoses de coll i cap (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC), pell, tracte gastrointestinal i genitourinari i tenen una incidència de 500 a 700 vegades superiors quan es corregeix per l'edat a la població general. Com es pot observar a la taula 2, aquests tumors representen un 42 % dels tumors no hematològics, seguits de les neoplàsies de fetge (22,7 %), renals (7,6 %) i cervell (6,3 %), segons la base de dades més gran reportada fins el moment, el Registre Internacional de pacients amb anèmia de Fanconi (IFAR) de l'any 2003 (Kutler *et al.*, 2003b, Kutler *et al.*, 2003a). A més, els individus amb anèmia de Fanconi tenen un risc augmentat de patir un segon càncer primari en la pell i el tracte genitourinari. La neoplàsia es dona en un 25-30 % dels pacients, sobretot en aquells que no desenvolupen una fallada del moll de l'os primerenca (Alter, 2005, Eiler *et al.*, 2008). La figura 3 mostra la incidència acumulada de l'edat d'aparició de la fallada hematològica, la malignitat hematològica, els tumors sòlids i els HNSCC. Als 40 anys, la incidència acumulada de mortalitat va ser del 80%, de patir una malaltia hematològica del 90 %, d'un tumor sòlid del 28 % i de patir HNSCC d'un 20 % (Kutler *et al.*, 2003a). No obstant, donat els avenços en els protocols del trasplantament de progenitors hematopoètics dels últims anys, els percentatges de patir malignitats hematològiques s'han vist molt reduïts.

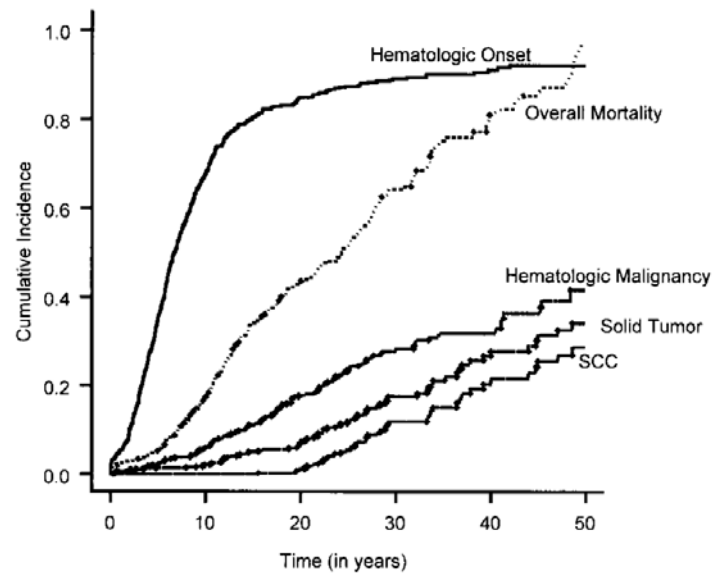


Figura 3. Incidència acumulada de la mortalitat, fallada hematològica i malignitats en els pacients Fanconi. A partir de 754 pacients amb anèmia de Fanconi registrats a la IFAR es va seguir la seva evolució i es va determinar durant els diferents anys de vida la incidència acumulada de la fallada hematològica, les malignitats hematològiques, els tumors sòlids, els HNSCC i la mortalitat total (Kutler *et al.*, 2003a).

Tumor type	No. cases (%)
Hematologic tumors	120 (60)
AML	60
MDS	53
ALL	5
CMMOL	1
Burkitt lymphoma	1
Nonhematologic tumors	79 (40)
Liver tumors	18 (9)
Liver adenoma	11
Hepatocellular carcinoma	6
Liver adenocarcinoma	1
Brain tumors	5 (2)
Medulloblastoma	4
Astrocytoma	1
Renal tumors	6 (3)
Wilm tumor	4
Renal cell carcinoma	1
Nephroblastoma	1
Squamous cell carcinoma	39 (20)
Head and neck SCC	19
Vulvar	8
Cervix	6
Cutaneous	3
Anus	2
Esophagus	1
Miscellaneous tumors	11 (6)
Breast carcinoma	3
Basal cell carcinoma	2
Neuroblastoma	1
Desmoid tumor	1
Gonadoblastoma	1
Melanoma	1
Neurilemmona	1
Osteogenic sarcoma	1

ALL indicates acute lymphoblastic leukemia; CMMOL, chronic myelomonocytic leukemia; SCC, squamous cell carcinoma.

Taula 2. Neoplàsies identificades en els pacients Fanconi (Kutler *et al.*, 2003a).

1.3.4. Endocrinopatologies

Al voltant del 80 % dels pacients presenten una endocrinopatologia. La deficiència de l'hormona del creixement és la més comú i s'observa en un 53 % dels pacients, tot i que un 37 % també pateixen d'hipotiroidisme, un 39 % tenen una alteració del metabolisme de la glucosa i de la insulina, un 27 % pateixen d'obesitat i un 55 % de dislipèmia. El 92 % dels pacients majors d'edat tenen osteopènia o osteoporosi i el 65 % disfunció gonadal. La infertilitat és comú en l'anèmia de Fanconi i aproximadament la meitat de les dones són infèrtils i pateixen de menopausa prematura tot i que l'alteració endocrina subjacent no ha sigut encara identificada (Wajnrajch *et al.*, 2001, Giri *et al.*, 2007).

D'altra banda, els homes amb anèmia de Fanconi són molt poc fèrtils degut a les malformacions genitals i les hipoplàsies gonadals. Les endocrinopatologies estan presents tant en nens com en adults i cal identificar-les el més aviat possible, tenint en compte que els diferents tractaments per millorar la fallada hematològica, com és el cas dels andrògens, pot afectar el sistema endocrí dels pacients (Auerbach, 2009).

1.4. Biologia molecular de la ruta FA/BRCA

Les proteïnes codificades pels 22 gens Fanconi constitueixen la ruta de reparació del DNA FA/BRCA, i junt amb altres proteïnes de reparació, cooperen per resoldre els ICLs durant la fase S del cicle cel·lular, per tal de mantenir l'estabilitat genòmica. A la taula 3, es mostra un resum de tots els gens identificats i la freqüència amb la que es troben mutats en els pacients. Tanmateix, hi ha pacients que no tenen cap dels gens anteriors mutats i per tant, encara hi ha gens involucrats que estan per identificar.

Compl. group	Estim. frequency	Gene name	Gene alias	Chrom. position	Protein M.W. (kDa)	References
A	60-70	FANCA		16q24.3	162,7	(Lo Ten Foe et al., 1996)
B	rare	FANCB	FAAP95	Xp22.2	97,7	(Meetei et al., 2004)
C	10-15	FANCC		9q22.3	63,4	(Strathdee et al., 1992)
D1	1-5	FANCD1	BRCA2	13q12.3	384,2	(Howlett et al., 2002)
D2	1-5	FANCD2		3p25.3	164,1	(Timmers et al., 2001)
E	rare	FANCE		6p21.3	58,7	(de Winter et al., 2000b)
F	rare	FANCF		11p15	42,2	(de Winter et al., 2000a)
G	10-15	FANCG	XRCC9	9p13.3	68,5	(de Winter et al., 1998)
I	rare	FANCI		15q26.1	149,3	(Smogorzewska et al., 2007)
J	rare	FANCI	BACH1; BRIP1	17q22.2	140,9	(Levitus et al., 2005, Levrán et al., 2005)
L	rare	FANCL		2p16.1	42,9	(Meetei et al., 2003)
M	rare	FANCM		14q21.2	232,2	(Meetei et al., 2005)
N	rare	FANCN	PALB2	16p12.12	131,3	(Reid et al., 2007, Xia et al., 2007)
O	rare	FANCO	RAD51C	17q22	42,2	(Vaz et al., 2010)
P	rare	FANCP	SLX4	16p13.3	200	(Kim et al., 2011)
Q	rare	FANCO	ERCC4; XPF	16p13.12	104,5	(Bogliolo et al., 2013)
R	rare	FANCR	RAD51	15q15.1	37	(Wang et al., 2015)
S	rare	FANCS	BRCA1	17q21	207,7	(Sawyer et al., 2015)
T	rare	FANCT	UBE2T	1q32.1	22,5	(Hira et al., 2015)
U	rare	FANCU	XRCC2	7q36.1	31,9	(Park et al., 2016)
V	rare	FANCV	REV7	1p36.22	24,3	(Bluteau et al., 2016)
W	rare	FANCW	RFWD3	16q23.1	85	(Knies et al., 2017)

Taula 3. Gens implicats en la ruta FA/BRCA.

La ruta FA/BRCA es pot dividir en tres etapes diferents: (1) etapa anterior a l'activació del complex FANCD2/FANCI (complex ID), (2) etapa de formació del complex ID i (3) etapa posterior a la monoubiquitinació del complex ID. Com es pot veure en la divisió d'aquestes etapes de la ruta, un esdeveniment central regulador és la monoubiquitinació del complex heterodimèric ID sobre el lloc del dany. Aquest esdeveniment permet classificar les proteïnes implicades en la ruta que apareixen aigües amunt (*upstream*) de la modificació post-traducciona, involucrades en la

detecció i la senyalització del dany al DNA, el propi complex ID que fa de transductor de la senyal i les proteïnes que intervenen aigües avall (*downstream*), que tenen un paper efector en la reparació del dany (figura 4).

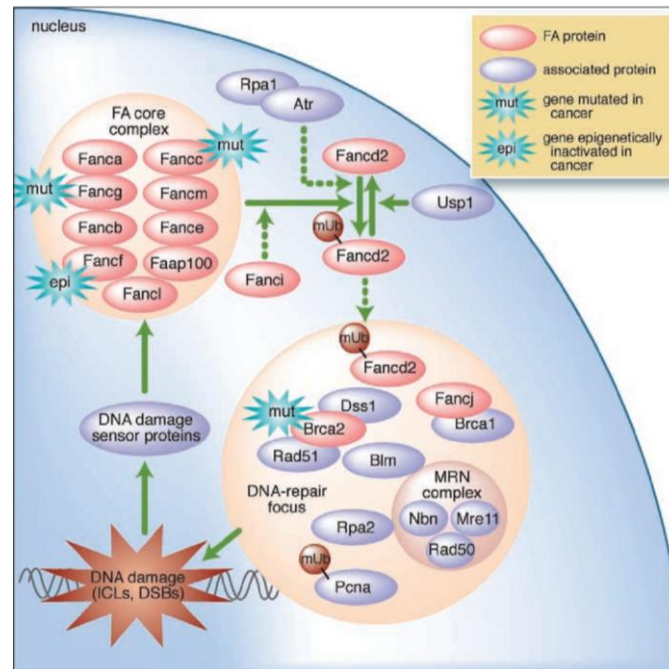


Figura 4. Representació esquemàtica de les proteïnes involucrades en la ruta FA/BRCA (Gallmeier and Kern, 2007).

1.4.1. Fase prèvia a l'activació del complex ID

Les proteïnes *upstream* FANCA, B, C, E, F, G, L, M, FAAP20 i FAAP100 formen un gran complex nuclear, anomenat complex central Fanconi. Quan hi ha dany al DNA amb la presència d'ICLs (figura 5A), aquest complex és reclutat a la cromatina on interactua amb UBE2T/FANCT, que està localitzat a la cromatina de manera constitutiva (Gurtan and D'Andrea, 2006, Alpi *et al.*, 2007). Estudis recents han identificat 3 mòduls diferents en el complex central: el mòdul FANCB-FANCL-FAAP100, el qual aporta l'activitat catalítica essencial de la monoubiquitinació, i els mòduls FANCA-FANCG-FAAP20 i FANCC-FANCE-FANCF, les funcions dels quals encara no estan del tot aclarides (Huang *et al.*, 2014, Rajendra *et al.*, 2014). La subunitat FANCM inicia la ruta FA/BRCA (figura 5B) formant un complex heterodimèric amb FAAP24, FAAP16/MHF1 i FAAP10/MHF2. Les proteïnes MHF1 i MHF2 mantenen l'associació estable entre FANCM i la cromatina i augmenten l'activació eficient de la via (Singh *et al.*, 2010, Yan *et al.*, 2010). Aquest complex juga múltiples papers en l'activació de la via de reconeixement de la lesió del DNA ja que recluta el complex central Fanconi a la cromatina (Ciccina *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2008, Singh *et al.*, 2010, Coulthard *et al.*, 2013), estableix la forquilla de replicació bloquejada i inicia la

senyalització per ATR (Ciccia *et al.*, 2007, Collis *et al.*, 2008, Schwab *et al.*, 2010). El complex central Fanconi i UBE2T/FANCT constitueixen una multi-subunitat activa del complex enzimàtic E2/E3 d'ubiquitinació. El domini RING que conté FANCL funciona com la ubiquitina lligasa E3, mentre que UBE2T/FANCT funciona com l'enzim d'ubiquitinació E2 (Meetei *et al.*, 2003, Machida *et al.*, 2006, Alpi *et al.*, 2008). Recentment també s'ha descrit que la proteïna UHRF1 reconeix i interacciona directament amb els ICLs i aquesta unió amb el DNA és necessària pel reclutament de FANCD2 al lloc del dany (Liang *et al.*, 2015, Tian *et al.*, 2015).

L'activació de la ruta està controlada per la proteïna ATR ja que desencadena el procés de reparació del DNA i l'activació del punt de control del cicle cel·lular. La presència de zones de DNA monocadena en les forquilles de replicació bloquejades provoca que ATR, o la seva cinasa efectora CHK1, fosforili un gran nombre de substrats. Aquests substrats inclouen FANCD2, I, A, E i G (Zou and Elledge, 2003, Pichierri and Rosselli, 2004, Qiao *et al.*, 2004, Smogorzewska *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2007, Ishiai *et al.*, 2008, Collins *et al.*, 2009, Moldovan and D'Andrea, 2009). A mesura que avança la recerca, es troben noves cinases i substrats susceptibles de ser fosforilats i regulats en aquesta ruta, com és el cas de la fosforilació de FANCD2 per ATM (Ho *et al.*, 2006), o bé, la fosforilació de BRCA2 per cinases dependents de ciclins, necessària per la reparació per recombinació homòloga (Esashi *et al.*, 2005).

1.4.2. Activació del complex ID

Les proteïnes FANCD2 i FANCI són el nexa entre el sistema de detecció i la senyalització del dany i els mecanismes de reparació. La proteïna FANCD2 va ser identificada l'any 2001 per Timmers i col·laboradors i la proteïna FANCI, 6 anys més tard, gràcies a l'homologia que presenta amb FANCD2 (Timmers *et al.*, 2001, Sims *et al.*, 2007, Smogorzewska *et al.*, 2007).

El complex central catalitza la segona fase de la ruta, la conjugació d'una única ubiquitina tant a la K561 de FANCD2 i a la K523 de FANCI (Garcia-Higuera *et al.*, 2001, Sims *et al.*, 2007, Smogorzewska *et al.*, 2007, Cole *et al.*, 2010, Garner and Smogorzewska, 2011) (figura 5C). Aquest complex dinàmic es mou dins i fora de la cromatina segons si està monoubiquitinat o no (Montes de Oca *et al.*, 2005). Cal tenir en compte que la monoubiquitinació del complex ID només es dona durant la fase S del cicle cel·lular, quan es detecten forquilles de replicació bloquejades, ja sigui per la presència d'ICLs causats per agents com la mitomicina C (MMC) o perquè s'han format espontàniament per trencaments de doble cadena del DNA (*double strand*

break, DSB). La ruta es regula per la fosforilació i degradació de FANCM durant les altres fases del cicle cel·lular, el que impedeix la localització del complex central Fanconi a la cromatina (Kee *et al.*, 2009). La ubiquitina és una proteïna de 76 aminoàcids que s'uneix covalentment post-traduccionament a les proteïnes diana. La monoubiquitina funciona com una senyal molecular que regula diferents processos cel·lulars incloent les proteïnes diana per distingir localitzacions subcel·lulars i les interaccions entre proteïnes (Hicke, 2001). La fosforilació del complex ID permet que pugui ser ubiquitinat i localitzar-se al lloc de la lesió del DNA formant *foci* nuclears, on coordina activitats reparadores dels ICLs junt amb les proteïnes Fanconi *downstream*. Els *foci* nuclears són estructures de reparació que contenen altres factors de reparació del DNA, tals com ATR, PCNA, NBS1, RAD51, CHK1 i γ -H2AX. Aquests factors cooperen amb la ruta Fanconi aturant el cicle cel·lular, de manera que preserven l'estabilitat genòmica (Andreassen *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2007, Moldovan and D'Andrea, 2009). La localització de FANCD2 en el lloc del dany depèn del complex central Fanconi, d'ATR i de la interacció de BRCA1 amb la forma fosforilada de la histona H2AX (γ H2AX) (Bogliolo *et al.*, 2007). No obstant, no està clar com està regulat el complex ID i quines funcions té respecte les proteïnes monomèriques. Estudis recents mostren que aquest complex es forma independentment del complex central i de la proteïna ATR, i que l'activació de la via provoca la seva dissociació un cop són ubiquitinades les proteïnes, assumint cadascuna funcions diferenciades (Sareen *et al.*, 2012, Chaudhury *et al.*, 2013).

1.4.3. Fase posterior a l'activació del complex ID

Durant la fase final de la reparació d'ICL, les proteïnes Fanconi *downstream* BRCA2/FANCD1, BRIP1/FANCI, PALB2/FANCD1, RAD51C/FANCD1, BRCA1/FANCD1, RAD51/FANCD1 i XRCC2/FANCD1 funcionen cooperativament per reparar el dany. La proteïna FANCD2 ubiquitinada (FANCD2-Ub) recluta diferents proteïnes tals com la nucleasa FAN1 i SLX4/FANCD1 en el lloc de la lesió de l'ICL. SLX4/FANCD1, alhora, recluta les nucleases XPF/FANCD1-ERCC1 i MUS81-EME1 amb la finalitat d'iniciar la incisió nucleotídica a 5' i 3', respectivament (Crossan and Patel, 2012) (figura 5D), promovent el desenganxament de l'ICL. Aquest desenganxament provoca un DSB on hi havia la forquilla de replicació bloquejada, que permet a REV1, REV7/FANCD1 i la polimerasa ξ travessar la lesió i restaurar la cadena naixent per síntesi de translesió del DNA (*translesion synthesis*, TLS) (Bluteau *et al.*, 2016) (figura 5E). Tot i que no està del tot aclarit, l'adducte produït per l'ICL podria ser reparat per escissió de nucleòtids (*nucleotide excision repair*, NER) (Moldovan and D'Andrea, 2009). D'altra

banda, el DSB resultant és reparat per recombinació homòloga (*homologous recombination*, HR) gràcies a que FANCN interacciona i estabilitza FANCD1, reclutant-la cap a la cromatina, mentre que FANCD2 interacciona amb FANCD1 i organitza els *foci* en resposta al dany. Per tal de reparar el DSB, cal que hi hagi una resecció en el DNA que el deixa en cadena senzilla (ssDNA), el qual és ràpidament protegit per la proteïna RPA. La proteïna E3 lligasa RFWD3, el producte de l'últim gen Fanconi reportat (Knies *et al.*, 2017), ubiquitina la proteïna RPA com a resposta a les forquilles de replicació bloquejades (Elia *et al.*, 2015) per tal de que es pugui donar la HR. D'altra banda, FANCI interacciona amb BRCA1 i s'encarrega de regular el punt de control dependent d'ATR (Gong *et al.*, 2010). Les proteïnes BRCA2/FANCD1, PALB2/FANCN i RAD51C/FANCO faciliten la funció de RAD51/FANCR que substitueix RPA en el ssDNA formant filaments de nucleoproteïna en el 5'-3' on es catalitza l'aparellament homòleg i la invasió de cadena i el buit és omplert per les DNA polimerases replicatives (figura 5F) (Boulton, 2006, Suwaki *et al.*, 2011, Park *et al.*, 2014). Finalment, el complex ID és desubiquitinat pel complex USP1/UAF1 per tal d'inactivar i reciclar la via funcional (Nijman *et al.*, 2005, Cohn *et al.*, 2007) (figura 5G).

Cal tenir en compte que la HR és un procés conservatiu sense error on el DNA és reparat utilitzant la cadena motlle, típicament de la cromàtide germana (Haber, 2000, Mazon *et al.*, 2010) però la disrupció de la ruta FA/BRCA provoca una HR defectuosa i un increment de la ruta de reparació d'unió d'extrems no homòlegs (*non-homologous end joining*, NHEJ), no lliure d'errors (Adamo *et al.*, 2010, Lieber and Wilson, 2010, Pace *et al.*, 2010).

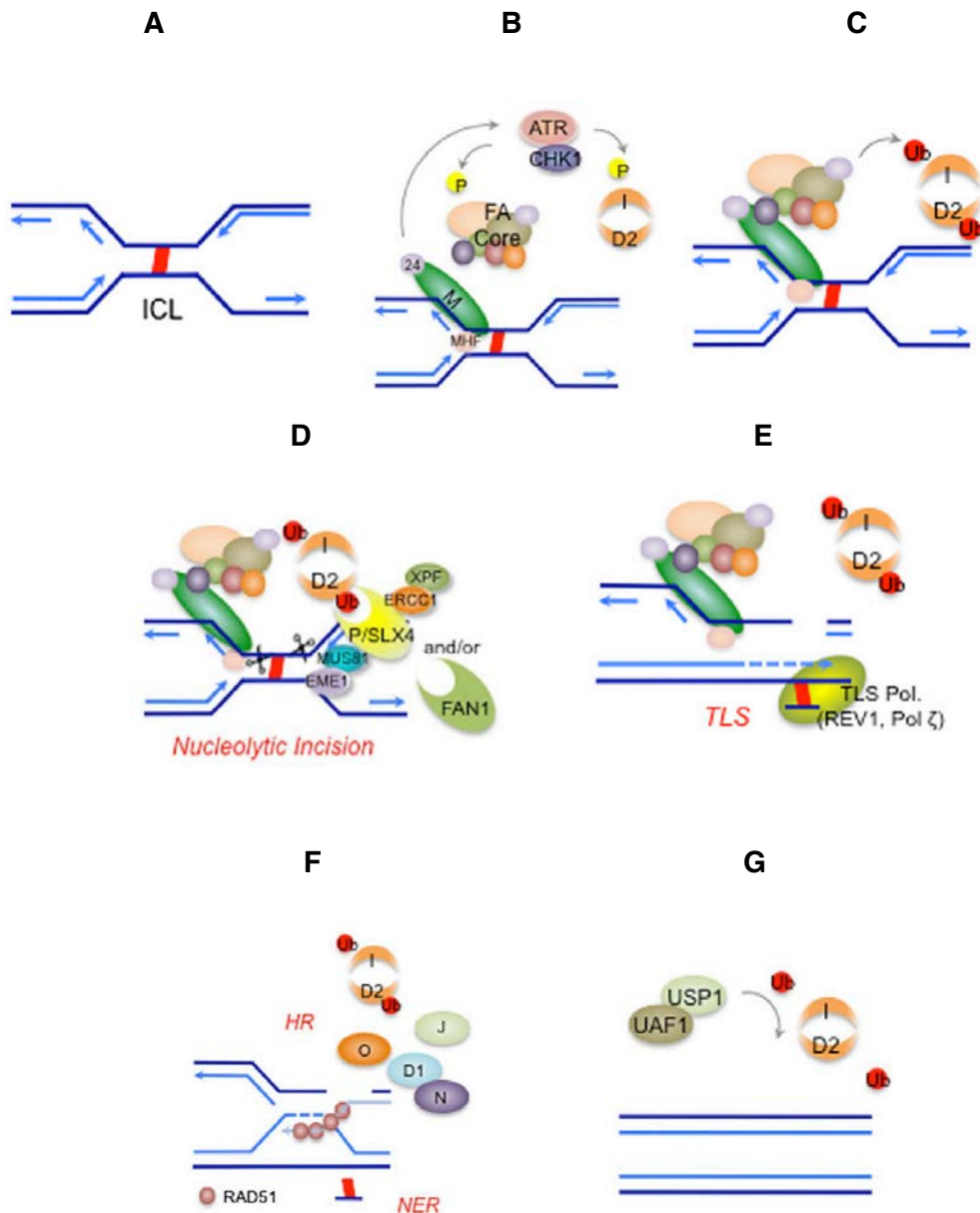


Figura 5. La ruta FANCD2-ubiquitination. A) Dues forquilles de replicació convergeixen en l'ICL que uneix covalentment les dues cadenes de DNA. B) El complex FANCD2-ubiquitination reconeix la forquilla de replicació bloquejada i recluta el complex central Fanconi en la regió del dany. FANCD2 inicia la resposta depenent d'ATR, CHK1 i altres cinases, que fosforilen múltiples proteïnes Fanconi per tal de coordinar, junt amb el complex central, la correcta ubiquitinació del complex heterodimèric ID (Kim and D'Andrea, 2012). C) El complex central monoubiquitina FANCD2-FANCI amb la lligasa d'ubiquitina E3 (FANCL), i el complex ID és reclutat a la lesió del DNA (Kim and D'Andrea, 2012). D) FANCD2-Ub recluta múltiples nucleases per coordinar les incisions nucleotídiques que flanquegen els ICLs. FANCD2 interacciona amb les nucleases ERCC1-XPF, MUS81-EME1 i FAN1. E) Es promou el tall per les nucleases i es desenganxa ICL. Polimerases específiques travessen la lesió per TLS. F) La incisió crea un DSB que és reparat per HR. Les proteïnes *downstream* promouen a RAD51 perquè resolgui els intermediaris recombinants per HR. La reparació NER elimina els adductes i omple el gap. G) El complex USP1-UAF1 treu la monoubiquitina de FANCD2-I i s'inactiva la via (Kim and D'Andrea, 2012).

1.5. Fenotip de les cèl·lules Fanconi

Tot i que els pacients amb anèmia de Fanconi presenten una gran variabilitat a nivell molecular, el fenotip de les cèl·lules és uniforme i únic en tots els grups de complementació. Les cèl·lules dels pacients tenen una característica principal que és l'absència de reparació dels ICLs i es caracteritzen, per tant, per tenir una alta hipersensibilitat als agents inductors d'aquests. També, tal i com es mostra a la figura 6, s'ha vist que les cèl·lules Fanconi pateixen d'instabilitat cromosòmica i de disfunció telomèrica, presenten una sobreproducció excessiva de citocines, apoptosi, transformació cel·lular i defectes en la reprogramació cel·lular, tenen alteracions en el cicle cel·lular i són sensibles al dany oxidatiu i als aldehyds (Bogliolo and Surralles, 2015).

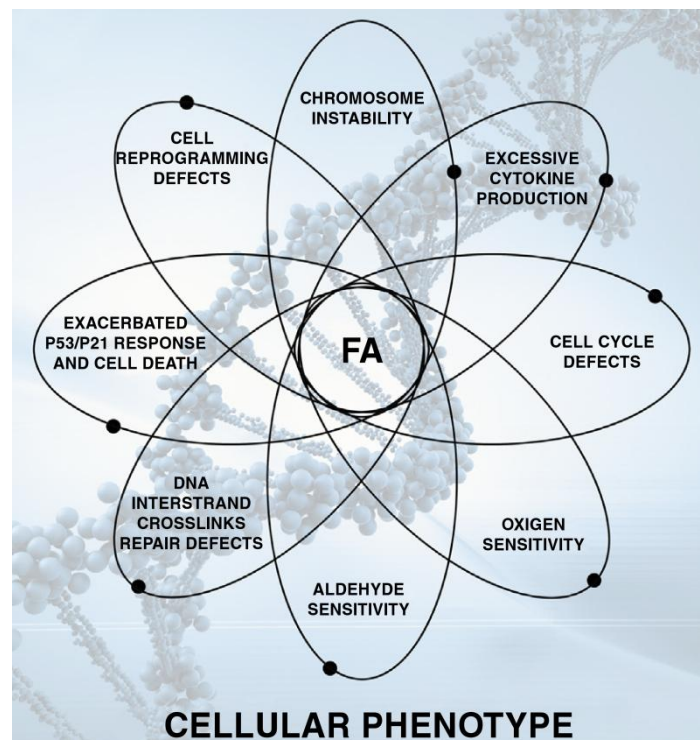


Figura 6. Fenotip cel·lular de les cèl·lules Fanconi (Bogliolo and Surralles, 2015).

1.5.1. Fragilitat cromosòmica

Les cèl·lules Fanconi pateixen una elevada fragilitat cromosòmica, tant espontània com induïda pels agents inductors d'ICLs, sent un marcador citogenètic pel diagnòstic de la malaltia. La instabilitat cromosòmica és majoritàriament de tipus cromatídica, el que inclou intercanvis entre cromàtides durant la fase S del cicle cel·lular. Tal i com es mostra a les figures 7A i 7B, els trencaments de doble cadena donen lloc a

trencaments cromatídics i la mala reparació pot provocar la formació de figures cromosòmiques o radials (triradials i tetraradials) (Joenje and Patel, 2001).

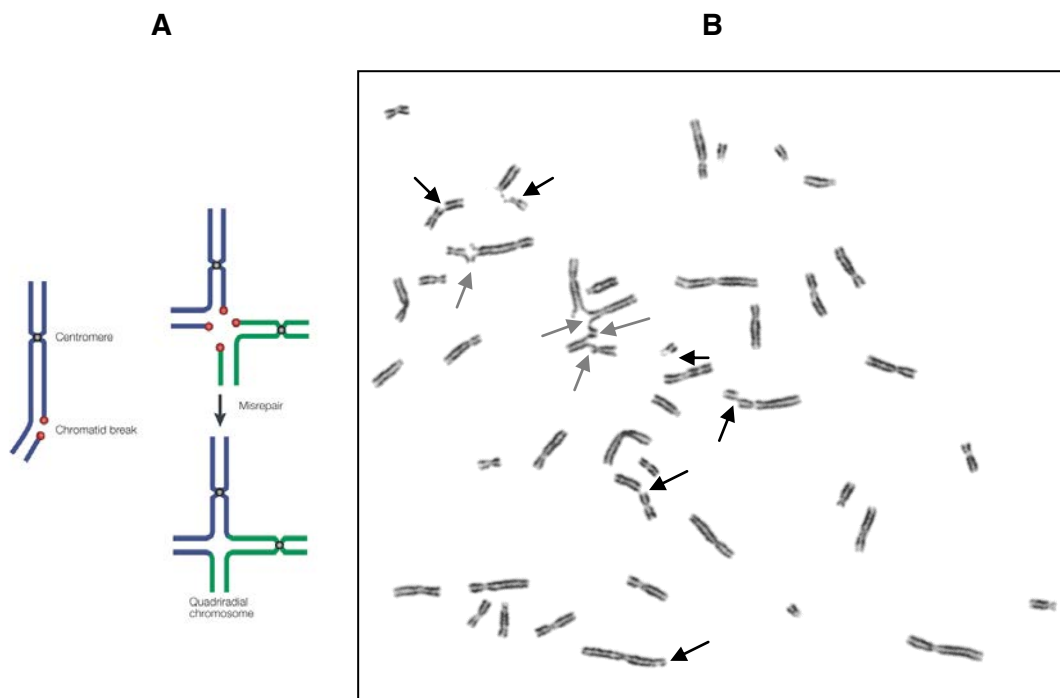


Figura 7. Fragilitat cromosòmica en les cèl·lules Fanconi. A) La mala reparació dels trencaments cromatídics pot donar lloc a figures radials (Joenje and Patel, 2001). B) Cariotip de cèl·lules d'un pacient Fanconi exposades al tractament amb DEB on s'observa la presència de trencaments cromosòmics (fletxes negres) i figures radials (fletxes grises) (imatge obtinguda al laboratori).

1.5.2. Hipersensibilitat als agents inductors d'ICLs

La fragilitat cromosòmica espontània que patien les cèl·lules Fanconi va fer que s'estudiés el seu comportament a l'exposició dels agents inductors d'ICLs, com la MMC, el DEB, el cisplatí, el melfalan o la ciclofosfamida, i es va veure que les cèl·lules de tots els pacients eren sensibles, independentment del seu subtipus genètic. Aquesta sensibilitat és depenent de la dosi i redueix la supervivència cel·lular (figura 8) (Oostra *et al.*, 2012). Els ICLs són una lesió que uneix covalentment les dues cadenes que conformen la doble hèlix del DNA i aquesta lesió impedeix la seva separació durant els processos vitals de replicació i transcripció. Per tant, són lesions que tenen una major citotoxicitat en les cèl·lules proliferatives. La sensibilitat d'aquestes cèl·lules s'explica perquè al tenir la ruta de reparació FA/BRCA deficiente, quan les cèl·lules entren en la fase de replicació i hi ha presència d'ICLs en el DNA, es produeixen trencaments de doble cadena. En el mecanisme de resolució d'aquests trencaments intervenen diverses rutes de reparació, entre elles la via FA/BRCA, que al ser defectuosa, provoca que les cèl·lules es reparin malament (De Silva *et al.*, 2000,

Niedernhofer *et al.*, 2004). L'alta sensibilitat d'aquests pacients als ICLs impedeix el tractament dels càncers mitjançant fàrmacs quimioterapèutics genotòxics inductors d'ICLs.

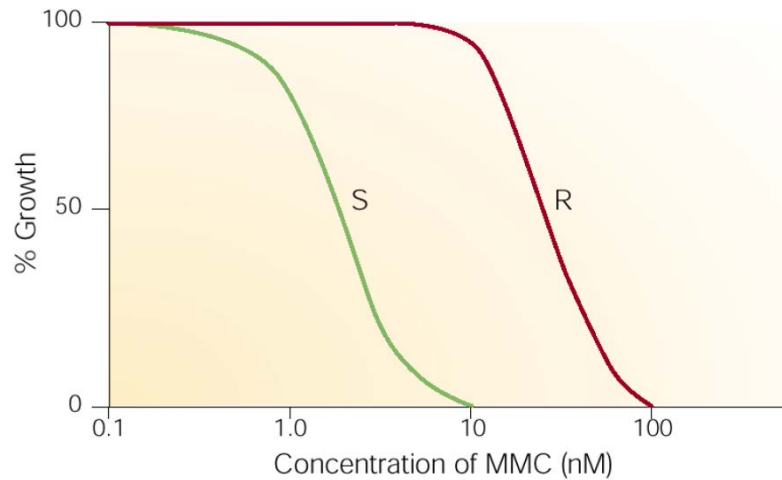


Figura 8. Anàlisi de supervivència cel·lular en pacient Fanconi sensible (S) a la MMC respecte pacient sa resistent (R) (Joenje and Patel, 2001).

1.5.3. Alteracions del cicle cel·lular

Les cèl·lules Fanconi mostren una parada del cicle cel·lular en fase G2/M de manera espontània similar en comparació amb les cèl·lules sanes però aquesta parada s'intensifica quan es tracten amb els agents inductors d'ICLs. Es pot detectar per citometria de flux i és una tècnica que s'utilitza com a eina d'ajuda per confirmar el diagnòstic d'aquesta malaltia. En la figura 9 es pot veure l'elevada freqüència de cèl·lules aturades en fase G2/M després del tractament amb MMC en comparació amb un pacient sa.

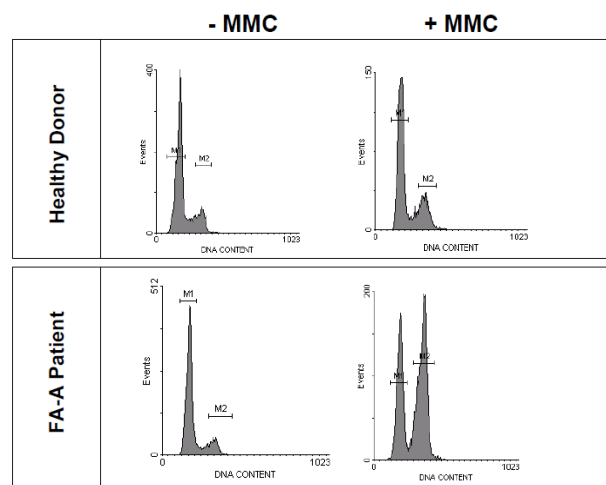


Figura 9. Anàlisi del cicle cel·lular per citometria de flux de fibroblasts primaris Fanconi i sans. S'observa una aturada en la fase del cicle G2/M en les cèl·lules Fanconi tractades amb MMC (resultats obtinguts al laboratori).

1.5.4. Sensibilitat a fonts de dany endogen, el dany oxidatiu i els aldehids

El fenotip de les cèl·lules Fanconi és molt divers i no es pot explicar únicament per l'exposició als agents inductors d'ICLs ja que els pacients pateixen anomalies congènites, defectes hematològics i predisposició al càncer sense estar exposats a aquests agents en el medi ambient durant la seva vida quotidiana. Les proteïnes Fanconi responen a fonts de dany o estrès replicatiu endògens de la pròpia cèl·lula, com per exemple ICLs formats per productes de la peroxidació de lípids o l'estrès replicatiu (Scharer, 2005, Grillari *et al.*, 2007). Les espècies reactives d'oxigen (*reactive oxygen species*, ROS) són una varietat de molècules i radicals lliures derivats de l'oxigen molecular, el qual pot ser reduït per generar molècules intermediàries estables. Els organismes aeròbics utilitzen l'oxigen pel metabolisme, el qual inevitablement genera ROS. El ROS és altament reactiu i causa modificacions oxidatives en les biomolècules com el DNA, les proteïnes i els lípids i tant els sucres com les bases nitrogenades són susceptibles a oxidar-se causant modificacions com la 8-oxoguanosina, trencaments de cadena senzilla i enllaços entre proteïnes. Aquests trencaments de cadena senzilla, si succeeixen en cadenes oposades del DNA, poden ser convertits en DSBs durant la replicació (Pang and Andreassen, 2009). El primer estudi que va observar la hipersensibilitat de les cèl·lules Fanconi al ROS va ser el de Joenje i col·laboradors, on van observar que la freqüència de trencaments cromosòmics dels limfòcits T variava en funció de la tensió d'oxigen en l'ambient (Joenje *et al.*, 1981). Aquesta observació es va confirmar posteriorment per dos grups que van comprovar que els fibroblasts primaris i les cèl·lules primàries del moll de l'os creixien millor en condicions d'hipòxia respecte en l'aire ambiental (Schindler and Hoehn, 1988, Cohen-Haguenauer *et al.*, 2006). En els últims anys, la hipersensibilitat a l'estrès oxidatiu s'ha documentat en diversos estudis, els quals utilitzen línies primàries i immortalitzades derivades de pacients Fanconi, com també, models murins Fanconi (Kruyt *et al.*, 1998, Hadjur *et al.*, 2001, Futaki *et al.*, 2002, Park *et al.*, 2004, Saadatzaheh *et al.*, 2004, Pagano *et al.*, 2005, Cohen-Haguenauer *et al.*, 2006). Un dels estudis va utilitzar ratolins *Fancc*^{-/-} i Superòxid dismutasa^{-/-} (*superoxide dismutase*, SOD) i van observar que els ratolins doble mutants patien d'hipocel·lularitat en el moll de l'os, però aquesta no es va detectar en el mutant únicament de *Fancc*^{-/-} (Hadjur *et al.*, 2001). D'altra banda, el grup de Saadatzaheh i col·laboradors va demostrar que els progenitors hematopoètics i els fibroblasts embrionaris dels ratolins *Fancc*^{-/-} patien hipersensibilitat a l'estrès oxidatiu generat pel peròxid d'hidrogen i per tant, van determinar que l'estat redox alterat dels progenitors hematopoètics implica una baixa proliferació i supervivència (Saadatzaheh *et al.*, 2004).

També s'ha vist que les proteïnes Fanconi estan involucrades en el manteniment de l'estat d'homeòstasi redox durant el metabolisme oxidant ja que les proteïnes FANCA, FANCC i FANCG, les quals pertanyen al complex central Fanconi, estan associades a factors cel·lulars que tenen una funció en processos redox. Per exemple, en concordança amb l'estudi dels ratolins *Fancc*^{-/-}, hi ha estudis que descriuen que la proteïna FANCC interacciona amb el NADPH-citocrom P450 reductasa i la glutatió S-transferasa P1-1 (Kruyt *et al.*, 1998, Cumming *et al.*, 2001), dos enzims implicats en detoxificar els reactius intermediaris, incloent el ROS. D'altra banda, la proteïna FANCG interacciona amb el citocrom P450 2E1, un membre de la superfamília P450 que està associat amb la producció d'intermediaris reactius d'oxigen i amb l'enzim antioxidant peroxiredoxina mitocondrial (Futaki *et al.*, 2002, Mukhopadhyay *et al.*, 2006), suggerint un possible paper de FANCG en la protecció contra el dany oxidatiu del DNA. A més a més, el factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) juga un paper important en la progressió de la malaltia i les malignitats hematològiques. Estudis que utilitzen ratolins *Fanca*^{-/-}, *Fancc*^{-/-} i *Fancg*^{-/-} suggereixen que les cèl·lules Fanconi tenen hipersensibilitat a les senyals apoptòtiques com el TNF- α (Lensch *et al.*, 1999, Bijangi-Vishehsaraei *et al.*, 2005, Kennedy and D'Andrea, 2005), i que la sobreproducció de citocines proinflamàtòries com la interleucina 6 (IL-6) i l'interferó gamma (IFN- γ) impliquen un elevat estrés oxidatiu que provoca canvis fisiològics com el desenvolupament de la fallada del moll de l'os i la leucèmia (Li *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2007).

En canvi, els estudis del grup de Patel i col·laboradors es centren en els aldehids com a font de dany endogen en el DNA, els quals són compostos orgànics molt reactius produïts pel metabolisme cel·lular i els proposen com a causants del fenotip clínic de l'anèmia de Fanconi, ja que la seva acumulació és especialment tòxica sobretot per la fallada hematològica que pateixen els pacients. És conegut que les línies cel·lulars Fanconi són hipersensibles a l'acetaldehid exogen (Marietta *et al.*, 2009), i és per això, que aquest grup es va centrar en estudiar quin paper tenia l'acetaldehid en un context fisiològic. L'acetaldehid intracel·lular és eliminat per l'acció de diferents enzims, incloent varies deshidrogenases d'aldehids (King and Holmes, 1998, Pappa *et al.*, 2003), oxidases d'aldehids (Riveros-Rosas *et al.*, 1997) i el citocrom p450 (Kunitoh *et al.*, 1997) i uns anys més tard, es van generar ratolins *Fancd2*^{-/-} en combinació amb l'enzim Aldehid deshidrogenasa^{-/-} (*aldehyde dehydrogenase 2*, Aldh2), pel paper que té en el catabolisme de l'acetaldehid en els humans (Langevin *et al.*, 2011). En aquest estudi van demostrar que en absència de la ruta FA/BRCA, tant per la mare com pels fetus, va ser essencial l'enzim Aldh2 pel desenvolupament dels embrions en l'úter ja

que si l'acetaldehid no és catabolitzat es difon per les membranes de la placenta. També, van observar que aquests ratolins dobles mutants no eren sans, ja que als 3-6 mesos de vida havien patit una ràpida pèrdua de pes, tenien predisposició a patir leucèmia aguda i van ser molt susceptibles als efectes tòxics de l'etanol, una font exògena d'acetaldehid. L'any 2012, l'estudi de Garaycochea i col·laboradors va demostrar que els ratolins doble mutants que no van desenvolupar una leucèmia espontània, van desenvolupar una anèmia aplàsica, un marcador clínic conegut en els humans però no observat en els ratolins Fanconi fins el moment i, per tant, que les cèl·lules hematopoètiques mare i progenitores requereixen l'enzim Aldh2 per la protecció de la toxicitat de l'acetaldehid (Garaycochea *et al.*, 2012). No obstant, és important destacar que l'acetaldehid no és generat de manera endògena per les cèl·lules a diferència del formaldehid, que és l'aldehid reactiu més simple, i a més és conegut que ataca el DNA. Aquest mateix grup va intentar generar una línia cel·lular de pollastre doble mutant per l'enzim Alcohol deshidrogenasa 5, (*alcohol dehydrogenase 5*, Adh5) codificada pel gen *Adh5*, el qual destoxifica el formaldehid, i d'una proteïna de la ruta FA/BRCA. Mentre que la línia *Adh5^{-/-}* sí que es va obtenir, no es va aconseguir el doble mutant *Fancd2^{-/-}* ni *Fancl^{-/-}*, pel que van demostrar de dues maneres independents que la inactivació del catabolisme del formaldehid va resultar en una letalitat sintètica tant per la proteïna *upstream* Fancl com per la proteïna *downstream* Fancd2 de la ruta FA/BRCA. Per tant, el requeriment de l'enzim Adh5 contrasta amb el prèviament descrit d'Aldh2, el qual la seva absència no va ser sintèticament letal i, per tant, conclouen que el formaldehid endogen sembla ser més potent genotòxicament que l'acetaldehid (Rosado *et al.*, 2011).

1.5.5. Manca de monoubiquitinació de FANCD2

Tal i com s'ha esmentat en la biologia molecular de la ruta FA/BRCA, el complex central Fanconi catalitza la conjugació de dues ubiquitines al complex ID durant la fase S del cicle cel·lular quan es detecten forquilles de replicació bloquejades, i aquest complex format per les proteïnes FANCD2-FANCI monoubiquitinades es localitza al lloc de la lesió del DNA formant *foci* nuclears, on coordina activitats reparadores dels ICLs junt amb les proteïnes Fanconi *downstream*. És molt comú estudiar per *Western blot* (WB) si la proteïna FANCD2 pot ser monoubiquitinada o no després del tractament amb un agent inductor d'ICLs, per tal d'identificar alteracions en els gens que conformen la ruta FA/BRCA (figura 10). Si FANCD2 no pot ser monoubiquitinada, implica que cal estudiar els gens que estan *upstream* a la ruta, i, en canvi, si pot ser

monoubiquitinada i hi ha sospita que la ruta FA/BRCA està alterada, cal estudiar els gens que es troben *downstream* a la fase d'activació del complex.

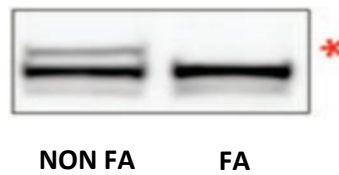


Figura 10. Absència de monoubiquitinació de FANCD2 (banda superior marcada amb un asterisc) en les cèl·lules Fanconi detectada per WB (Soulier, 2011)

1.5.6. Disfunció telomèrica

Els telòmers juguen un paper important en mantenir l'estabilitat genòmica i la individualitat dels cromosomes lineals (Greider, 1996, Blasco *et al.*, 1999, Hande *et al.*, 1999) i són una part molt important per garantir la viabilitat dels organismes i la funcionalitat del sistema hematopoètic (Lee *et al.*, 1998, Herrera *et al.*, 1999). Els telòmers estan constituïts per seqüències repetides de TTAGGG associades a un gran nombre de proteïnes telomèriques, com el TRF2, el qual és un factor preventiu de les fusions dels extrems dels cromosomes. S'ha reportat que els pacients Fanconi pateixen un escurçament dels telòmers tot i que no es coneixen els mecanismes moleculars implicats (Leteurtre *et al.*, 1999, Hanson *et al.*, 2001, Callen *et al.*, 2002a). Es pensa que és degut a l'excés de proliferació de les cèl·lules hematopoètiques que sobreviuen. Una altra explicació podria ser que les cèl·lules Fanconi tenen una alta tendència a patir trencaments cromosòmics, el que implica dràsticament un escurçament dels telòmers. L'estudi de Joksic i col·laboradors va demostrar que els limfòcits FANCD2^{-/-} patien anormalitats telomèriques com l'escurçament prematur dels telòmers, una incrementada recombinació telomèrica i formació d'estructures telomèriques aberrants (Joksic *et al.*, 2012) i un estudi del nostre grup va mostrar que els limfòcits T tenien molt afectada la integritat telomèrica ja que van observar un elevat percentatge de trencaments en les seqüències telomèriques, un escurçament replicatiu durant la proliferació dels limfòcits i una alta freqüència de fusions dels extrems cromosòmics (Callen *et al.*, 2002a).

1.6. Diagnòstic

El diagnòstic ràpid de l'anèmia de Fanconi és molt important per tal de tractar adequadament l'aparició de l'anèmia aplàsica, l'AML o el MDS i també pel consell genètic de les famílies. L'anèmia de Fanconi es pot sospitar en individus que presenten unes característiques clíniques determinades i és important realitzar un

examen físic exhaustiu per tal de no passar per alt cap d'ella. Com ja s'ha comentat anteriorment, un 75 % dels individus afectats pateixen una curta altura pre-natal i/o post-natal, pigmentació de la pell anormal (taques cafè amb llet, hipopigmentació), malformacions esquelètiques (hipoplàsia de polze i radi), microcefàlia, anomalies oftàlmiques i/o anomalies del tracte genitourinari (Mehta and Tolar, 1993). També, es pot sospitar d'anèmia de Fanconi quan es determina en el laboratori macrocitosis, hemoglobina fetal incrementada (habitualment precedeix a l'anèmia) i/o citopènia (especialment trombocitopènia, leucopènia i neutropènia). No obstant, aquestes anomalies físiques i hematològiques es poden presentar en altres malalties i és important també realitzar un estudi dels antecedents familiars amb un arbre genealògic. És per això que un diagnòstic precoç permet fer un seguiment clínic del pacient que, en cas d'aparició primerenca de tumors com els HNSCC, els quals són molt freqüents, suposaria un tractament adequat evitant la quimioteràpia o la radiació, la qual té una toxicitat molt alta amb conseqüències molt perjudicials en els pacients Fanconi.

Les recomanacions del diagnòstic de l'anèmia de Fanconi es van establir al 2013 en una conferència consens (Frohnmayr *et al.*, 2014) i es basen en la realització del test citogenètic de limfòcits de sang perifèrica cultivats *in vitro* amb el tractament de DEB, que és una droga citostàtica que indueix ICLs en el DNA, durant 48 hores. Si els resultats són normals o inconclusius i es sospita de mosaïcisme (apartat 1.5.1), es pot realitzar un test alternatiu utilitzant fibroblasts de pell. Altres tècniques diagnòstiques complementàries que es realitzen són l'anàlisi de la parada del cicle cel·lular per citometria de flux on es tracten les cèl·lules amb MMC durant 72 hores i, com a resultat de l'acumulació de dany i de la incapacitat de les cèl·lules Fanconi a reparar-lo, augmenta la fase G2/M del cicle cel·lular. També es pot determinar l'activació de la ruta FA/BRCA a través de l'estudi de la monoubiquitinació de FANCD2 per WB, el qual dependent del resultat pot aportar informació de si la proteïna alterada es troba *upstream* o *downstream* de la ruta FA/BRCA.

Una tècnica que es va utilitzar molt en la recerca pel descobriment de gens Fanconi i que actualment està en desús és el subtipatge per complementació utilitzant vectors retrovirals, els quals contenen el cDNA dels diferents gens Fanconi i es transdueixen en les cèl·lules d'estudi per tal de veure en quin cas es corregeix la sensibilitat de les cèl·lules a la MMC amb assajos de viabilitat cel·lular (Hanenberg *et al.*, 2002, Antonio Casado *et al.*, 2007).

El diagnòstic es confirma amb la identificació o bé, de variants bial·lèliques patogèniques en un dels 20 gens identificats com a causants d'anèmia de Faconi amb herència autosòmica recessiva, o bé, la variant hemizigòtica patogènica en el gen *FANCB*, identificada com a causant d'anèmia de Fanconi lligada al cromosoma X, o bé, la variant heterozigòtica patogènica del gen *RAD51*, identificada com a causant d'anèmia de Fanconi autosòmica dominant. Antigament la seqüenciació es realitzava per Sanger, on s'amplificaven zones codificants dels diferents gens i després es seqüenciaven els fragments de PCR generats. Una altra tècnica utilitzada és l'amplificació múltiple dependent de lligació (*multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA), que permet detectar en una mateixa reacció còpies anormals de diverses seqüències genòmiques diferents i que ha sigut molt útil per detectar grans delecions i duplicacions d'exons (Gille *et al.*, 2012). D'altra banda, les noves tècniques de seqüenciació han avançat molt en els últims anys i destaquen el diagnòstic per seqüenciació de l'exoma (*whole-exome sequencing*, WES) i seqüenciació del genoma (*whole-genome sequencing*, WGS). Aquests tests genòmics més amplis poden proporcionar o suggerir un diagnòstic prèviament no considerat com per exemple mutacions en gens diferents o gens que resulten en un fenotip clínic similar. L'existència de bases de dades internacionals de mutacions o variants permet comparar-les per tal de veure si les variants són freqüents en la població o si ja s'ha trobat en altres pacients i així considerar els canvis com a polimorfismes (1 sol nucleòtid) o mutacions patogèniques. El diagnòstic també es pot abordar amb la realització de panells multigens que incloguin els 22 gens Fanconi, com també altres gens d'interès per tal d'obtenir un diagnòstic molt ràpid i més barat respecte la seqüenciació de tot el genoma o exoma.

1.6.1. Mosaïcisme per reversió somàtica

El mosaïcisme somàtic afecta un 15-25 % dels pacients Fanconi i apareix quan una única cèl·lula progenitora hematopoètica reverteix de manera espontània la mutació en el gen Fanconi d'un dels dos al·lèls afectats i, per tant, reverteix el fenotip cel·lular convertint-se en una cèl·lula normal o sana. Aquest fenomen només s'ha observat en el teixit hematopoètic, on l'alta proliferació cel·lular és necessària per la colonització del moll de l'os. Aquesta cèl·lula guanya un avantatge proliferatiu ja que pot fer front a la sensibilitat del DNA als potencials ICLs generats pel metabolisme endogen i s'expandeix clonalment i colonitza el moll de l'os del pacient. El mosaïcisme somàtic es detecta en els pacients Fanconi quan són diagnosticats amb el test de fragilitat cromosòmica utilitzant mostres de sang perifèrica i apareixen dues poblacions

diferents, una que presenta trencaments cromatídics corresponent a la població no revertida i l'altra sense trencaments que correspon a la població revertida (figura 11). La reversió original de la mutació es pot produir en la cèl·lula mare on els recomptes hematopoètics del pacient tornen als nivells normals o en una cèl·lula més diferenciada dels llinatges hematopoètics (Lo Ten Foe *et al.*, 1997, Castella *et al.*, 2011b).

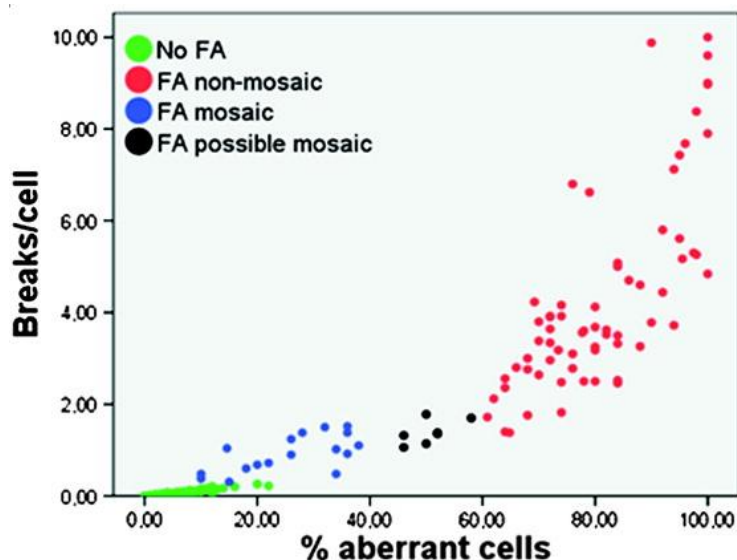


Figura 11. Fragilitat cromosòmica induïda pel DEB en cèl·lules no Fanconi (verd), Fanconi mosaics (blau i negre) i Fanconi (vermell). El gràfic s'expressa en el % de cèl·lules aberrants en l'eix de les coordenades i trencaments cromosòmics per cèl·lula en les abscisses (Castella *et al.*, 2011a).

1.7. Teràpies dels pacients amb anèmia de Fanconi

En els últims 20 anys hi ha hagut un progrés molt gran en entendre els mecanismes patològics i genètics implicats en l'anèmia de Fanconi, no obstant, aquests avenços no han anat en paral·lel amb els tractaments mèdics disponibles pels pacients, on encara hi ha molt recorregut per fer. La fallada del moll de l'os és l'afecció més important que pateixen, ja que és la primera que sol aparèixer i el trasplantament de progenitors hematopoètics és l'únic tractament actual capaç d'allargar la supervivència d'aquests pacients.

1.7.1. Trasplantament de progenitors hematopoètics

El trasplantament de progenitors hematopoètics és l'única teràpia eficient en l'actualitat per les manifestacions hematològiques, incloses l'anèmia aplàsica, el MDS i l'AML. Idealment, el trasplantament es realitza abans que apareguin el MDS i l'AML i abans de la realització de les múltiples transfusions (MacMillan and Wagner, 2010). Els

individus amb anèmia de Fanconi són sensibles a la quimioteràpia i la radiació, i per la realització del trasplantament es necessiten protocols específics en centres amb molta experiència en aquest àmbit. Es coneix que la radiació prèvia del pacient abans de rebre el trasplantament té complicacions a llarg termini tals com l'aparició de tumors sòlids secundaris i és per això que s'estan dedicant molts esforços en realitzar un acondicionament del pacient evitant la radiació fins i tot quan es tracta d'un trasplantament a partir d'un donant no emparentat. Grups d'Alemanya i Brasil han reportat recentment excel·lents resultats de supervivència i hematopoesi amb donants alternatius utilitzant un règim preparatiu de tractament amb només quimioteràpia (Chao *et al.*, 2015, Bonfim *et al.*, 2016). Un dels fàrmacs que s'utilitza per l'efectivitat del trasplantament és la fludarabina, ja que redueix la incidència de fallada d'empelt i permet eliminar la radiació dels protocols preparatius de donants emparentats (MacMillan *et al.*, 2015). D'altra banda, el tractament encara és un repte pels pacients que pateixen de MDS/AML i el que es realitza és un trasplantament de progenitors hematopoètics amb o sense prèvia inducció de la quimioteràpia. Tanmateix, s'ha observat que els pacients trasplantats amb progenitors hematopoètics que desenvolupen la malaltia de l'empelt contra l'hoste tenen una major incidència de desenvolupar un HNSCC en els 10 anys següents al tractament respecte els pacients que no reben cap trasplantament (Guardiola *et al.*, 2004, Rosenberg *et al.*, 2005). També s'ha observat que si es deplecionen les cèl·lules T del donant de l'empelt, el risc a patir aquesta malaltia es veu reduït (Chaudhury *et al.*, 2008, MacMillan *et al.*, 2015).

1.7.2. Teràpia d'andrògens

Respecte les manifestacions hematològiques de la malaltia es poden utilitzar diferents fàrmacs per millorar la seva progressió. S'ha vist que el tractament amb andrògens millora, almenys de manera transitòria, els comptatges de plaquetes i cèl·lules vermelles en un 50 % dels individus, aproximadament. La teràpia d'andrògens pot ser considerada quan l'hemoglobina del pacient baixa per sota dels 8 g/dl o el comptatge de plaquetes cau per sota dels 30.000 per mm³. Tot i que només un 10-20 % dels individus respon bé a llarg termini quan rep una teràpia amb baixa dosi d'andrògens de manera contínua, aquesta opció pot ser útil particularment en els individus que o bé no tenen accés o no estan preparats pel trasplantament de progenitors hematopoètics, o bé no tenen un donant compatible. L'androgen més comú que s'administra és l'oximetalona, tot i que, segons el país, també es poden utilitzar altres andrògens sintètics com per exemple l'estanazolol a Àsia i l'oxandrolona i el danazol a nord-

Amèrica. Alguns efectes secundaris de l'administració d'alguns andrògens són la virilització i la toxicitat hepàtica, ja que s'han observat nivells incrementats de transaminases en sang, colèstasis, peliosis hepàtica i tumors hepàtics (Velazquez and Alter, 2004). Els individus que prenen andrògens cal que estiguin monitoritzats per l'aparició de tumors hepàtics i que es realitzin tests regulars de funcionament del fetge per tal de detectar anormalitats. Els tests sanguinis per detectar la funció del fetge cal que es duuguin a terme cada 3-6 mesos i que les proves d'ultrasons al fetge es realitzin cada 6-12 mesos. Si no s'observa cap resposta després de 3-4 mesos de l'administració dels andrògens és recomanable que s'interrompi el tractament (Rose *et al.*, 2014). No obstant, en els últims anys s'ha reportat l'ús del danazol, que és un fàrmac que s'utilitza per tractar pacients amb anèmia aplàsica i la fallada del moll de l'os progressiva en combinació amb la immunosupressió utilitzant la globulina antitímocit (ATG) (Chuhjo *et al.*, 2008, Jaime-Perez *et al.*, 2011, Scheckenbach *et al.*, 2012a). El danazol millora, o almenys estabilitza, la baixada progressiva d'hemoglobina en sang i els valors de trombòcits en pacients FANCA, -C, -G i -I durant al menys 3 anys. Els andrògens poden incrementar l'expressió de telomerasa i l'activitat de les cèl·lules hematopoètiques primàries, tant en individus sans com en pacients amb una anèmia aplàsica (Townsend *et al.*, 2016). El tractament amb danazol, el qual té propietats antiestrogèniques i antigonadotròpiques, sembla que té efectes similars al sistema hematopoètic que el tractament amb oximetolona o altres andrògens altament masculinitzants (Velazquez and Alter, 2004), però, en canvi, està associat a llarg termini amb efectes secundaris lleus, com l'acne o l'hirsutisme (Olsen *et al.*, 2008, Vercellini *et al.*, 2009, Jaime-Perez *et al.*, 2011). Tot i això, encara cal especificar les conseqüències del tractament hormonal a llarg termini, valorar si el tractament amb danazol podria utilitzar-se com una mesura preventiva en pacients amb un comptatge hematopoètic normal o suficient i també cal determinar si pot tenir un efecte positiu en altres manifestacions clíniques de l'anèmia de Fanconi, com la deficiència de reparació de DNA que pateixen aquests pacients (Scheckenbach *et al.*, 2012a).

Un altre fàrmac que s'està administrant és el factor estimulador de colònies de granulòcits (G-CSF), ja que millora el comptatge de neutròfils en alguns individus. Cal que es realitzi prèviament al tractament un aspirat del moll de l'os i una biòpsia i monitoritzar el pacient cada 6 mesos, degut al risc teòric d'estimular el creixement d'un clon leucèmic.

1.7.3. Tumors sòlids

El tractament dels tumors sòlids encara és un repte per la ciència ja que hi ha una elevada toxicitat associada a la quimioteràpia i la radiació en els pacients Fanconi. El tractament dels problemes hematològics ha millorat molt en els últims anys i ha provocat que els pacients tinguin una esperança de vida més llarga i, per tant, al ser una malaltia amb predisposició al càncer, les probabilitats de que apareguin les malignitats no hematològiques són molt elevades. Els tumors més freqüents després de les malignitats hematològiques són els HNSCC. En la població general, només el 6% dels tumors són HNSCC i apareixen en edats avançades (Fakhry and Gillison, 2006, Psyrris *et al.*, 2011) i més del 50 % d'aquests tumors es troben en una fase avançada en el moment del diagnòstic. És per això que la supervivència després de 5 anys es troba al voltant del 40-50 % (Fakhry and Gillison, 2006, Psyrris *et al.*, 2011). En canvi, en l'anèmia de Fanconi és el tumor sòlid més freqüentment diagnosticat (Kutler *et al.*, 2003b, Kutler *et al.*, 2003a) i apareix 700 vegades més quan es corregeix per l'edat que en la població general (Rosenberg *et al.*, 2003, Rosenberg *et al.*, 2005). A més a més, l'estudi de Rosenberg i col·laboradors va descriure que la incidència de HNSCC dels pacients que no havien rebut un trasplantament de moll de l'os a l'edat de 45 anys va ser del 50%. En canvi, els pacients trasplantats arribaven al 100 %. Aquest fet es deu als règims d'acondicionament pel trasplantament (Rosenberg *et al.*, 2005).

El tractament que s'acostuma a donar en la població general és la resecció quirúrgica primària deixant els marges lliures de cèl·lules tumorals, amb una administració de radioteràpia local i altes dosis de quimioteràpia utilitzant fàrmacs alquilants com el cisplatí, la MMC i la ciclofosfamida (Dewit, 1987). També es poden administrar altres fàrmacs com el 5-fluorouracil, metotrexat i paclitaxel per tal de millorar la supervivència. En l'anèmia de Fanconi els pacients són extremadament sensibles als tractaments genotòxics estandarditzats (Deans and West, 2011, Kitao and Takata, 2011) i, per tant, el tractament de cisplatí no pot ser utilitzat perquè indueix altes toxicitats, la fallada del moll de l'os i d'òrgans (Birkeland *et al.*, 2011, Spanier *et al.*, 2012). La radioteràpia es pot utilitzar com un tractament localitzat però també s'ha associat amb complicacions severes (Burnet and Peacock, 2002, Birkeland *et al.*, 2011, Tan *et al.*, 2011). Per tant, la millor opció terapèutica és la resecció quirúrgica en un estadi primerenc del càncer (figura 12).

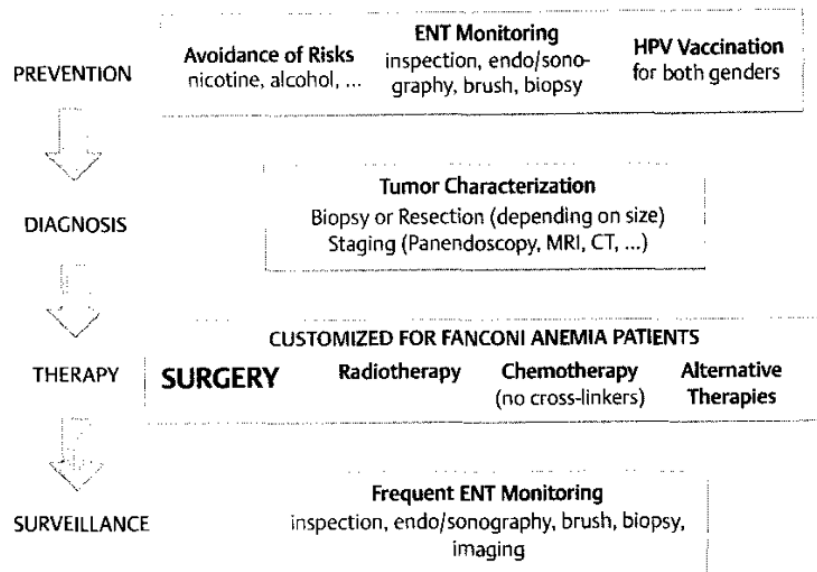


Figura 12. Algoritme per la profilaxis i el tractament dels HNSCCs en els pacients Fanconi (Scheckenbach *et al.*, 2012b).

En els últims anys, s'estan dedicant esforços en millorar la prognòsis en estadis avançats dels HNSCC en la població general, utilitzant teràpies dirigides (Matta and Ralhan, 2009). La recerca s'enfoca en el receptor del factor de creixement epidèrmic (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) ja que està sovint sobreexpressat i activat en els HNSCC (Bonner *et al.*, 2006). L'EGFR és un protooncògen i una elevada activitat provoca la progressió i la invasió dels tumors, l'angiogènesi i la metàstasi (Bonner *et al.*, 2006) i tot i que ja s'utilitza una teràpia contra EGFR utilitzant l'anticòs cetuximab en combinació amb la radiació o la quimioteràpia, sembla ser que no és suficient el seu ús individual (Soulieres *et al.*, 2004). D'altra banda, també s'ha utilitzat la teràpia fotodinàmica per tractar aquests tipus de tumors, la qual es basa en la interacció entre l'oxigen, la llum i un fotosensibilitzador per tal d'induir l'apoptosi. No obstant, cap d'aquests tractaments s'ha provat en els pacients Fanconi i actualment les teràpies disponibles en aquesta malaltia són molt limitades fent que el pronòstic dels pacients a curt-mig termini sigui molt dolenta (Velleuer *et al.*, 2017).

Per tant, és molt important realitzar un diagnòstic ràpid per part d'un especialista i examinar els pacients amb regularitat i que s'observin les cavitats de la nasofaringe, orofaringe i hipofaringe com també la laringe, l'esòfag i l'àrea ano-genital ja que és on els tumors primaris acostumen a aparèixer.

1.7.4. Teràpies sota investigació

El trasplantament de progenitors hematopoètics ha sigut un dels avenços més exitosos de la medicina, no obstant, és necessari l'ús de la quimioteràpia per tal de reduir el risc de rebuig. És per això que encara s'estan dedicant molts esforços en optimitzar els protocols de trasplantament en els pacients amb anèmia de Fanconi, pels riscos associats a l'ús d'agents quimioterapèutics.

Una altra gran preocupació és el desenvolupament de tumors sòlids i la falta d'un tractament efectiu que pugui acompanyar la resecció del tumor. Amb un diagnòstic precoç es pot controlar bé el tumor, però quan es detecta tard el creixement tumoral primari és molt ràpid i apareix la metastasi. És per això que és molt necessari i un repte que cal afrontar el desenvolupament d'estratègies per detectar i prevenir el càncer.

1.7.4.1. Teràpia gènica de cèl·lules mare hematopoètiques

Els estudis actuals es centren en un assaig clínic de teràpia gènica de cèl·lules mare hematopoètiques dirigida pel grup del Juan Bueren del CIEMAT a Madrid on el nostre grup hi ha participat. Aquest assaig té l'objectiu potencial de transformar la teràpia convencional de l'anèmia de Fanconi, la qual durant dècades ha implicat protocols de transfusió, esteroides anabòlics i trasplantament de progenitors hematopoètics. Durant els últims anys, com ja s'ha esmentat anteriorment, els protocols de trasplantament de progenitors hematopoètics s'han millorat i ha incrementat la supervivència dels pacients d'un 20 a un 90 % des dels anys 90. Per tant, cal tenir en compte que el trasplantament de progenitors hematopoètics ha tingut un gran impacte en els últims 30 anys i ha sigut capaç de curar les complicacions hematològiques de la malaltia, ja que la leucèmia i la fallada hematològica tenien conseqüències letals. No obstant, també està associada a molts efectes secundaris causats per la quimioradioteràpia, com la toxicitat pulmonar i renal o de caràcter immunològic com el desenvolupament de la malaltia de l'empelt contra l'hoste, o bé, efectes secundaris a llarg termini com l'aparició de càncers secundaris i endocrinopaties. D'altra banda, cal tenir en compte que no tots els pacients tenen un donant compatible per poder realitzar el trasplantament. Per tant, es va pensar que la teràpia gènica podria evitar tots aquest efectes no desitjats ja que les cèl·lules del trasplantament provenen del propi pacient (trasplantament autòleg) i no es necessita, o de manera molt suau, l'acondicionament. També, és important destacar que el potencial que té la teràpia gènica en aquesta malaltia està confirmat per la pròpia naturalesa si ens fixem en els pacients Fanconi

mosaics, on una única mutació somàtica corregeix una única cèl·lula mare hematopoètica i aquesta és capaç de curar el defecte del moll de l'os ja que és capaç de repoblar-lo.

Una altra evidència molt important va ser quan durant la dècada passada, més de 50 individus que patien alguna immunodeficiència monogènica van ser tractats amb cèl·lules autòlogues que havien sigut corregides genèticament amb vectors retrovirals (Fischer *et al.*, 2010). La majoria dels pacients van tenir una resposta molt beneficiosa a la teràpia, no obstant, l'ús dels vectors retrovirals va fer que alguns pacients experimentessin una leucèmia com a conseqüència de la integració del vector terapèutic en una regió propera a un oncogen i quan l'expansió del clon va repoblar el moll de l'os. Aquest fet va succeir ja que la integració dels vectors terapèutics retrovirals no és completament aleatòria sinó que s'afavoreix en regions promotores i potenciadores i els promotors d'aquests vectors són molt potents, el que afavoria l'activació dels oncògens pròxims al lloc d'inserció del genoma. Anys més tard, es va descriure l'ús de vectors lentivirals on la integració és molt més aleatòria en tot el genoma i per tant, molt més segura.

El grup del Juan Bueren va sintetitzar un vector lentiviral amb el cDNA que codifica pel gen *FANCA* corregit i després de nombroses evidències preclíniques al llarg dels anys del desenvolupament de la tècnica, va aconseguir l'aprovació de medicament orfe per part de la Comissió Europea per tal de tenir la justificació científica pel desenvolupament del medicament (Guenechea *et al.*, 2009, Jacome *et al.*, 2009, Gonzalez-Murillo *et al.*, 2010, Tolar *et al.*, 2011, Frecha *et al.*, 2012, Tolar *et al.*, 2012, Adair *et al.*, 2017). Per tal d'enriquir els progenitors hematopoètics presents en el moll de l'os es va utilitzar la selecció del marcador CD34⁺ mitjançant protocols potents de mobilització de cèl·lules mare utilitzant el plerixafor, que és una molècula que bloqueja el receptor CXCR4, el qual l'expressen les cèl·lules per ancorar-se al microambient del moll de l'os i l'administració de G-CSF i d'aquesta manera s'aconsegueix una millora en les extraccions de cèl·lules CD34⁺ ja que un dels problemes que van sorgir va ser la falta d'un nombre de cèl·lules mare hematopoètiques suficient per tal de corregir-les i realitzar el trasplantament (Rio *et al.*, 2017). Aquest protocol i el vector sintetitzat s'estan utilitzant en dos assajos clínics per tot Europa, un anomenat FANCOSTEM-1 (ref. NCT02931071) on es mobilitzen, es recol·lecten i es congelen les cèl·lules CD34⁺ per tal d'enriquir la població de cèl·lules mare hematopoètiques dels pacients que encara no han patit la fallada de moll de l'os, i un de teràpia gènica anomenat FANCOLEN-1 (ref. NCT03157804) on utilitzen el vector lentiviral corregit i es

transdueix a les cèl·lules recol·lectades en l'altre assaig clínic quan el pacient entra en fallada de moll de l'os.

1.7.4.2. Teràpia amb compostos antioxidants o antiinflamatoris

D'altra banda, l'absència de la ruta FA/BRCA funcional no només afecta a la reparació dels ICLs en el DNA sinó que s'ha vist també una implicació en la funció mitocondrial. En les cèl·lules Fanconi hi ha una alta producció de ROS i una depleció de les defenses antioxidants, com per exemple, de glutatió (GSH) (Cappelli *et al.*, 2013). També, s'ha vist que els pacients Fanconi tenen una sobreproducció de TNF- α i altres citocines proinflamatòries que afecten a la viabilitat i proliferació de les cèl·lules mare hematopoètiques (Du *et al.*, 2014). Recentment s'ha observat que els aldehids, com l'acetaldehid (derivat del consum d'alcohol) i el formaldehid (derivat del metabolisme cel·lular), són tòxics en cèl·lules Fanconi degut a que produeixen ICLs (Rosado *et al.*, 2011, Garaycochea *et al.*, 2012). És per això que s'estan realitzant assajos clínics per tal de prevenir la fallada medul·lar utilitzant fàrmacs antioxidants.

Un dels assajos clínics s'està duent a terme al *Cincinnati Children's Hospital Medical Center*, utilitzant el fàrmac antioxidant quercetina en nens amb anèmia de Fanconi (ref. NCT01720147). La quercetina és un compost flavonoid natural que es troba en una gran varietat de fruites, vegetals, fulles i grans i té un ampli rang d'activitats biològiques com la de segrestador de radicals lliures, reductor de l'oxidació, quelant de ferro, antiinflamatori i anticancerigen (Skaper *et al.*, 1997, Kobori *et al.*, 2009). Hi ha estudis que han observat un efecte beneficiós d'aquest fàrmac en l'anèmia de Fanconi i com que és una malaltia caracteritzada per una acumulació anormal de ROS i una disfunció de la resposta a l'estrès oxidatiu i també s'ha associat amb la diabetis, van estudiar la relació entre el ROS i la resistència a la insulina, observant que els ratolins Fanconi tenen característiques fenotípiques de resistència les quals estan associades amb elevats nivells de producció de ROS. El tractament dels ratolins Fanconi amb l'antioxidant natural quercetina va restaurar la senyalització de la resistència a la insulina i el fenotip propens a la obesitat com una conseqüència de l'eliminació del ROS i es va observar que era poc tòxica i que mantenia la homeòstasi metabòlica (Li *et al.*, 2012). A més a més, la quercetina té efectes preventius del càncer, els quals inclouen la inducció de la parada del cicle cel·lular, l'apoptosi i les funcions antioxidants i ja s'ha documentat el seu ús en el tractament de diferents càncers en població general tant *in vivo* com *in vitro* (Gibellini *et al.*, 2011). S'ha demostrat que la quercetina redueix tant el risc com la progressió del càncer per la seva activitat segrestadora de radicals lliures (Kobori *et al.*, 2009, Lam *et al.*, 2010, Ekstrom *et al.*,

2011) i protegeix les cèl·lules de l'estrès oxidatiu, la inflamació i el dany al DNA degut a les seves propietats antioxidants. Tant els estudis *in vitro* com *in vivo* han demostrat que pot sensibilitzar les cèl·lules canceroses a agents quimioteràpèutics (Miles *et al.*, 2014), el que permetria, des d'una perspectiva clínica, reduir la dosi dels fàrmacs tòxics, i per tant, alleugerir els seus efectes secundaris severos als pacients amb anèmia de Fanconi.

El segon assaig clínic que s'està plantejant és amb l'n-acetilcisteïna (NAC), un compost reductor dels ponts disulfur en la matriu mucosa. Es tracta de la variant acetilada de l'aminoàcid L-cisteïna i és una font excel·lent de grups sulfhidrils, que és convertida en metabòlits capaços d'estimular la síntesi de GSH en el cos, promoure la destoxicació i actuar directament com a segrestador de radicals lliures (Sun, 2010). El NAC té una capacitat d'inhibir la producció de ROS i l'apoptosi induïda pel DEB en línies limfoblastoids humanes Fanconi i protegeix els limfòcits humans extrets de sang perifèrica de pacients Fanconi de l'exposició aguda al DEB *in vitro* (Ponte *et al.*, 2011). L'exposició al NAC millora l'estabilitat genètica en limfòcits de pacients Fanconi de manera espontània i induïda per DEB, fen-t'ho dràsticament quan es combina amb l'àcid α -lipoic (α -LA) (Ponte *et al.*, 2012). Altres estudis proposen que el tractament amb NAC alleugereix els defectes hematopoètics en alguns tests animals (Reliene and Schiestl, 2006). En canvi, Columbaro i col·laboradors van caracteritzar estructuralment i bioquímicament la resposta dels limfòcits FANCA^{-/-} al NAC en l'hematopoesi dels pacients Fanconi i no van observar cap efecte en revertir el fenotip d'aquestes cèl·lules (Columbaro *et al.*, 2014). L'estudi de Q. Zhang i col·laboradors també va analitzar si el NAC prevenia o retardava l'aparició dels tumors utilitzant ratolins Fancd2^{-/-} Trp53^{+/-} i van observar que el temps de supervivència lliure de tumor dels ratolins tractats era exactament igual al dels control, indicant que no tenia un efecte en la quimioprevenió dels tumors (Zhang *et al.*, 2008).

La metformina és un fàrmac que té un bon perfil de seguretat i s'utilitza pel tractament de la diabetis. És un derivat de la guanidina i, per tant, segresta els aldehyds que indueixen dany en el DNA. També, indueix l'activació de la proteïna cinasa activada per mitogens (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) i es creu que té un efecte antidiabètic per aquest mecanisme. Zhang i col·laboradors l'any 2016 van observar que la metformina va millorar l'hematopoesi en ratolins Fancd2^{-/-} i va retardar la formació de tumors en ratolins Fancd2^{-/-} Trp53^{+/-} i, a més a més, aquests efectes beneficiosos no es van observar en els controls sans. També, va millorar els comptatges de sang perifèrica de manera ràpida i va incrementar el compartiment de

les cèl·lules mare hematopoètiques i va mantenir la quiescència de les cèl·lules i progenitors hematopoètics. També, en ratolins *Fancd2^{-/-}* i *Trp53^{+/-}* va retardar l'aparició dels tumors i va allargar el temps de supervivència lliure de tumors. Aquest mateix estudi també va veure que el tractament de metformina en cèl·lules Fanconi derivades de pacients va millorar de manera espontània els trencaments cromosòmics i la presència de figures radials (Zhang *et al.*, 2016).

Altres estudis *in vitro* mostren com el tractament amb diversos antioxidants milloren la inestabilitat cromosòmica en cèl·lules Fanconi. Entre aquests, trobem un mimètic de la SOD, el tempol, que facilita el metabolisme del ROS i les espècies reactives de nitrogen. Considerant l'estrès oxidatiu reportat en l'anèmia de Fanconi, l'estudi de Q. Zhang i col·laboradors va estudiar si el tempol prevenia o retardava l'aparició dels tumors utilitzant ratolins *Fancd2^{-/-}* *Trp53^{+/-}* i van observar que aquest fàrmac disminuïa el dany oxidatiu al DNA en fibroblasts humans Fanconi i en ratolins *Fancd2^{-/-}*, així com també en els controls WT. El tempol va retardar l'aparició dels tumors epitelials i va incrementar significativament la mitjana del temps de supervivència lliure de tumor un 38 % en els ratolins *Fancd2^{-/-}* *Trp53^{+/-}*, però sense tenir un efecte beneficiós aparent en l'hematopoesi (Zhang *et al.*, 2008).

Un altre fàrmac reportat és l' α -LA, un cofactor essencial en les reaccions metabòliques i un agent protector mitocondrial que recupera l'estat mitocondrial redox augmentant el glutatió reduït cel·lular i segrestant els radicals hidroxil, l'oxigen molecular i l'àcid hipoclorós (Han *et al.*, 1997, Prahalthan *et al.*, 2006). L'exposició a l' α -LA millora l'estabilitat genètica en limfòcits de pacients Fanconi de manera espontània però només en combinació amb el NAC quan s'indueix el dany amb el DEB (Ponte *et al.*, 2012).

D'altra banda, el compost cisteamina és un tiol segrestador d'aldehids reactius en la sang que facilita la seva eliminació i el fàrmac alda-1 és un activador de l'activitat enzimàtica d'ALDH2 que estimula l'eliminació d'aldehids reactius en la sang. També, prevé la inactivació de l'ALDH pels aldehids reactius i actua com un agonista al·lostèric, incrementant l'activitat catalítica de l'enzim (Perez-Miller *et al.*, 2010). Es suggereix el seu tractament en les malalties del moll de l'os i per la prevenció del càncer en l'anèmia de Fanconi (Van Wassenhove *et al.*, 2016). La ruta Fanconi és molt important per prevenir el dany al DNA dels aldehids endògens. El metabolisme dels aldehids podria ser modulats pel tractament de l'alda-1 (Perez-Miller *et al.*, 2010, Neubauer *et al.*, 2015), el que podria disminuir el dany al DNA i la depleció funcional de les cèl·lules del moll de l'os en els pacients Fanconi.

El resveratrol és un polifenol natural que es troba principalment al raïm. Hi ha molta literatura que ha demostrat els efectes beneficiosos d'aquest compost en millorar el deteriorament metabòlic relacionat amb l'edat i el seu paper protector en les malalties metabòliques. El resveratrol té un potent efecte anticancerígen ja que indueix l'apoptosi i inhibeix la transformació cel·lular activant la proteïna p53 (Dong, 2003). El resveratrol protegeix de la desregulació de la homeòstasis energètica, sobreregula molts enzims antioxidants, redueix l'expressió del TNF- α i el NF- κ B i inhibeix les oxidases NADPH (Csiszar, 2011). Hi ha més de 70 assajos clínics amb el resveratrol (Tome-Carneiro *et al.*, 2013). En Fanconi, la capacitat protectora del resveratrol s'ha estudiat en models murins *Fancd2*^{-/-} (Zhang *et al.*, 2014) i s'ha observat una correcció parcial del cicle cel·lular anormal de les cèl·lules mare i precursoras hematopoètiques (*hematopoietic stem and progenitor cells*, HSPC), les quals es van mantenir en un estat quiescent. D'altra banda, Columbaro i col·laboradors van caracteritzar estructuralment i bioquímicament la resposta dels limfòcits *FANCA*^{-/-} al resveratrol i no van revertir les característiques fenotípiques Fanconi. A més, les funcions mitocondrials, la producció d'ATP i el consum d'oxigen estan incrementats amb presència del resveratrol en les cèl·lules *FANCA*^{-/-} (Columbaro *et al.*, 2014).

L'estudi de Liu i col·laboradors on el nostre grup ha participat, descriu l'ús d'inhibidors de la p38 MAPK com a compostos amb efectes beneficiosos per la seva capacitat de restaurar la producció de progenitors hematopoètics a partir de cèl·lules mare totipotents induïdes (iPSCs) Fanconi (Liu *et al.*, 2014). Es tracta dels compostos doramapimod, el qual és un potent inhibidor de la p38 MAPK i de la producció de TNF- α , i del dasatinib, que inhibeix l'activitat de la cinasa BCR-ABL, les cinases de la família SRC, altres cinases oncogèniques específiques, incloent el c-KIT, les cinases del receptor efrin (EPH) i el PDGF β (Buettner *et al.*, 2008). S'ha observat que ambdós supprimeixen la sobreproducció de TNF- α dependent de TLR dels macròfags *FANCC*^{-/-} i *FANCA*^{-/-}. També, supprimeixen l'expressió del gen *TNF- α* post-transcripcionalment inhibint l'activació de la p38 MAPK. S'ha demostrat que la inhibició a curt termini de la p38 MAPK millora la capacitat de repoblació de les cèl·lules mare hematopoètiques *FANCC*^{-/-} (*hematopoietic stem cells*, HSCs) (Saadatzaheh *et al.*, 2009) i que la p38 MAPK modula la resposta a l'IFN γ en alguns tipus cel·lulars (Lee *et al.*, 2003). El dasatinib ja està indicat terapèuticament pel tractament de la leucèmia mieloide crònica (*chronic myeloid leukemia*, CML) i de la leucèmia limfoblàstica aguda (*acute lymphoblastic leukemia*, ALL). D'altra banda, s'ha observat que el doramapimod millora la derivació de les iPSCs Fanconi cap a progenitors CD34⁺/CD43⁺ i que aquest efecte va ser inclús més pronunciat en la població CD34^{hi}/CD43^{lo}, la qual conté més

protenitors multipotents. A més, quan es tracten les cèl·lules progenitores hematopoètiques (HPCs) Fanconi CD34⁺ purificades amb doramapimod, hi ha una millora en la formació d'unitats formadores de colònies de granulòcits i macròfags (*colony forming unit-granulocyte/macrophage*, CFU-GM), i per tant, es suggereix una recuperació parcial del fenotip Fanconi i es proposa que podria rescatar els defectes hematopoètics del moll de l'os dels pacients (Liu *et al.*, 2014). Això és consistent amb les dades prèvies existents de l'efecte beneficiós de la inhibició de les citocines proinflamàtòries que podrien millorar la funció del moll de l'os en els pacients Fanconi (Garbati *et al.*, 2016). A més, en l'estudi de Liu i col·laboradors també es va analitzar l'efecte del danazol, l'androgen sintètic comentat anteriorment, i van observar que també estimula la diferenciació de les iPSCs Fanconi. Tot i això, els seus efectes no són específics d'aquesta malaltia ja que també va diferenciar tant les iPSCs Fanconi corregides com les iPSCs controls (Liu *et al.*, 2014).

No obstant, tot i aquests avenços descrits a la literatura encara no hi ha una teràpia efectiva aprovada actualment. Hi ha poca informació sobre l'eficàcia d'aquests fàrmacs en recuperar el fenotip sa de les cèl·lules Fanconi i per això es requereix un estudi més profund i detallat de tots aquests fàrmacs en cèl·lules i models murins Fanconi, a part de fer-se necessària la recerca de nous agents terapèutics que poguessin ser més efectius.

1.7.4.3. Teràpies antitumorals

Les cèl·lules tumorals pateixen una alteració en els mecanismes de regulació de la divisió cel·lular a partir d'una replicació excessiva i incontrolada per canvis genètics i bioquímics, morfològics i/o immunològics que, si no s'atura, acaba penetrant en teixits adjacents i pot comprimir estructures veïnes com nervis o vasos sanguinis i en el pitjor dels casos, amb la migració i proliferació d'altres territoris, el que es coneix com a metastasi (Valastyan and Weinberg, 2011). Actualment, i des de fa ja molts anys, que bona part de la recerca actual es centra en la investigació del tractament del càncer. La teràpia antineoplàstica pretén principalment eradicar completament les cèl·lules canceroses o, en segon lloc, estabilitzar o reduir la mida del tumor per millorar la qualitat de vida dels pacients, alleugerint els símptomes i prolongant la seva supervivència. La quimioteràpia com a tractament del càncer va sorgir durant els anys 60, i prèviament a aquesta data, l'únic tractament que s'aplicava era la cirurgia i la radiació. La quimioteràpia actualment és la primera opció de tractament per molts tipus de tumors, i s'acostuma a combinar amb la cirurgia i la radioteràpia, de manera multidisciplinària. Els fàrmacs quimioterapèutics arriben a tots els teixits de l'organisme

sense diferenciar les cèl·lules malignes de les sanes, el que provoca en els pacients efectes secundaris que majoritàriament desapareixen una vegada finalitza el tractament. Les cèl·lules sanes que són amb més freqüència danyades són les que tenen una major taxa de replicació, com el moll de l'os, el sistema gastrointestinal, l'epiteli germinal de les gònades, els fol·licles pilosos i la pell, donant lloc a efectes secundaris com la immunosupressió, la mucositis, l'alopecía i l'anèmia (Lowenthal and Eaton, 1996). Un altre dels problemes associats a la quimioteràpia és l'aparició de resistències als fàrmacs com a resultat de mutacions causades per la inestabilitat genètica associada al creixement anormal del tumor, on hi ha canvis genètics aleatoris associats a mecanismes proliferatius desregulats que desenvolupen en nous genotips amb una capacitat d'evadir l'efecte dels fàrmacs (Luo *et al.*, 2009). Per tal de sobrepassar aquest problema clínic, va sorgir la quimioteràpia combinada, basada en la combinació de fàrmacs amb mecanismes d'acció diferents que podria prevenir la resistència resultant amb una sensibilitat major dels tumors, prevenint també l'administració d'altres dosis d'aquests fàrmacs. Els diferents tipus d'agents citotòxics que s'utilitzen, segons la naturalesa dels tumors, inclouen agents alquilants, com la ciclofosfamida, agents inductors d'ICLs en el DNA, com el cisplatí o el melfalan, alcaloides derivats de plantes com el paclitaxel i el docetaxel, antibiòtics antitumorals com la MMC, antimetabòlits com el 5-fluorouracil o la fludarabina, inhibidors de topoisomerasa com l'etopòsid o altres fàrmacs utilitzats com l'inhibidor de la ribonucleòtid reductasa, hidroxiurea. També, s'administren els biofosfonats com el zoledronat o hormones com l'abirateron o el tamoxifè (Crawford, 2013). Durant els últims anys s'han desenvolupat noves teràpies més específiques respecte els quimioterapèutics convencionals, que actuen sobre antígens o sobre dianes terapèutiques determinades en cada tipus de tumor, produint un efecte selectiu sobre les cèl·lules cancerígenes i provocant la seva eliminació. Un exemple són els inhibidors de la PARP que inhibeixen la reparació de trencaments de cadena senzilla i que s'utilitzen pel tractament de càncers que tenen un defecte en la HR ja que pateixen mutacions en els gens BRCA1 o BRCA2 com és el càncer d'ovari o mama, i per tant, tampoc poden reparar els DSB de manera que s'indueix la mort cel·lular (Helleday *et al.*, 2005). També, està descrit l'ús d'anticossos monoclonals (Coulson *et al.*, 2014) o agents biològics, per tractar els tumors evitant o disminuint els efectes secundaris causats per la quimioteràpia o la radioteràpia i es basen en utilitzar com a diana els processos essencials de les cèl·lules tumorals per la seva proliferació, creixement i supervivència. Una d'aquestes dianes són els receptors ErbB tirosina cinasa, com l'EGFR o el receptor del factor de creixement endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor receptor*, VEGFR), que són els més perseguits com a

potencials dianes per la teràpia del càncer. L'EGFR pertany a una família de receptors tirosina cinasa on s'inclouen l'EGFR/ERBB1, el HER2/ERBB2, el HER3/ERBB3 i el HER4/ERBB4, i juguen un paper important en la proliferació de les cèl·lules canceroses, la diferenciació i l'apoptosi com també en l'angiogènesi i la transformació maligna (Mendelsohn and Baselga, 2000). L'angiogènesi tumoral està regulada per una balança de varis factors de creixement, dels quals el factor de creixement endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) està considerat el més potent i crític (Ellis *et al.*, 2000, Soria *et al.*, 2004, Morabito *et al.*, 2006). L'estimulació del receptor EGFR/ERBB-2 incrementa l'expressió de VEGF i si es bloqueja la funció d'EGFR i/o ERBB-2 utilitzant anticossos monoclonals contra un domini extracel·lular d'EGFR, per exemple amb els fàrmacs cetuximab i panitumumab o utilitzant petites molècules que inhibeixen de manera intracel·lular el domini tirosin cinasa (gefitinib, erlotinib, etc.), es disminueix la producció de molècules proangiogèniques de les cèl·lules tumorals i s'inhibeix l'angiogènesi associada al tumor (Ellis *et al.*, 2000, Traxler *et al.*, 2004, Ciardiello *et al.*, 2006). També hi ha diferents compostos designats per inhibir VEGF/VEGFR com el sorenfenib, sunitinib, bevacizumab o ranibizumab. No obstant, la proliferació i l'angiogènesi són depenents de varies rutes bioquímiques, i el fet d'utilitzar una sola diana d'una única ruta pot fer que els tumors utilitzin rutes compensatòries per sobreviure, el que limitaria l'obtenció de resultats òptims terapèutics a llarg termini. Els mecanismes de resistència poden ser l'adquisició d'una mutació de resistència que impliqui que la diana molecular dels fàrmacs canviï i que perdi eficàcia, o bé la inactivació dels fàrmacs ja que molts compostos cal que siguin activats metabòlicament per tal de ser eficaços i les cèl·lules cancerígenes poden disminuir aquesta activació, o bé l'activació d'altres vies de reparació que reparin els danys causats per la quimioteràpia.

1.8. Mètodes de detecció de fragilitat cromosòmica

Com ja s'ha esmentat anteriorment, les proteïnes Fanconi estan implicades en la ruta de reparació FA/BRCA per tal de processar les forquilles de replicació bloquejades espontàniament o en resposta a un agent inductor d'ICLs. Pel diagnòstic de l'anèmia de Fanconi es va establir realitzar tests de fragilitat cromosòmica mitjançant metafases cel·lulars ja que resultava complicat considerar només les manifestacions clíniques dels pacients a l'hora de fer un diagnòstic, donat que moltes de les característiques clíniques es compartien entre diferents malalties. Es va estandarditzar l'ús del DEB o la MMC com a agents inductors d'ICLs ja que la inestabilitat genòmica es veu molt incrementada després del seu tractament (Auerbach, 2003). D'altra banda, una altra

manera per mesurar les aberracions cromosòmiques presents en les cèl·lules és mitjançant el test de micronuclis (MN), tot i que no està estandarditzat l'ús en el diagnòstic de l'anèmia de Fanconi. De fet, en la indústria farmacèutica, és un test que està substituint la visualització de les aberracions cromosòmiques estructurals en metafases, ja que es requereix menys expertesa i menys temps d'anàlisi.

1.8.1. Cromosomes metafàsics

Actualment, el test clàssic de fragilitat cromosòmica més utilitzat en l'anèmia de Fanconi utilitza el protocol que va estandarditzar Auerbach i col·laboradors, el qual observa metafases de limfòcits de sang perifèrica per determinar els trencaments cromosòmics (Auerbach, 2015). Les mostres de sang perifèrica s'obtenen dels pacients per tal de determinar la fragilitat cromosòmica i la induïda amb el tractament del DEB i se'ls hi afegeix algun fàrmac com la colcemida per tal d'inhibir la formació dels microtúbuls i aturar la divisió cel·lular en metafase i s'avalua amb els trencaments per cèl·lula i el percentatge de cèl·lules aberrants (figura 13B).

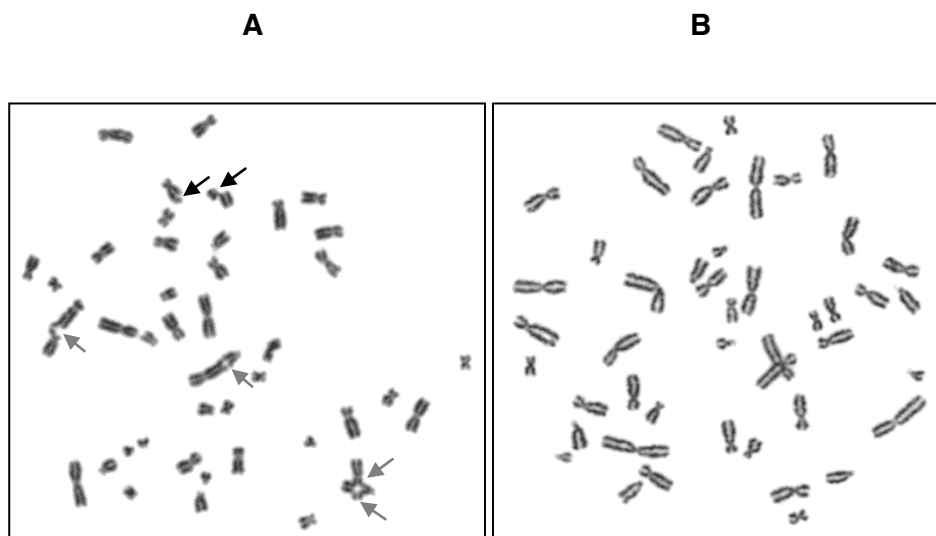


Figura 13. Metafase d'un pacient amb anèmia de Fanconi i d'un pacient sa. La imatge corresponent al pacient afectat d'anèmia de Fanconi (A) presenta múltiples trencaments cromosòmics induïts per DEB en comparació amb el control sa (B) (imatges obtingudes al laboratori).

1.8.2. Test de micronuclis

Els MN són cossos citoplasmàtics de naturalesa nuclear corresponents a fragments cromosòmics (dany clastogènic) o cromosomes sencers (dany aneugènic) que no són capaços de migrar als pols pel fus mitòtic durant la mitosis i es perden durant l'anafase, pel que no són incorporats en els nuclis de les cèl·lules filles (figura 14B). Per tant, els MN només poden aparèixer en cèl·lules que hagin patit una divisió. Com

ja s'ha esmentat, les cèl·lules Fanconi pateixen fragilitat cromosòmica i l'elevada freqüència de MN únicament es correspon al dany de tipus clastogènic, de manera que els MN reflexen aberracions cromosòmiques originades per trencaments cromosòmics ja sigui per errors durant la replicació o bé per l'exposició a agents genotòxics.

1.8.2.1. Mètode clàssic

El test de MN clàssic per quantificar el dany citogenètic el va proposar Evans i col·laboradors l'any 1959 (Evans *et al.*, 1959), tot i que després s'ha anat modificant i es tracta d'un test molt utilitzat en mutagènesi ambiental i estudis de genotoxicitat per mesurar substàncies potencialment carcinògenes. Es basa en quantificar les estructures que contenen cromatina extranuclear en poblacions cel·lulars que s'estan dividint de manera activa. Per determinar els MN s'aïllen leucòcits de sang perifèrica dels pacients i s'estimula la divisió mitòtica. Després, s'inhibeix la polimerització de l'actina de manera que s'impedeix la citocinesi i es permet la divisió nuclear, proporcionant a les cèl·lules un aspecte de binucleades monodividides (figura 14A), de manera que es quantifiquen únicament les que han completat una única mitosis després de l'exposició genotòxica, i aquestes cèl·lules són fàcilment reconegudes perquè són les binucleades.

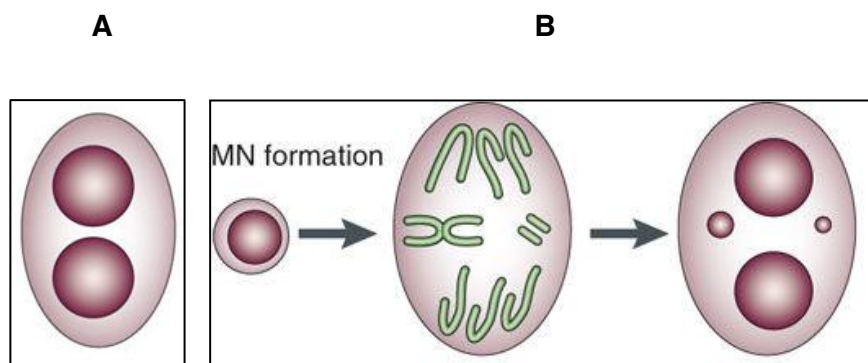


Figura 14. Cèl·lules binucleades (A) i MN originats per cromosomes sencers o fragments cromosòmics (B). Els MN només es poden observar en cèl·lules que estan dividint-se de manera activa (Fenech, 2007).

1.8.2.2. Citometria de flux

L'any 1986, el grup de Callisen i col·laboradors ja es va adonar que la simplicitat del test de MN feia que tingués un molt bon potencial per ser automatitzat (Callisen *et al.*, 1986). Des de llavors, s'han posat a punt diferents tècniques utilitzant l'anàlisi d'imatges i la densitometria del DNA (Fenech *et al.*, 1988, Bocker *et al.*, 1996, Diaz *et al.*, 2007, Decordier *et al.*, 2009) com també la citometria de flux (Nusse and Kramer,

1984, Nusse *et al.*, 1987, Nusse *et al.*, 1994, Roman *et al.*, 1998), per tal de quantificar els MN, i la tècnica que ha estat més utilitzada i estandarditzada és la que va desenvolupar el grup de Nüsse i Kramer (Nusse and Kramer, 1984) que implicava la lisi de les membranes externes de la cèl·lula i l'ús d'una o més tincions d'àcid nucleic, per tal de discriminar els nuclis alliberats i els MN en funció de les intensitats de les diferents tincions. No obstant, la tècnica que va descriure aquest grup va mostrar molts problemes per tal de discriminar de manera fiable els MN, ja que hi havia molta detecció de debris i aquesta tècnica va prendre realment molta importància quan es van realitzar diferents modificacions per tal de sobrepassar aquests problemes utilitzant una tinció dual seqüencial i l'ús de citòmetres més nous amb millor resolució i millors finestres d'anàlisi (Wessels and Nusse, 1995, Roman *et al.*, 1998). A més a més, la necessitat d'estudiar moltes dosis d'un mateix fàrmac per tal de provar la seva toxicologia i d'incloure moltes rèpliques per tal de validar els resultats obtinguts, va fer que el grup de Bryce i col·laboradors adaptessin la tècnica de detecció de MN per citometria de flux utilitzant plaques de 96 pous, tant en cèl·lules en suspensió com adherides a la placa, on tot el processament de les cèl·lules, incloent la tinció i la lisi es dona dins de la mateixa placa, de manera que es podien estudiar un gran nombre de concentracions i incloure molts replicats d'aquests. En aquest estudi també utilitzen un robot adaptat al citòmetre per l'adquisició de les mostres de manera automàtica, així l'automatització de la tècnica encara va ser més elevada (Bryce *et al.*, 2010).

1.9. Cribatges de fàrmacs

Actualment, hi ha a prop de 7000 malalties rares o minoritàries amb un percentatge de la població global afectada del 6-8 % (Puiu and Dan, 2010) i, tot i que hi ha molts avenços en el coneixement d'aquestes malalties i el seu diagnòstic, encara és un repte el desenvolupament de tractaments específics. Una de les dificultats amb les que ens enfrontem davant d'aquestes malalties minoritàries és el fet de reunir suficients pacients per estudiar les noves teràpies. Una altra complicació que es dona en els assajos clínics associada amb l'escassetat dels pacients és que la seva monitorització per definir els grups de tractament no és homogènia, especialment per les malalties que tenen una alta influència pel fons genètic. Tampoc es coneix molt la fisiopatologia de la malaltia, el que dificulta el desenvolupament de teràpies específiques. Cal tenir en compte que si les malalties rares, com en aquest cas l'anèmia de Fanconi, impliquen l'afectació en nens, també hi ha complicacions regulatòries. A més a més, la raresa de les malalties fa que la indústria farmacèutica perdi interès ja que suposa invertir molt de temps i diners sense que hi hagi un gran benefici econòmic. Es

requereixen 10-15 anys aproximadament des de que es descobreix una nova molècula fins la seva aprovació comercial, i les taxes d'èxit d'aquest procés són de menys del 5 % (Paul *et al.*, 2010). Segons el *Tufts Center for the Study of Drug Development*, cada nou fàrmac que es porta al mercat té un cost estimat de 2558 milions de dòlars (DiMasi *et al.*, 2016). És per això que una manera per limitar aquest cost és el reposicionament de fàrmacs, on una molècula que ja ha estat utilitzada i aprovada com una teràpia eficient per humans, s'utilitza per tractar una malaltia diferent (Sun *et al.*, 2017).

Tant la indústria farmacèutica com la recerca acadèmica utilitzen estratègies de descobriment de fàrmacs basades en els mecanismes d'acció o en canvis fenotípics (figura 15). Els sistemes basats en els mecanismes d'acció utilitzen dianes moleculars com per exemple, funcions anormals d'una proteïna o rutes metabòliques alterades i es desenvolupen assaigs bioquímics per tal de dur a terme cribatges d'alt rendiment (*high-throughput screenings*, HTS) utilitzant biblioteques amb centenars de milers de compostos. En canvi, els sistemes basats en els canvis fenotípics impliquen identificar defectes funcionals que caracteritzin una malaltia específica, i els compostos són estudiats en models cel·lulars o animals per la seva capacitat en corregir el fenotip alterat (Zheng *et al.*, 2013). Aquests cribatges s'anomenen d'alt contingut (*high-content screenings*, HCS) i permeten estudiar desenes de milers de fàrmacs.

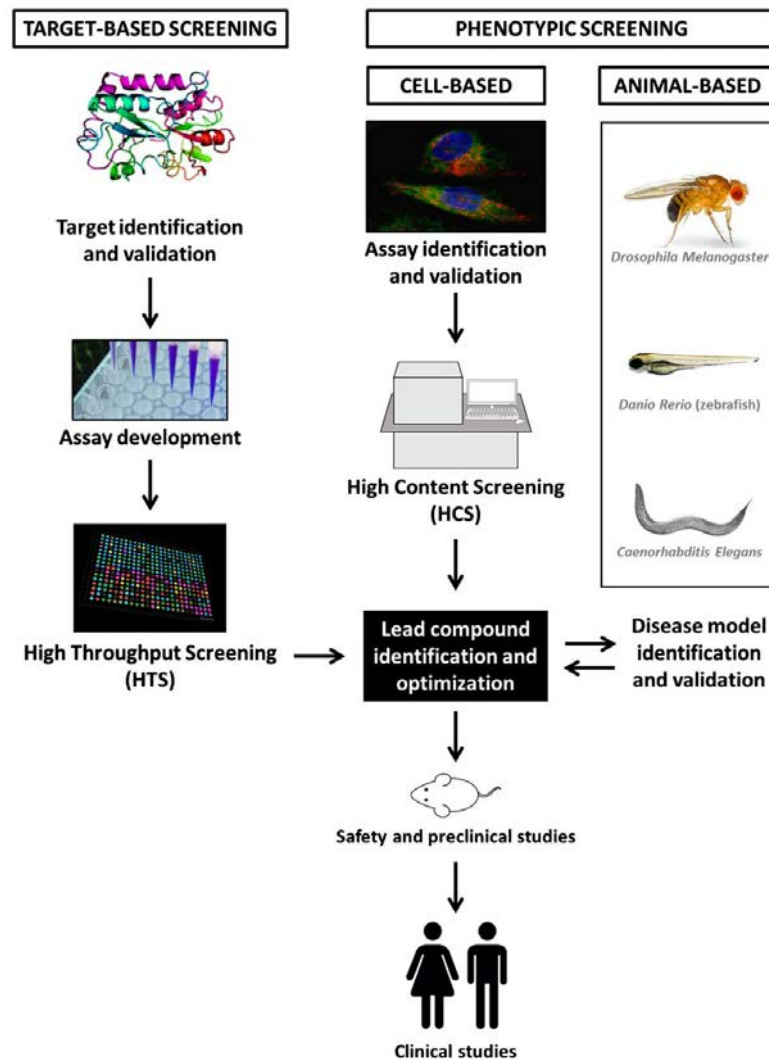


Figura 15. Principals aproximacions per identificar nous fàrmacs (Bellomo *et al.*, 2017)

1.9.1. HCS en models cel·lulars

Els HCS que utilitzen models cel·lulars acostumen a utilitzar la microscopia automàtica per tal d'obtenir informació de diferents paràmetres en milers de mostres, com per exemple la morfologia, la intensitat i la distribució de la fluorescència en les cèl·lules. A diferència d'utilitzar models animals, aquests cribatges cel·lulars són molt ràpids ja que poden mesurar diferents paràmetres simultàniament i és per això que s'estan utilitzant molt per identificar noves dianes farmacològiques. Els factors limitants d'aquests cribatges són el nombre de plaques a analitzar, les mostres per placa, el nombre de canals de fluorescència, la intensitat de la llum, la magnificació de les imatges que està associada amb el nombre de camps que es poden adquirir i la definició de les imatges (Buchser *et al.*, 2004). El fenotip cel·lular representa l'element més crític i es recomana utilitzar línies cel·lulars immortalitzades i no cultius cel·lulars primaris, ja que són més fàcils d'expandir, més estables, més fàcils de transfectar, transduïr, marcar o tenyir.

Els microscopis que s'utilitzen requereixen de sistemes automàtics per dur a terme tant l'adquisició de les imatges com l'emmagatzematge i també un sistema d'autoenfocament. Les imatges cal que es processin amb un programa de software específic adaptat a cada experiment per tal de detectar els "objectes" primaris, que són normalment els nuclis, i després els "objectes" secundaris que són més variables entre els diferents cribatges, com per exemple la formació de *foci*, el citoplasma, orgànuls o citoesquelet. Aquest software es basa en llinars d'intensitat i algorismes de segmentació per tal de processar les imatges i els resultats s'expressen com a candidats positius o negatius en comparació amb els valors control. També es pot utilitzar la citometria de flux per tal de mesurar cèl·lules individuals en una mateixa població (Buchser *et al.*, 2004). Tots els cribatges requereixen experiments previs que controlin la qualitat de l'estratègia a seguir i normalment es comparen els controls positius i negatius amb el càlcul del factor Z' el qual reflecteix la qualitat d'un assaig cel·lular per tal de predir si serà útil o no, i es refereix a la magnitud de la separació entre els resultats generats com a senyal negativa i senyal positiva (figura 16, és la banda de separació). Això assegura que un candidat positiu en un cribatge pot ser identificat de manera segura i distingir-se bé d'un compost sense cap efecte (Zhang, 2011).

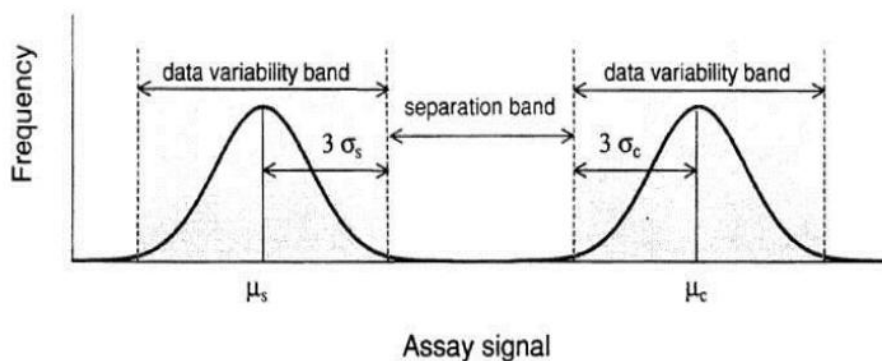


Figura 16. Gràfic explicatiu del factor Z'.

1.9.2. Cribatges de compostos en l'anèmia de Fanconi

Fins el moment, no hi ha estudis que hagin desenvolupat cribatges de compostos utilitzant sistemes cel·lulars per tal de corregir el fenotip alterat de l'anèmia de Fanconi. No obstant, la ruta FA/BRCA és necessària per reparar els ICLs generats pels agents quimioterapèutics com el cisplatí quan s'administren per tractar i reduir els tumors, sempre que no siguin pacients Fanconi. El fet de tenir una ruta FA/BRCA funcional implica que usualment es desenvolupin resistències dels tumors a aquests agents, com per exemple en el càncer de mama o ovari (Forastiere *et al.*, 1982, Harper, 2002,

Balch *et al.*, 2004). Així doncs, en aquest cas sí que s'estan dedicant molts esforços i designant noves estratègies per tal de millorar la sensibilitat dels tumors als agents inductors d'ICLs i poder dissenyar teràpies combinatòries que inhibeixin les rutes de reparació del DNA en combinació amb els agents quimioteràpèutics (Brown *et al.*, 2017). Un d'aquests abordatges és la inactivació de la ruta FA/BRCA per evitar la reparació dels ICLs, i així, conduir les cèl·lules tumorals a la mort cel·lular. L'estudi de Chirnomas i col·laboradors, l'any 2006, es basa en que el complex central Fanconi format per les proteïnes Fanconi *upstream* s'encarrega de monoubiquitinar la proteïna FANCD2 en presència d'ICLs en el DNA i aquesta és dirigida a la cromatina formant *foci* nuclears. Van dissenyar un HCS utilitzant un sistema cel·lular basat en la identificació d'inhibidors de la ruta FA/BRCA per la inhibició de la formació de *foci* de FANCD2 en resposta a la radiació ionitzant, utilitzant una línia cel·lular FANCD2^{-/-} transduïda amb un plàsmid que expressava l'EGFP-FANCD2, de manera que únicament la proteïna FANCD2 exògena s'expressa en el sistema, però no l'endògena. Es van estudiar 5545 compostos i es van identificar 4 inhibidors de la ruta FA/BRCA, entre ells 3 proteïnes cinases i la curcumina, un compost natural (figura 17) (Chirnomas *et al.*, 2006). L'any 2012, el mateix grup va repetir el cribatge utilitzant el mateix sistema cel·lular i van estudiar l'efecte de 16.000 compostos, en el que van identificar 26 molècules que inhibien la formació de *foci* de FANCD2 induïda també per la radiació ionitzant (figura 17) (Jacquemont *et al.*, 2012). L'any 2013, l'estudi de Jun i col·laboradors va realitzar un cribatge també amb la finalitat d'elevat l'eficàcia dels fàrmacs antitumorals utilitzant una teràpia combinatòria. En aquest cas, van dissenyar un sistema cel·lular basat també en la inhibició de la formació de *foci* de FANCD2. Es va estudiar l'efecte de 1.280 compostos induint l'activació de la ruta FA/BRCA amb el tractament de MMC i es va identificar 1 inhibidor. A més a més, no es va detectar la fluorescència *in vivo* com els estudis anteriors, sinó que per observar el marcatge dels *foci* de FANCD2, es va realitzar la tècnica de la immunofluorescència utilitzant anticossos fluorescents contra aquesta proteïna (Jun *et al.*, 2013).

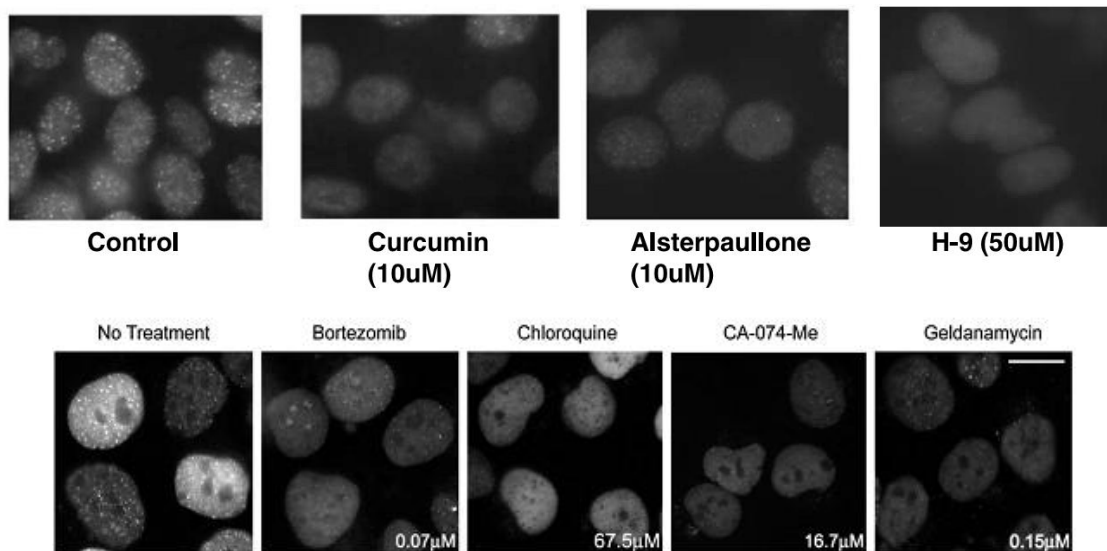


Figura 17. Inhibició dels *foci* per alguns dels compostos inhibidors de la ruta FA/BRCA identificats (Chirnomas *et al.*, 2006, Jacquemont *et al.*, 2012).

Objectius

2. Objectius

Objectiu principal:

L'objectiu principal d'aquest treball és trobar fàrmacs en fase preclínica per curar o retardar les manifestacions clíniques de l'anèmia de Fanconi: fallada de moll de l'os i desenvolupament de tumors sòlids.

Els objectius específics són:

- Desenvolupar dos assajos per mesurar de manera sensible, fiable, quantitativa i ràpida diferències de biomarcadors de les cèl·lules Fanconi.
- Realitzar cribatges de fàrmacs principalment aprovats pel seu ús clínic utilitzant els assajos desenvolupats amb l'objectiu de reposicionar-los pel tractament de l'anèmia de Fanconi.
- Validar els fàrmacs candidats en models murins de la malaltia.

Materials i mètodes

3. Materials i mètodes

3.1. Reactius i compostos

El bromur d'etidi monoazida (EMA, ref. e1374), el medi Opti-MEM (ref. 31985-070), el *kit* de quantificació de proteïna *BCA Protein Assay* (ref. 23227), el marcador de pes molecular de proteïnes (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, ref. 26619), el *kit* iBlot® 2 *Dry Blotting System* (ref. IB21001), el *kit* Pierce® *ECL western Blotting Substrate* (ref. 32106), el SYTOX® *Green* (ref. S7020), el Hoechst® (ref. H1399) i el tampó fosfat salí (PBS) (ref. 18912-014) es van obtenir de ThermoFisher Scientific. L'IGEPAL (ref. I8896), el DAPI (ref. D9542), el diepoxibutà (ref. 202533-16), l'acetaldehid (ref. 00071), l'n-acetilcisteïna (ref. A9165), el resveratrol (ref. R5010), el danazol (ref. D8399), la quercetina (ref. Q4951), l'n-propil-galat (ref. P3130), l'ambroxol (ref. A9797), l'apigenin (ref. A3145), el tempol (ref. 42777), la cisteamina (ref. 30080), l'alda-1 (ref. SML0462), l'àcid α -lipoic (ref. T1395), l'acrilamida al 30 % (ref. A3574), el persulfat amònic (APS, ref. 248614), el blau de bromofenol (ref. B-8026), el tween-20 (ref. 93773), l'azida sòdica (ref. S2002), la sacarosa (ref. S0389), l'àcid cítric (ref. C0759), la hidroxurea (ref. H8627-56), la mitomicina C (ref. M-0503), el clorur de magnesi (ref. M8266), el β -mercaptoetanol (ref. M3148), la sulforodamina B (ref. S1402), l'àcid tricloracètic (ref. T6399), el tritó X-100 (ref. T8787), l'albumina sèrica bovina (ref. A7906), els inhibidors de proteases (*Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, ref. 04693159001) i de fosfatases (*PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets*, ref. 04906837001) es van obtenir de Sigma-Aldrich i la RNasa A (ref. 12091021), el reactiu de transfecció Lipofectamine® 2000 (ref. 11668019), el glicerol (ref. 15514-011) i el β -mercaptoetanol (ref. 31350-010) d'Invitrogen. El formaldehid (ref. M134), l'àcid acètic glacial (ref. 20104.298) i l'HEPES (ref. 441485H) es van comprar a VWR i la D- α -tocoferilquinona (ref. SC-200821), el doramapimod (ref. SC-300502) i el dasatinib (ref. SC-358114) a Quimigen. El medi *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI, ref. L04495), el medi *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM, ref. L0104), els aminoàcids no essencials (ref. X0557), el sèrum fetal boví (FBS, ref. S181B), el piruvat sòdic (ref. L0642) i la penicil·lina-estreptomicina (ref. L0022) es van comprar a Biowest. L'antibiòtic plasmocín (ref. ant-mpt) d'Invivogen. El tampó de lisi RIPA 10x (ref. 20-188) es va comprar a Millipore i el *kit High Pure RNA Isolation* (ref. 11828665001) i el LightCycler® *FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I* (ref. 03752186001) es van obtenir de Roche. L'enzim nucleasa benzonasa (ref. 70746) es va comprar a Novagen®. El tampó de Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8 (ref. 1610799), el tampó de Tris-HCl 1,5 M a pH 8,8 (ref. 1610798) i el tampó salí Tris 1X (TBS, ref. 170-

6435) es van comprar a BioRad Laboratories i el dodecilsulfat sòdic (SDS, ref. 142363.1211), el Tris (ref. 141940.0914) i la tetrametiletildiamina (TEMED, ref. A1148,0100) es van obtenir de Panreac Applichem. La llet desnatada en pols Nidina 2 Premium (ref. 368100,1) a Nestle. El paraformaldehid (PFA) al 4 % en PBS (ref. SC281692) es va comprar a Santa Cruz Biotechnology, la tinció vectashield antifade vector (ref. H-1000) es va obtenir de Vector Laboratories, el clorur de sodi (ref. 3957.1) de Carl Roth, el citrat de sodi (ref. A12274) de AlfaAesar i el *kit High Capacity RNA-to-cDNA* (ref. 4387406) d'Applied Biosystems. L'aigua miliQ es va obtenir a partir de l'aparell Simplicity 185 (Millipore, ref. SIMPAKOR1).

3.2. Línies cel·lulars i cultiu

La línia cel·lular limfoblastoid humana LFA139 prové de donants sans i les línies cel·lulars LFA55, LFA88 i LFA145 provenen de pacients amb anèmia de Fanconi amb mutacions bial·lèliques al gen *FANCA*. La línia cel·lular U2OS es va establir al 1964 i pertanyia al teixit ossi d'un osteosarcoma de la tibia d'una dona de 15 anys (ref. ATCC® HTB-96™). Les línies de HNSCC VU1131-T2.8 (*FANCC*^{-/-}), VU1604-T (*FANCL*^{-/-}) i VU1365-T (*FANCA*^{-/-}) provenen de pacients amb anèmia de Fanconi i la VU040-T d'un pacient no Fanconi (*wild-type*, WT), i van ser proporcionades per la Dra. Josephine Dorsman (*VU University Medical Center*, Amsterdam). Els fibroblasts primaris PN provenen de pell d'un donant sa i la línia FA551 de pell d'un pacient Fanconi amb mutacions bial·lèliques al gen *FANCA*.

Les línies cel·lulars limfoblastoids van ser cultivades en RPMI, suplementat amb un 20 % de FBS inactivat per calor, 1X penicil·lina-estreptomicina, piruvat sòdic, aminoàcids no essencials i β-mercaptoetanol. Les cèl·lules es van mantenir a una concentració d'entre 0,5-1,5 x 10⁶ cèl·lules per ml utilitzant flascons de 75 cm² en posició vertical i es van realitzar dilucions 1:3-1:4 cada 3-4 dies. Les línies U2OS (U2OS *FANCA*^{-/-}-YFP-FANCD2 i U2OS *FANCA*corrected-YFP-FANCD2), els HNSCCs i els fibroblasts primaris es van mantenir en monocapa en flascons de 75 cm² i es van diluir cada 3-4 dies entre 1:4 i 1:8, controlant que no arribessin a confluència. Les línies U2OS i els HNSCCs van ser cultivats en medi DMEM, suplementat amb un 10 % de FBS inactivat per calor i amb plasmocín a 2,5 µg/ml. En canvi, els fibroblasts primaris PN i FA551 es van cultivar amb medi DMEM suplementat amb un 20 % de FBS inactivat per calor, plasmocín 2,5 µg/ml, piruvat sòdic, aminoàcids no essencials i β-mercaptoetanol. Tots els cultius cel·lulars es van mantenir en incubadors a 37 °C i 5 % de CO₂.

3.3. Assaig de MN per citometria de flux

Es van plaquejar 60.000 cèl·lules/pou en plaques de 96 pous de la línia cel·lular LFA55 en 120 µl/pou de medi i es van deixar en incubació a 37 °C i 5 % de CO₂ durant 30 minuts. Després, es va afegir el compost antioxidant a una concentració final de 100 µM partint d'un stock de 10 mM o bé, el compost antitumoral a una concentració final de 1, 5 i 10 µM partint d'un stock de 10 mM. En el cas de les cèl·lules U2OS FANCA^{-/-} i U2OS WT, es van plaquejar 2x10⁵ cèl·lules en cada pou d'una placa de 6. A les 4-6 hores es va tractar amb el compost candidat reactivador de la ruta FA/BRCA a concentracions 1 i 10 µM i 24 hores més tard, es van tractar amb DEB a 0,05 o 0,1 µg/ml.

Després de 72 hores en cultiu, es van comptar les cèl·lules del cultiu no tractat per tal de comprovar que s'havien dividit, almenys, una vegada (en el cas de les cèl·lules que no creixien en suspensió, es van tripsinitzar prèviament). La mitosi és un prerrequisit per l'expressió dels MN, i per tant, és un pas important demostrar que la divisió cel·lular està succeint.

En el cas de la línia cel·lular LFA55, la tinció es va realitzar en les mateixes plaques de 96 pous on es van tractar les cèl·lules amb els fàrmacs i els agents inductors de dany. Les cèl·lules es van concentrar en un botó cel·lular per centrifugació a 800 revolucions per minut (rpm) durant 8 minuts. Es va aspirar el medi per tal de deixar un petit volum per cada pou amb la pipeta multicanal de 8 puntes i després de resuspendre suaument el botó cel·lular, es van afegir 12,5 µl/pou de solució EMA 0,125 mg/ml i 50 µl/pou de PBS amb el 2 % FBS. Seguidament, es van submergir les plaques en gel i es va procedir amb el pas de fotoactivació utilitzant una bombeta de llum visible de 60 W a 30 cm d'altura durant 20 minuts. Un cop passat aquest temps, les cèl·lules es van protegir de la llum i es van afegir a cada pouet 200 µl de PBS amb un 2 % de FBS inactivat per calor, prèviament refredat a 4 °C. Les mostres es van tornar a recollir en un botó cel·lular per centrifugació (800 rpm, 8 minuts) i es va aspirar la solució del sobrenedant amb la pipeta multicanal de 8 puntes. Aquest últim pas es va repetir una vegada més, i es van deixar reposar les mostres protegides de la llum durant 20 minuts. Es va afegir a cada pou 50 µl de solució de lisi 1 (0.584 mg/mL de NaCl, 1 mg/mL de citrat de sodi, 0,3 mg/mL de RNasa A i 1 µg/mL de tinció nuclear DAPI, dissolts en aigua desionitzada) i es van resuspendre les mostres suaument amb el vòrtex adaptat a plaques. Es van mantenir les mostres a temperatura ambient durant 1 hora i després, es van afegir 50 µl de solució de lisi 2 (85,6 mg/mL de sacarosa, 15

mg/mL d'àcid cítric i 1 µg/mL de tinció nuclear DAPI, dissolts en aigua desionitzada) i es van tornar a resuspendre amb el vòrtex. Es va deixar actuar la segona solució de lisi durant 30 minuts a temperatura ambient i es van guardar les mostres a la cambra freda de 4 °C segellades amb parafilm i protegides de la llum amb paper d'alumini. Al dia següent, es van traslladar les mostres a l'Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trías i Pujol, on disposen del citòmetre de flux BD LSRFortessa™ (BD Biosciences). Es va afegir 70 µl d'una barreja de solució de lisi 1 i 2 i es van analitzar les mostres automàticament a temperatura ambient.

Les mostres guardades a 4 °C durant tota la nit es van analitzar al dia següent utilitzant el citòmetre de flux BD LSRFortessa™. La configuració i l'adquisició de les dades es van controlar amb el software Cell Quest V3.3. La fluorescència d'emissió associada al DAPI es va detectar amb el làser violeta amb una longitud d'ona d'excitació de 405 nm i un filtre de 450/40, i la fluorescència associada a l'EMA es va detectar amb el làser blau amb una línia d'excitació de 488 nm i un filtre de 695/40. Les finestres d'anàlisi per avaluar els MN es van desenvolupar seguint 8 criteris de selecció per tal de que els milers d'events inicials fossin filtrats i classificats com a MN o nuclis (n i 2n) i també per determinar la fase del cicle cel·lular de les cèl·lules (figura 18). La incidència de MN es va expressar com el percentatge de MN cada 1.000 nuclis analitzats i es basa en l'adquisició de 20.000 nuclis EMA-negatius per mostra. L'anàlisi dels arxius generats pel citòmetre es va realitzar amb el software FlowJo® v10.

En canvi, en el cas de les cèl·lules U2OS FANCA^{-/-} i U2OS WT es va modificar el protocol de processament de les mostres ja que per problemes logístics es va utilitzar el citòmetre BD FACSCalibur™, del qual disposa el Servei de Citometria de l'IBB. Les modificacions respecte el protocol descrit van ser l'ús de tubs de citòmetre, en comptes de plaques de 96 pous, i 25 µl/pou de solució EMA 0,125 mg/ml i 100 µl/pou de PBS amb el 2 % de FBS. A més a més, la solució de lisi 1 en aquest cas contenia 0.584 mg/mL de NaCl, 1 mg/mL de citrat de sodi, 0,3 mg/mL de RNasa A i 0,04 µl/mL (0,2 µM) de tinció nuclear SYTOX® Green dissolts en aigua desionitzada, i la solució de lisi 2 contenia 85,6 mg/mL de sacarosa, 15 mg/mL d'àcid cítric i 0,04 µl/mL de tinció nuclear SYTOX® Green, dissolts en aigua desionitzada. La fluorescència d'emissió associada al SYTOX® Green es va detectar amb el làser blau amb una línia d'excitació de 488 nm i un filtre de 530/30, i la fluorescència associada a l'EMA es va detectar amb el làser blau amb una línia d'excitació de 488 nm i un filtre de 670.

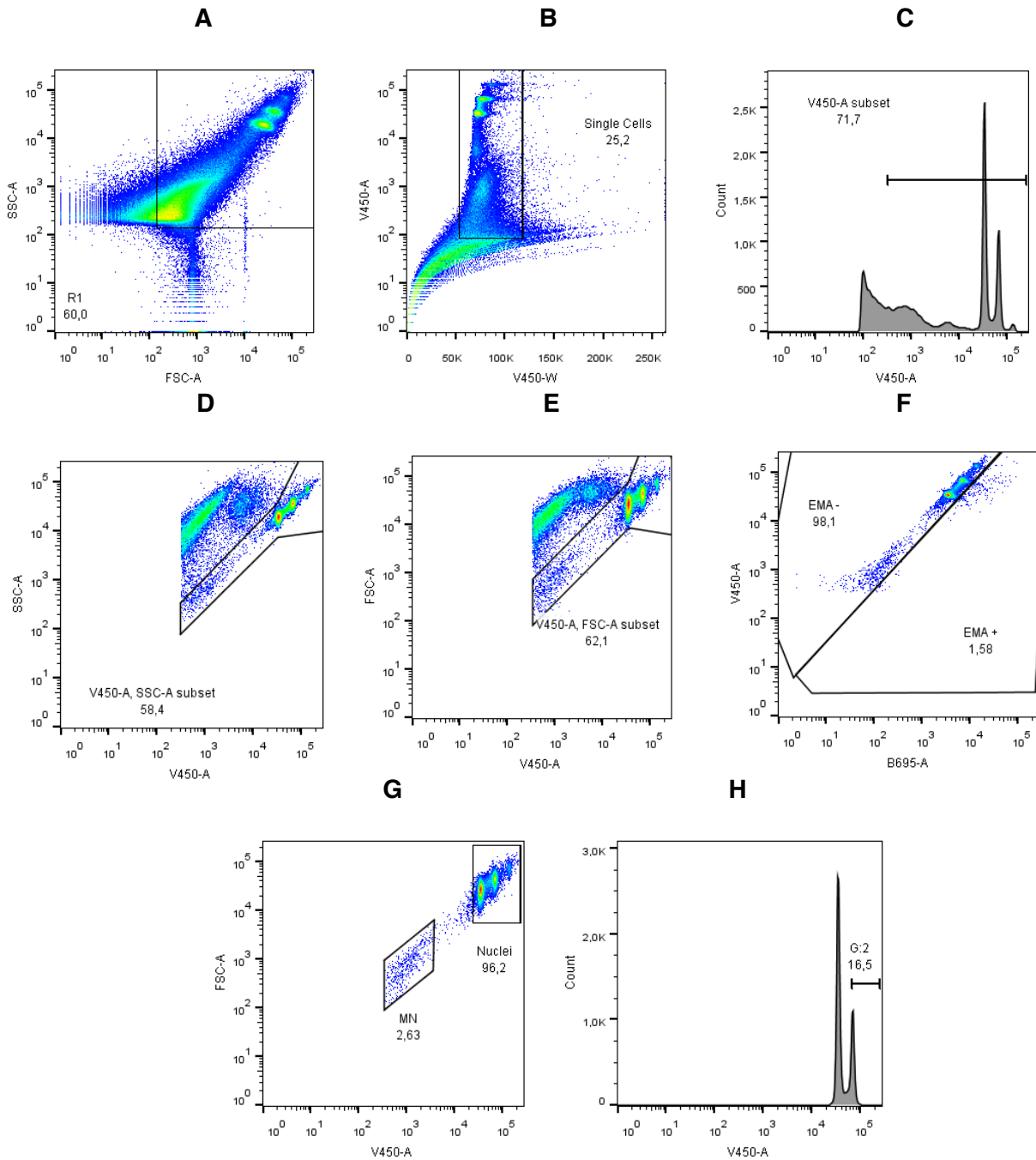


Figura 18. Finestres d'anàlisi de la línia cel·lular LFA55 en l'assaig de MN per citometria de flux (FCM) per obtenir la freqüència de MN i el bloqueig en G2/M. A) FSC-A vs SSC-A. Inclou els events que són 1/100 de la mida del nucli (FSC) i 1/100 de la granularitat del nucli (SSC). B) DAPI-W vs DAPI-A. La finalitat de la finestra de discriminació de doblats és excloure els events que tenen uns valors elevats de fluorescència DAPI. C) Histograma de DAPI-A. Exclou els events que tenen fluorescència DAPI més petits que 1/100 de la població en G1. D) DAPI-A vs SSC-A. Aquesta finestra inclou tots els nuclis i events que tenen una granularitat i fluorescència d'1/100 de la població en G1. E) DAPI-A vs FSC-A. Inclou tots els nuclis i events que tenen una mida i fluorescència d'1/100 de la població en G1. F) EMA-A vs DAPI-A. L'estratègia d'anàlisi dels events EMA positiu i EMA negatiu permet l'exclusió dels events apoptòtics o necròtics. G) DAPI-A vs FSC-A. Els events que compleixen totes les condicions descrites es classifiquen en aquest gràfic on podem distingir els nuclis i els MN. Els MNs es defineixen com els events entre 1/100 i 1/10 de la fluorescència associada al DAPI dels nuclis 2n. H) Histograma DAPI-A. Els nuclis acceptats en la classificació final es poden analitzar pel contingut de DNA utilitzant la fluorescència DAPI per mesurar les cèl·lules bloquejades en fase G2/M.

3.4. Assaig de supervivència cel·lular

3.4.1. Comptador Beckman-Coulter

Es van sembrar 1×10^5 cèl·lules U2OS FANCA^{-/-}-YFP-FANCD2 i U2OS FANCAcorrected-YFP-FANCD2, 2×10^4 de la línia de HNSCC VU1131-T2.8 i VU040-T o 5×10^4 dels fibroblasts primaris FA551 i PN, per duplicat en plaques de 6 pous. En el cas dels assajos funcionals per l'estudi del fenotip dels clons obtinguts sense expressió de FANCA, a les 24 hores, es va procedir amb el tractament de l'agent mutagènic MMC amb una corba de dosis de 1 a 100 nM, que es va deixar actuar 72 hores a 37 °C i en atmosfera del 5 % de CO₂. En la validació de l'efecte dels fàrmacs antitumorals en les línies HNSCC i fibroblasts primaris, a les 4-6 hores després del plaqueig, es va procedir amb el tractament dels fàrmacs a una corba de dosis de 0,1, 0,3, 1, 3 i 10 µM i també, amb l'agent mutagènic MMC a una corba de 1 a 100 nM, i es van deixar actuar durant 7 dies a 37 °C i en atmosfera del 5 % de CO₂. Seguidament, es van tripsinitzar les cèl·lules i es van comptar utilitzant el comptador Z series Coulter Counter (Beckman-Coulter). Els resultats es van expressar com la disminució de la supervivència respecte els controls no tractats per a cada línia cel·lular analitzada.

3.4.2. Assaig de sulforodamina en plaques de 96 pous

La segona validació dels compostos antitumorals candidats es va determinar utilitzant l'assaig colorimètric de sulforodamina B (SRB) (Skehan *et al.*, 1990). Es van utilitzar plaques de 96 pous i es van sembrar 1.000 cèl·lules/pou de les línies HNSCC VU1131-T2.8, VU1365-T i VU1604-T 100 cèl·lules/pou dels fibroblasts primaris FA551 i PN en un volum final de 100 µl. A les 4-6 hores, es van tractar les cèl·lules amb els compostos antitumorals seleccionats amb una corba de dosi de 0,01-10 µM, realitzant 6 replicues per cada concentració. Els pous dels extrems de la placa es van descartar per evitar l'evaporació del medi.

També, es va afegir el mateix volum de medi en alguns pous a part per tal de determinar el valor del background al finalitzar l'experiment. Després d'un mínim de 3 divisions cel·lulars o una setmana de creixement, es va procedir amb la fixació de les cèl·lules adherides amb àcid tricloracètic (TCA) al 30 % durant 1 hora a temperatura ambient, per tal de preparar el pH i millorar la unió de la proteïna SRB. Es va descartar el medi+TCA de les plaques abocant-lo a la pica. Es van rentar les plaques submergint-les 6 vegades en aigua de l'aixeta per tal d'eliminar el TCA i es va eliminar l'excés d'aigua amb paper. Després, es van deixar assecar els pous fins que no es va observar humitat a dins. Es van tenyir les cèl·lules amb 40 µl/pou de SRB al 0,4 %

dissolt en una solució d'àcid acètic al 1 % i es va deixar durant 30 minuts a temperatura ambient en agitació suau. Es va descartar la solució de SRB de les plaques abocant-les a la pica i es van submergir tres vegades en una solució d'àcid acètic al 1 % per tal d'eliminar la unió inespecífica del colorant. L'excés d'àcid acètic es va eliminar i els pous es van deixar assecar a temperatura ambient fins que no es va observar humitat. Es van afegir 200 µl de solució Tris 10 mM a pH 10 i es van incubar les plaques a temperatura ambient en agitació per tal de solubilitzar i homogeneïtzar la SRB. L'absorbància es va mesurar utilitzant el lector de microplaques (Sunrise™, Tecan) i es va mesurar la seva absorbància a 495 nm. La viabilitat cel·lular es va calcular per cada pou de la manera següent:

$$(\text{OD495 de les cèl·lules tractades} - \text{OD495 del medi}) / (\text{OD495 de les cèl·lules control} - \text{OD495 del medi}) * 100$$

La concentració mitjana màxima inhibidora (IC50) es va determinar realitzant línies de tendència logarítmiques i extrapolant els valors en l'equació utilitzant el programa GraphPad. Per determinar quins fàrmacs eren millors candidats pel tractament dels tumors sense afectar el creixement de les línies primàries, es va calcular una ràtio dividint la IC50 de la línia no tumoral FA551 entre la mitjana de les IC50 de les 3 línies tumorals VU1131-T2.8, VU1604-T i VU1365-T.

3.5. Assaig de *Western blot*

Per tal d'observar l'expressió de FANCA o la monoubiquitinació de la proteïna FANCD2, es van sembrar 2×10^5 cèl·lules U2OS, U2OS FANCA^{-/-}-YFP-FANCD2 o U2OS FANCAcorrected-YFP-FANCD2 en cada pou d'una placa de 6 pous. En l'estudi de l'efecte dels fàrmacs reactivadors de la ruta FA/BRCA, a les 4-6 hores es van tractar amb el compostos seleccionats a concentracions 1 i 10 µM i en el cas de l'estudi de l'efecte dels fàrmacs antitumorals en línies de HNSCC, a concentracions 1, 5 i 10 µM. A les 24 hores, es va procedir amb el tractament de l'agent mutagènic HU a dosi 2 mM o MMC a dosis 0,5, 1 i 2 mg/ml, afegint el volum adient en el medi de cultiu i es va deixar actuar 24 hores. Les cèl·lules es van recol·lectar per raspai i es van lisar a 4 °C amb el tampó de lisi que contenia RIPA 1X, inhibidors de fosfatases, inhibidors de proteases i nucleasa benzona 1000X. Els lisats es van incubar a 37 °C en agitació constant durant 10 minuts. i es van sonicar mantenint les mostres a 4 °C, a una amplitud del 25 %, durant 15 segons i a freqüència constant, utilitzant l'aparell de sonicació Branson Digital Sonifier S-250D (Emerson Industrial). Seguidament, es va procedir amb una centrifugació dels eppendorfs a 12.000 rpm, durant 5 minuts a 4 °C. Per tal de carregar a cada pouet una quantitat de proteïna equivalent, es van

quantificar els lisats amb el *kit BCA Protein Assay* utilitzant un lector de microplaques (Sunrise™, Tecan) i es va mesurar la seva absorbància a 595 nm. Després, es van reduir les mostres amb el tampó de càrrega Laemmli que contenia Tris-HCl 0,31 M a pH de 6,8, glicerol al 25 %, SDS al 10 %, blau de bromofenol al 0,125 %, β -mercaptoetanol 1,5 M i aigua miliQ en proporció 5:1, els volums dels quals van dependre del volum de tampó de lisi prèviament afegit. Les mostres es van escalfar a una temperatura de 95 °C durant 5 minuts en un termobloc (Heatblock Digital 2-Block, VWR International, ref. 460-0103) per tal d'evitar la formació d'agregats, es va sotmetre a un pols de centrífuga i es van carregar en un gel de poliacrilamida del 6 % on es va utilitzar acrilamida del 30 %, tampó Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8, tampó Tris-HCl 1,5 M a pH 8,8, SDS al 10 %, APS al 10 % i TEMED. Es van carregar entre 25-50 μ g de cada mostra així com el marcador de pes molecular de proteïnes (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*). Es va utilitzar un voltatge de 80 V fins que el front blau de l'electroforesis va travessar el gel concentrador i després, es va pujar a 100 V fins aconseguir que la banda del marcador de pes molecular d'interès arribés al final. Les proteïnes es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa utilitzant el *kit iBlot® 2 Dry Blotting System*. Les membranes amb el material transferit es van bloquejar per tal d'impedir unions inespecífiques amb l'anticòs. La solució de bloqueig contenia llet desnatada en pols al 5 % diluïda en tampó de rentat TBST, preparat a partir de TBS i tween 20 al 0,1 %. La membrana es va deixar en agitació durant un temps mínim d'una hora i després, es va incubar durant tota la nit a 4 °C amb l'anticòs utilitzant les dilucions esmentades a la taula 4 dissolt en solució de bloqueig i azida sòdica al 0,01 %. Al dia següent, es van realitzar 2 rentats de 10 minuts i 1 rentat de 5 minuts de la membrana amb el tampó de rentat TBST i es va incubar durant 1 hora a temperatura ambient amb la solució d'anticòs secundari utilitzant les dilucions esmentades a la taula 5. Després, es va realitzar 1 rentat ràpid i 2 rentats de 5 minuts amb el tampó de rentat TBST i 1 rentat de 5 minuts amb el tampó de rentat TBS 1X. Finalment, es va utilitzar el kit de detecció quimioluminiscent *Pierce ECL western Blotting Substrate* que va ser analitzat per l'aparell revelador sensible a quimioluminiscència GeneGnome (Syngene).

Proteïna	Pes molecular	Anticòs	Dilució	Referència
FANCD2	166 kDa	α -FANCD2	1:2500	(ref. ab2187), Abcam
FANCA	163 kDa	α -FANCA	1:2500	(ref. F3165, Sigma-Aldrich)
Vinculina	124 kDa	α -Vinculina	1:5.000	(ref. ab18058, Abcam)

Taula 4. Anticossos primaris utilitzats per la tècnica de WB

Anticòs	Dilució	Referència
Cabra α -conill	1:5.000	(ref. sc-2004, Santa Cruz Biotechnology)
Cabra α -ratolí	1:5.000	(ref. sc-2005, Santa Cruz Biotechnology)

Taula 5. Anticossos secundaris utilitzats per la tècnica de WB.

3.6. Anàlisi de la localització de FANCD2 al lloc del dany

3.6.1. Observació de *foci* nuclears de YFP-FANCD2 al lloc del dany per microscopia

Es van sembrar 2×10^5 cèl·lules U2OS, U2OS FANCA^{-/-}-YFP-FANCD2 o U2OS FANCAcorrected-YFP-FANCD2 per duplicat en plaques de 35 mm ibidi® (ref. 81156) per tal de realitzar els assajos funcionals per l'estudi del fenotip dels clons obtinguts sense expressió de FANCA. A les 4-6 hores, es va procedir amb el tractament de l'agent mutagènic HU a dosi 2 mM. A les 24 hores es van rentar les cèl·lules amb 2 ml de PBS 1X i es van fixar amb 2 ml d'una solució de PFA al 4 % dissolt en PBS durant 15 minuts. Es va aturar la fixació amb 2 rentats de PBS i es van tenyir les preparacions amb 15 μ l de DAPI a 2 μ g/ml. Les imatges es van obtenir per microscopia confocal utilitzant l'aparell Leica TCS SP5 del Servei de Microscopia de la facultat de ciències de la UAB, utilitzant l'objectiu de 60 augments.

3.6.2. Observació de *foci* nuclears de FANCD2 endògena al lloc del dany per immunofluorescència

Es van sembrar 2×10^5 cèl·lules U2OS, U2OS FANCA^{-/-}-YFP-FANCD2 o U2OS FANCAcorrected-YFP-FANCD2 sobre un cobreobjectes col·locat en pous d'una placa de 6, i a les 4-6 hores es van tractar amb els compostos candidats reactivadors de la ruta FA/BRCA. Al dia següent, es va procedir amb el tractament d'HU a dosi 2 mM durant 24 hores. Seguidament, es van rentar les cèl·lules amb 2 ml de PBS i es van fixar amb 2 ml d'una solució de PFA al 4 % dissolt en PBS durant 15 minuts. Es va aturar la fixació amb 2 rentats de PBS i es van permeabilitzar les cèl·lules amb tritó X-100 al 0,5 % en PBS durant 10 minuts. Es van bloquejar les cèl·lules en suau agitació durant 15 minuts. amb una solució de bloqueig formada per PBS al 5 % de BSA i al 0,05 % de tween-20. Després, es va realitzar la incubació amb 40 μ l d'anticòs primari (taula 6) dissolt en solució de bloqueig durant tota la nit a 4 °C en una cambra humida per evitar l'evaporació. Al dia següent, les cèl·lules es van rentar amb solució de bloqueig durant 15 minuts i es van incubar amb l'anticòs secundari marcat amb fluorocrom (taula 7) en solució de bloqueig. L'excés d'anticòs secundari no unit específicament es va rentar dues vegades, una amb solució de bloqueig en agitació suau i durant 15 minuts i la segona amb aigua destil·lada durant 5 minuts. Es van

deixar assecar els cobreobjectes i es van tenyir les preparacions amb 15 µl de DAPI a 2 µg/ml. Les imatges es van obtenir utilitzant el microscopi de fluorescència del nostre laboratori amb l'objectiu de 100 augments.

Proteïna	Pes molecular	Anticòs	Dilució	Referència
FANCD2	166 kDa	α-FANCD2	1:2500	(ref. ab2187), Abcam

Taula 6. Anticossos primaris utilitzats per l'assaig d'immunofluorescència.

Anticòs	Dilució	Referència
Alexa Fluor 488 Cabra α-ratolí	1:5.000	(ref. A11034, ThermoFischer Scientific)

Taula 7. Anticossos secundaris utilitzats per l'assaig d'immunofluorescència.

3.7. Cribatge de fàrmacs per millorar el fenotip Fanconi

3.7.1. Validació de la tècnica adaptada a plaques de 96 pous utilitzant fàrmacs ja descrits en la literatura com a compostos amb efectes beneficiosos per les cèl·lules Fanconi.

Els fàrmacs CRD1, CRD3, CRD6, CRD7, CRD10, CRD11, CRD12, CRD17, CRD18 i CRD19, es van utilitzar per validar l'assaig de MN per citometria de flux i determinar el seu efecte en la millora de la fragilitat cromosòmica i la parada en G2/M, tant espontània com induïda per DEB (0,1 µg/ml), formaldehid (200 µM durant 1 hora) i acetaldehid (5 mM) utilitzant les tres línies limfoblastoids Fanconi LFA55, LFA88 i LFA145. Les concentracions de cada fàrmac es van determinar segons el que estava documentat en la literatura i es van estudiar en un rang de 10 µM a 10 mM, i es van codificar amb les lletres CRD seguit d'un número i afegint darrera un "." i un número associat a cada concentració utilitzada (.1, .2, .3, .4, .5, .6, .7, .8).

3.7.2. Cribatge d'una biblioteca de compostos redox

Un cop validat l'assaig, es va realitzar un cribatge utilitzant la biblioteca redox *Screenwell redox library* (ref. BML-2835-0100, 100 µl/pou) obtinguda d'Enzo Life Sciences que contenia 84 compostos amb una activitat prooxidant o antioxidant definida (llista de compostos mostrada a la taula 8). Els compostos estaven dissolts en dimetil sulfòxid (DMSO) a 10 mM i al·lucotats en plaques de 96 pous en un volum de 100 µl/pou. La biblioteca contenia una varietat tant estructural com mecanística de diferents classes de compostos, com per exemple, hidroperòxids, polifenòlics, quelants de metalls, tiols, segrestadors de tiols, segrestadors de radicals i moduladors de glutatió, així com també, petites molècules que mimetitzen l'activitat enzimàtica de la SOD i la

glutatió peroxidasa. Aquesta biblioteca va ser molt interessant ja que alguns d'aquests fàrmacs ja s'estan utilitzant en assaigs clínics, altres són suplementes alimentaris o suplementes nutricionals i per tant ja estan testats com a segurs per l'ús humà. Els compostos es van mantenir a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fins el seu ús. Es van utilitzar a una concentració de $100\text{ }\mu\text{M}$ i es va determinar el seu efecte en millorar el percentatge de MN i cèl·lules bloquejades en fase G2/M, tant de forma espontània com induïda per DEB ($0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$), formaldehid ($200\text{ }\mu\text{M}$ durant 1 hora) i acetaldehid (5 mM). També es van codificar amb les lletres CRD seguit d'un número i afegint darrera un "." i un número associat a la concentració utilitzada.

1,2-Ditiol-3-tiona	Àcid cafeic	Àcid DL- α -lipoic	Glutatió	Paeonol	Terbinafina-HCl
AA-861	Cantaxantina	DTT	Gosipol	Fenidona	tert-Butilhidroquinona
Ambroxol	CAPE	D- α -Tocoferilquinona	HBED·HCl·H ₂ O	Piceatanol	Tetrametilpirazina
Anetol tritona	Capsaicina	D- γ -Tocoferol	Hinoquitíol	Probucol	Tiourea
Apigenina	Captopril	Ebselen	Hidroquinona	Procisteïna	Timoquinona
Àcid ascòrbic	Àcid carnòsic	EPA	Ibuproxam	Prometazina·HCl	Succinat de tocoferol
Palmitat d' ascorbil	Carvedilol	Epigallocatequina galat	Idebenona	Àcid protocatecuic	Troxol
Baicaleïna	CDC	Esculetina	L-Ergotioneïna	Resveratrol	U74389G maleat
Bakuchiol	Ciclopirox etanolamina	Etoxiquina	MCI-186	Palmitat de retinil	U83836E·2HCl
BHA	Hidroperòxid de cumeno	ETYA	Melatonina	Àcid rosmarínic	
BHT	Curcumina	Eugenol	N-acetilcisteïna	Selenometionina	
β -carotè	D609	Àcid ferúlic etilèster	NDGA	Seratrodist	
β -Lapachone	DCHA	Genisteïna	N-Etilmaleïmida	Tanshinone IIA	
bis-demetoxicurcumina	Diludina	Àcid gentísic	Cafeat d' etil	TEMPO	
Butionina sulfoximina	Disulfiram	GERI-BP002A	N-Propil galat	TEMPOL	

Taula 8. Compostos de la biblioteca redox SCREEN-WELL®

3.7.3. Anàlisi estadístic

Es va realitzar un total de 39 experiments amb 3 rèpliques de cada condició, on es van anar estudiant l'efecte dels compostos per separat, tot i que entre experiments s'anaven solapant els fàrmacs. L'anàlisi estadístic es va dur a terme al Servei d'Estadística Aplicada de la UAB. Es va utilitzar un model lineal mixte considerant l'experiment com a factor aleatori i el medicament, la línia cel·lular i la seva interacció com a factors fixes. En les comparacions 2 a 2 entre fàrmacs i controls dins de cada línia cel·lular es van ajustar els p-valors amb la correcció de Dunnett. La significació es

va determinar amb el valor p i es va graficar amb un * quan va ser menor de 0,05, **, menor de 0,01 i *** menor de 0,001.

L'anàlisi es va realitzar per a cada solvent i inductor. Per analitzar el solvent DMSO de la variable MN es va transformar la variable amb el logaritme per tal de corregir l'heterogeneïtat dels residus.

3.8. Estudi *in vivo* en model de ratolí Fanca^{-/-} tractat amb fàrmacs candidats

Després de realitzar el cribatge de fàrmacs antioxidants per assaig de MN per citometria de flux i de seleccionar els fàrmacs que reduïen la fragilitat cromosòmica de cèl·lules Fanconi, es va voler estudiar l'efecte dels compostos CRD3 i CRD8 *in vivo*, mesurant els MN en els reticulòcits i eritròcits de la sang de ratolins tractats amb els compostos. L'experiment es va dur a terme en col·laboració amb el grup del Dr. Juan Bueren del CIEMAT, a Madrid, i supervisat pel Dr. José Antonio Casado i la Dra. Paula Río del mateix grup. El model de ratolí que es va escollir va ser el ratolí Fanca^{tm1Faw} (Anèmia de Fanconi, Grup de Complementació A; mutació dirigida 1, Fre Arwert), amb composició al·lèlica Fanca^{tm1Faw}/Fanca^{tm1Faw} i background genètic 129P2/OlaHsd * FVB amb deleció dels exons 4-7 (Cheng *et al.*, 2000). Es van separar 30 ratolins Fanca^{-/-}, tots ells mascles. Després d'una setmana d'acimatació es van randomitzar els ratolins per pes i edat en 3 grups experimentals diferents (aigua, CRD3 i CRD8). A l'inici de l'experiment els ratolins van tenir un pes d'uns 25 grams i l'edat dels ratolins va ser d'entre 12 i 16 setmanes. Els compostos CRD3 i CRD8 es van subministrar en aigua bevable filtrada i irradiada amb llum ultravioleta *ad libitum*. Per tal d'observar els MN en les cèl·lules de la sang dels ratolins, va ser necessària l'obtenció de mostres de sang durant les setmanes 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 i 24 tant dels ratolins no tractats com dels ratolins tractats amb els dos fàrmacs d'estudi (figura 19).

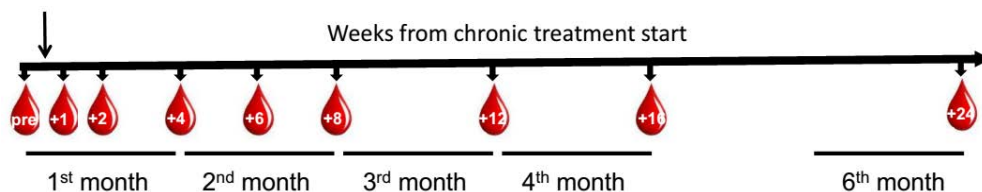


Figura 19. Setmanes de sagnat dels ratolins des de que es van administrar els fàrmacs CRD3 i CRD8.

Els ratolins es van sagnar per un tall a la vena coccígia per obtenir un volum de sang de 100 µl i quantificar la freqüència de MN en reticulòcits i eritròcits de manera espontània. Addicionalment, es va realitzar una medició dels paràmetres hematològics d'hemoglobina, granulòcits, leucòcits, eritròcits i plaquetes utilitzant un comptador hematològic automàtic. També, es va monitoritzar el pes dels animals, la ingesta de menjar i d'aigua bevable cada setmana. Un cop acabat l'estudi, es van sacrificar els animals amb una càmera de gas de CO₂ i es va realitzar una anàlisi de l'hematologia i la bioquímica bàsica, per conèixer els nivells de glucosa, fosfatasa alcalina, creatinina, amilasa, proteïna total i alanina aminotransferasa, i així saber l'estat general de l'animal al final del tractament. D'aquesta manera, es va analitzar la freqüència de reticulòcits així com el percentatge d'eritròcits madurs i reticulòcits amb MN per citometria de flux, seguint el protocol descrit per Balmus i col·laboradors, l'any 2015 (Balmus *et al.*, 2015). Es va recol·lectar entre 100 i 150 µl de sang de cada animal al CIEMAT (Madrid) i es van enviar les mostres en fred al nostre laboratori. Després, es van pipetejar 100 µl i es van diluir en 350 µl de solució salina tamponada amb bicarbonat (BBS) que contenia 9 g. de NaCl, 0,444 g. de NaHCO₃, 800 ml d'aigua destil·lada, ajustant el pH a 7,5 i enrasant fins a 1 l. D'aquesta mescla, es van pipetejar 180 µl en un tub que contenia 2 ml de metanol fred a -75/-85 °C i es van guardar al congelador durant un mínim de 3 dies. Un cop passat aquest temps, es van afegir 12 ml de BBS fred i es van centrifugar les mostres a 4 °C i durant 5 minuts a 500 G. Es va aspirar el sobrenedant i es van afegir 200 µl de BBS fred. D'aquesta solució, es van afegir 20 µl de cada mostra a tubs de citòmetre amb 80 µl de solució d'anticòs que contenia 91 µl de BBS, 0,25 µl d'anti-CD71 (ref. 1720-02, SouthernBiotech) i 8,75 µl de RNasa. Es van protegir les mostres amb paper d'alumini i es van incubar a 4 °C en la nevera o en gel durant 30 minuts i a temperatura ambient durant 30 minuts. Finalment, es van rentar les mostres amb 600 µl de BBS fred, es van centrifugar a 500 G a 4 °C durant 5 minuts, es va eliminar el sobrenedant, es van resuspendre amb 100 µl de BBS i es van mantenir a 4 °C fins el moment de l'anàlisi. Al citòmetre, es van tenyir les mostres amb la solució de tinció que contenia iodur de propidi (PI) dissolt en BBS a 2 ug/ml a 4 °C durant 30 minuts. Es van adquirir 200.000 events per mostra sempre que va ser possible i el n^o total d'eritròcits comptats va ser de 4.000.

3.9. Algoritmes *in silico* per predir els mecanismes d'acció comuns dels fàrmacs candidats CRD3 i CRD8

En col·laboració amb l'empresa Intelligent Pharma®, es van realitzar algoritmes *in silico* per comparar els mecanismes d'acció dels dos fàrmacs per tal de trobar

mecanismes comuns que poguessin explicar els efectes observats. Es va utilitzar el software desenvolupat per ells mateixos anomenat Pythia, el qual proposa dianes biològiques a partir de l'activitat biològica de molècules similars descrites en la base de dades ChEMBL (ChEMBL, 2017). La molècula d'estudi i els compostos de la base de dades són dividits en fragments químics, els quals són comparats utilitzant empremtes genètiques com a descriptors moleculars i després es calcula un índex de similitud. La certesa amb la qual la molècula interactua amb la diana és determinada per l'índex de similitud i l'activitat de la molècula en la diana, la qual es pot trobar en la base de dades ChEMBL expressada com a la concentració mitjana màxima inhibidora (IC50), la concentració mitjana màxima efectiva individualment (EC50), la constant d'inhibició (Ki), la constant de dissociació (Kd), la concentració mitjana de màxima d'activitat (AC50), la concentració mitjana màxima efectiva en poblacions (ED50), la concentració mitjana màxima efectiva bioquímicament (XC50), l'activitat i la potència.

3.10. Sistema cel·lular de detecció de *foci* de FANCD2 per microscopia de fluorescència

3.10.1. Generació de la línia cel·lular U2OS FANCA^{-/-}

L'expressió del gen *FANCA* es va eliminar en la línia cel·lular U2OS per la tecnologia d'edició gènica XTN™ TALENs de Transposagen. A més a més dels plasmidis que codifiquen per les dues TALENs també es va utilitzar un plasmidi (anomenat surrogate-FANCA) que utilitza l'expressió de les proteïnes fluorescents vermella (*red fluorescent protein*, RFP) i verda (*green fluorescent protein*, GFP) per tal de detectar els clons cel·lulars que van patir el silenciament dels gens. Per la transfecció dels plasmidis, es van plaquejar 300.000 cèl·lules/pou en plaques de 6 pous i es van incubar durant tota la nit a 37 °C, 5 % de CO₂ i 95 % d'humitat. Els plasmidis van ser dissenyats per dirigir-se a l'exó 1 del gen *FANCA* i les seqüències de reconeixement de la nucleasa TAL es mostren a continuació, on en blau apareixen els llocs d'unió i en vermell la regió de tall.

5' TAGGCGCCAAGGCCATGTCCGACTCGTGGGTCCCGAACTCCGCCTCGGGCCA 3'

Després de 24 hores, es van preparar 3 eppendorfs amb 250 µl de medi Optimem per les diferents condicions: un control sense plasmidi, 1 µg del plasmidi surrogate-FANCA i 1 µg del plasmidi surrogate-FANCA junt amb 0,5 µg dels plasmidis amb cada braç del TALEN. Es va afegir tampó d'elució en cada mostra fins arribar a un volum final de 30 µl i es van deixar a temperatura ambient durant 5 minuts. Paral·lelament, es va

preparar una solució Mix amb 30 µl de Lipofectamine® 2000 en 750 µl de medi Optimem (taula 9).

	DNA	Surro (µg)	TALEN (µg)	Elution Bf.	Mix (Lipo2000+Optimem)
Controls	-	1	-	Final volume 30 µl	10 µl Lipo2000 + 250 µl Optimem X 3 wells = 30 µl Lipo2000 + 750 µl Optimem
	Surro-FANCA	1	-		
Talen	Surro-FANCA + TALEN-FANCA-F + TALEN-FANCA-R	1	0,5+0,5		
Add 250 µl of Optimem					

Taula 9. Quantitats de DNA utilitzades dels plasmidis surrogate-FANCA i TALENs i volums de reactius de transfecció.

Es van pipetejar 260 µl de la Mix en cadascun dels eppendorfs que contenien els plasmidis i es van deixar incubant durant 20 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, es va eliminar el medi complet de les cèl·lules U2OS prèviament plaquejades i es va afegir medi complet sense plasmocín. Seguidament, es van transfectar les cèl·lules de cada pou amb les solucions dels eppendorfs preparats i es van deixar durant 4 hores a 37 °C. Després, es va eliminar el medi i es va afegir medi complet amb plasmocín i es van incubar les cèl·lules a 37 °C. Durant els dies 2, 3, i 4 es van anar observant les cèl·lules al microscopi de fluorescència fins que van expressar la fluorescència verda i vermella en el cas del surrogate-FANCA + TALEN, la fluorescència únicament vermella en el cas del control surrogate-FANCA sense les TALEN, o no es va detectar fluorescència en el control sense transfecció de plasmidis. Un cop observada aquesta fluorescència, mitjançant citometria de flux preparativa (*cell sorting*) amb l'aparell BD FACSJazz™ del Servei de citometria de l'IBB, es va realitzar un sorteigament cel·lular de la mostra transfectada amb el plasmidi surrogate-FANCA (figura 20B) i la mostra transfectada també amb els dos plasmidis amb les nucleases TALEN (figura 20B), utilitzant el filtre de 530/30. El citòmetre va plaquejar una única cèl·lula per pou en plaques de 96 pous de les cèl·lules fluorescents seleccionades.

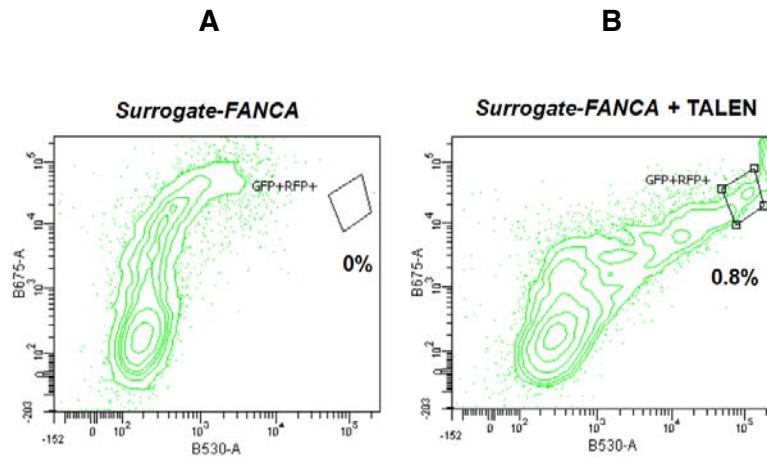


Figura 20. Finestres d'anàlisi del citòmetre FACSJazz™. A) Fluorescència únicament vermella corresponent a la transfecció del plasmidi surrogate-FANCA sense les nucleases TALEN. B) Fluorescència verda i vermella corresponent a la transfecció del plasmidi surrogate-FANCA amb les nucleases TALEN. Imatge cedida per una companya del laboratori.

Quan les cèl·lules van aconseguir la confluència, es va comprovar l'expressió de la proteïna FANCA per WB. Aquelles mostres on no es va veure expressió de proteïna, es van seqüenciar per comprovar que les nucleases TALEN havien actuat en el lloc dissenyat i havien escindit una part del gen, implicant una proteïna no funcional. Només es va necessitar una ronda de transfecció de TALEN i d'expansió clonal per mutar els al·lels del genoma de les cèl·lules U2OS. Es va utilitzar com a control WT la línia cel·lular U2OS parental. Dels clons confirmats per seqüenciació amb la mutació truncadora de la proteïna FANCA, es va seleccionar un que no expressés de manera estable la fluorescència verda per tal de que no interferís posteriorment en la transfecció del plasmidi que contenia la proteïna fluorescent groga (*yellow fluorescent protein*, YFP) fusionada amb FANCD2 (YFP-FANCD2).

3.10.2. U2OS FANCA^{-/-} estables per YFP-FANCD2

Per la transfecció estable del plàsmid que contenia la proteïna YFP-FANCD2, el qual va ser proporcionat pel Dr. K. J. Patel (Pace *et al.*, 2002), es van plaquejar 500.000 cèl·lules de la línia cel·lular U2OS FANCA^{-/-} obtinguda en un pou d'una placa de 6 i es van incubar durant 24 hores a 37 °C. Després, es va preparar una solució Mix amb 2,5 µg de DNA del plasmidi YFP-FANCD2 en 250 µl de medi Optimem. En paral·lel, es va preparar una solució Mix amb 7,5 µl de Lipofectamine® 2000 en 250 µl de medi Optimem i es va deixar incubant 5 minuts a temperatura ambient. Seguidament, es van barrejar els 250 µl de les dues solucions Mix i es van deixar incubant durant 20 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps, es van pipetejar 500 µl al pouet de cèl·lules i es va deixar durant tota la nit a 37 °C. Després, es va eliminar el medi i es

va afegir medi complet amb plasmocin i es van incubar les cèl·lules a 37 °C. Durant els dies 2, 3, i 4 es van anar observant les cèl·lules al microscopi de fluorescència fins que van expressar la fluorescència verda corresponent a l'expressió de FANCD2-YFP. Per enriquir la població cel·lular estable per la proteïna FANCD2 verda fluorescent, es van realitzar dues rondes de purificació de les cèl·lules fluorescents mitjanant *cell sorting*. Per tal de tenir un control vàlid per realitzar posteriorment el cribatge de fàrmacs, un cop es va aconseguir la línia U2OS FANCA^{-/-} estable per la proteïna YFP-FANCD2, també es va corregir la línia transfectant-li el plasmidi FANCA-PGK proporcionat pel Dr. Juan Bueren (Gonzalez-Murillo *et al.*, 2010) que contenia la proteïna FANCA WT de manera estable per tal de tenir tant la línia FANCA^{-/-}, com la corregida amb el mateix fons genètic. Un cop feta la transfecció de FANCA WT es va comprovar la seva expressió per WB. A partir d'ara, aquestes dues línies s'anomenaran U2OS FANCA^{-/-}-YFP-FANCD2 (línia FANCA^{-/-}) i U2OS FANCAcorrected-YFP-FANCD2 (línia FANCA corregida).

3.11. HCS per reactivar la ruta FA/BRCA

Una vegada es va obtenir la línia cel·lular FANCA^{-/-} estable per la proteïna YFP-FANCD2, es va realitzar el cribatge de 3802 fàrmacs al laboratori del Dr. Thomas Helleday al *Science for Life Laboratory*, Institut Karolinska, Estocolm, Suècia. Les biblioteques de compostos que es van utilitzar van ser:

- Llibreria Prestwick (Prestwick Chemical Library®). 1200 compostos majoritàriament aprovats per la FDA.
- Llibreria Selleck (Selleckchem). 1368 compostos, molts d'ells aprovats per la FDA. Entre ells s'inclouen 378 inhibidors de cinases permeables disponibles comercialment de diferent diversitat estructural que inclouen, entre d'altres, receptors tirosina cinases (RTKs), proteïna cinasa C (PKC), cinases Janus (JAK) i cinases dependent de ciclins (CDK).
- Llibreria Tocriscreen (Tocris). 1119 compostos biològicament actius que cobreixen un ampli rang de dianes farmacològiques.
- 115 compostos sintetitzats en el mateix laboratori del Thomas Helleday.

3.11.1. Transferència dels compostos a les plaques, plaqueig i fixació de les cèl·lules per l'obtenció de les imatges

El cribatge de compostos es va dur a terme en plaques de 384 pous (ref. 353962) obtingudes de BD Falcon. Es van utilitzar 52 plaques i es va analitzar l'efecte dels

compostos per duplicat en 2 dosis diferents (1 μM i 10 μM). Dels 384 pous de la placa, se'n van aprofitar 308, ja que es van descartar els dels extrems per evitar l'evaporació del medi. Es van transferir 148 compostos per placa en 2 dosis diferents: 1 μM (5 nl/pou) i 10 μM (50 nl/pou) utilitzant l'aparell Echo® 550 *Liquid Handler* de Labcyte i es va reservar la columna 23 pels controls negatiu i positiu tal i com es mostra a la figura 21. El control negatiu corresponia a les cèl·lules FANCA^{-/-} sense tractament de cap compost i el control positiu a les cèl·lules corregides amb el gen FANCA. Tots els compostos estaven dissolts en DMSO a una concentració de 10 mM i la concentració final de DMSO per pouet va ser del 0,01 % en la dosi de 1 μM , 0,1 % en la dosi de 10 μM i els pous controls contien 0,1 % de DMSO. Els duplicats es van realitzar en diferents plaques i, per tant, les plaques 1-26 contien els mateixos compostos que les plaques 27-52.

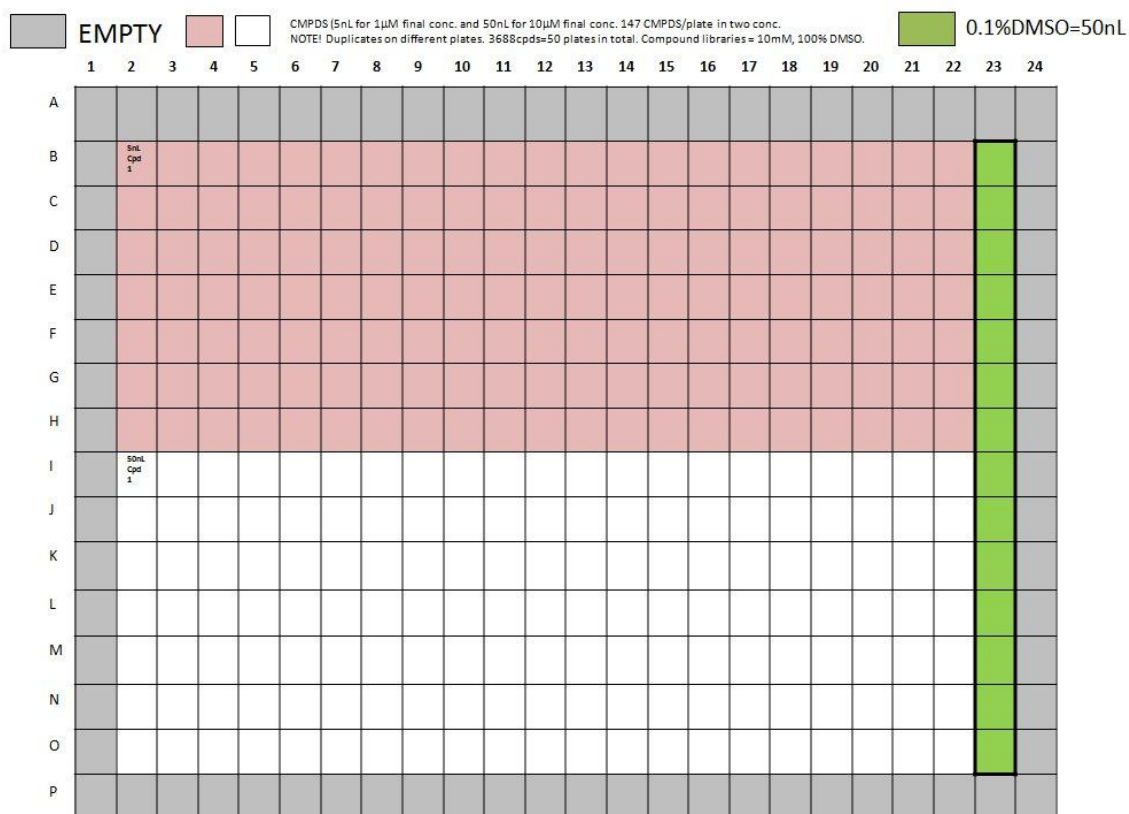


Figura 21. Distribució dels compostos en les plaques del cribatge. Les columnes 1 i 24 i les files A i P no es van utilitzar pel plaqueig cel·lular per evitar l'evaporació del medi. Es van utilitzar 52 plaques i cada placa contenia 148 compostos diferents. Les files B-H contien els fàrmacs a dosi 1 μM (5 nl/pou) i les files I-O els mateixos fàrmacs a dosi 10 μM (50 nl/pou). La columna 23 no contenia cap fàrmac i es van plaquejar únicament les cèl·lules U2OS FANCAcorrected-YFP-FANCD2 pel control positiu i les cèl·lules U2OS FANCA^{-/-}-YFP-FANCD2 pel control negatiu, sense cap fàrmac.

Una vegada transferits els compostos, les plaques es van segellar per calor amb l'aparell *PlateLoc Thermal Microplate Sealer*, d'Agilent, per evitar l'evaporació i es van guardar a 4 $^{\circ}\text{C}$ fins el dia següent. 24 hores més tard, es van plaquejar 2.000

cèl·lules/pou en 50 µl de medi complet sense plasmocín utilitzant el dispensador de reactius Multidrop™ Combi, de ThermoFisher Scientific i es van deixar a l'incubador a 37 °C i 5 % de CO₂. Al dia següent es van pipetejar 5 µl d'HU a dosi de 22 mM per aconseguir una concentració final de 2 mM utilitzant l'aparell dispensador esmentat anteriorment. Es van guardar a l'incubador a 37 °C i 5 % de CO₂ i després de 24 hores, es va aspirar el medi de totes les plaques utilitzant l'aparell de rentat de plaques *ELx405 Select Deep Well Washer*, de Biotek. Es van afegir 25 µl de PFA dissolt en PBS al 4 % utilitzant el dispensador de reactius i es van deixar les plaques a temperatura ambient durant 15 minuts. Es va aspirar el PFA utilitzant l'aparell de rentat i es van afegir 25 µl de Hoechst a concentració 2 µM dissolt en PBS utilitzant el dispensador. Es va incubar a temperatura ambient durant 15 minuts protegint les plaques de la llum amb paper d'alumini. Finalment, es va rentar 3 vegades amb 50 µl de PBS utilitzant l'aparell de rentat. Per últim, es va afegir 50 µl de PBS amb azida sòdica al 0.05 % i es van guardar fins el seu anàlisi a 4 °C en condicions de foscor.

3.11.2. Obtenció d'imatges per microscopia

Les imatges es van realitzar amb el microscopi ImageXpress, de Molecular Devices, acoblat al braç robòtic VALet™, de ThermoFisher Scientific, per la manipulació de les plaques automàticament. Es van realitzar 6 imatges/pou tant dels nuclis detectant el Hoescht i utilitzant el filtre DAPI-5060C amb una longitud d'ona d'excitació de 482/35 nm i d'emissió de 447/60 nm amb l'objectiu de 10 augments, com de la formació dels *foci*, utilitzant el filtre YFP-2427B amb una longitud d'ona d'excitació de 500/24 nm i d'emissió de 542/27 nm per la detecció de l'expressió de YFP-FANCD2, ambdós amb l'objectiu de 40 augments. Les imatges es van guardar en un servidor i es van descarregar des d'una base de dades del propi laboratori. Paral·lelament, es va preparar un programa per l'anàlisi de les imatges i la detecció de *foci* amb el software CellProfiler (Broad Institute) utilitzant els controls negatius i positius (figura 22).

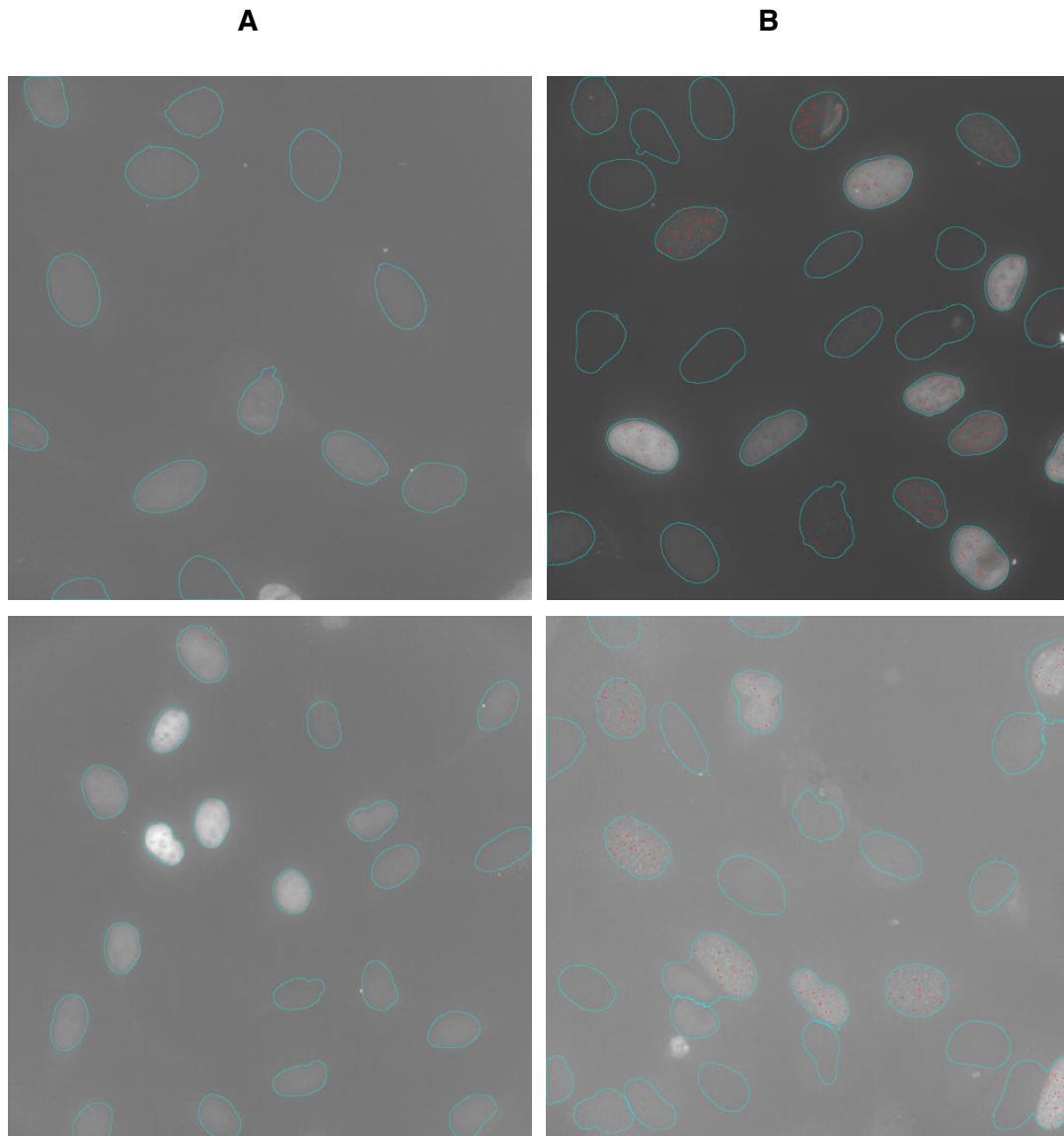


Figura 22. Detecció dels nuclis amb presència o absència de foci amb el software d'anàlisi Cell Profiler. El programa d'anàlisi no va detectar foci en els nuclis de les imatges obtingudes dels pous que contenien la línia U2OS FANCA/--YFP-FANCD2 utilitzada com a control negatiu (A), però sí que en va detectar en els pous que contenien la línia U2OS FANCAcorrected-YFP-FANCD2 utilitzada com a control positiu (B).

Es va dur a terme un experiment pilot utilitzant tant el control positiu com negatiu per determinar el valor del factor Z' utilitzant la fórmula de la figura 23. No obstant, els compostos candidats identificats amb el programa es van confirmar visualment amb les imatges.

$$Z' = 1 - \frac{3SD \text{ of pos. control} + 3SD \text{ of neg. control}}{[\text{mean of pos. control} - \text{mean of neg. control}]}$$

Figura 23. Càlcul del factor Z' de l'assaig cel·lular utilitzat pel criatge.

3.11.3. Validació dels fàrmacs candidats reactivadors de la ruta FA/BRCA

Per tal de confirmar l'efecte dels fàrmacs potencialment reactivadors de la ruta FA/BRCA, es va realitzar una validació dels candidats. La validació es va dur a terme a distància en dues etapes realitzant una primera part al *Science for Life Laboratory*, on es van transferir els compostos a les plaques de 384, i una segona part al laboratori de la UAB on es van plaquejar les línies cel·lulars U2OS FANCA^{-/-}-YFP-FANCD2 i U2OS FANCAcorrected-YFP-FANCD2. Finalment, les plaques es van tornar a enviar a Estocolm per tal d'obtenir les imatges al mateix microscopi.

Per l'assaig de validació de reactivadors de la ruta FA/BRCA, es van estudiar els compostos per triplicat a dosis de 1 i 10 µM tal i com es mostra a la figura A1 de l'apartat d'annexos. Es van plaquejar 3.000 cèl·lules/pou en 50 µl de medi utilitzant les línies cel·lulars U2OS FANCA^{-/-}-YFP-FANCD2 i U2OS FANCAcorrected-YFP-FANCD2. 24 hores després, es va afegir 5 µl d'HU 22 mM, per tal d'aconseguir una concentració final de 2 mM i a les 24 hores es van fixar les cèl·lules. Per la fixació, es va seguir el mateix protocol que en el primer cribatge, però en aquest cas, utilitzant pipetes multicanal.

3.12. HCS per trobar fàrmacs antitumorals pel tractament dels HNSCCs Fanconi

Paral·lelament al cribatge de fàrmacs reactivadors de la ruta FA/BRCA, es van voler identificar compostos que podrien tenir un efecte antitumoral no genotòxic per tractar els tumors dels pacients Fanconi. Així doncs, aprofitant que en les plaques del cribatge inicial es van realitzar 4 imatges/pou per detectar el Hoescht utilitzant el filtre DAPI-5060C amb una longitud d'ona d'excitació de 377/50 nm i d'emissió de 447/60 nm i l'objectiu de 10 augments. Es va dissenyar un programa amb el software Cell Profiler per tal de tenir un recompte dels nuclis totals per pou després del tractament amb cada compost i del tractament amb la HU a dosi de 2 mM (figura 24).

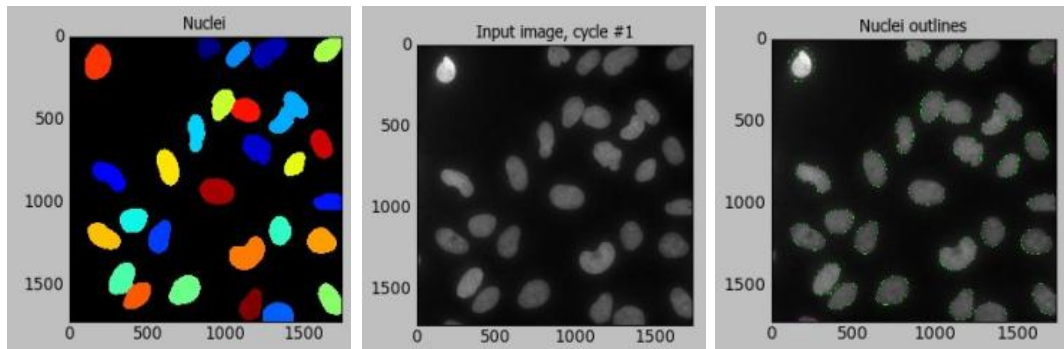


Figura 24. Programa dissenyat per la detecció dels nuclis a partir de les imatges obtingudes per microscopia.

3.12.1. Primera validació dels compostos antitumorals del cribatge

Es van seleccionar tots aquells fàrmacs que tinguessin associades les etiquetes d'antitumoral i antineoplàsic en la llista dels 3802 compostos del cribatge i que reduïssin la viabilitat més d'un 20 % (figura 25), tant a la dosi de 1 com de 10 μM , en comparació amb el control sense tractar. Després, es va revisar en la literatura el mecanisme d'acció de tots ells i únicament es van seleccionar els que no induïssin dany en el DNA. Així doncs, es va realitzar una primera validació tractant la línia de fibroblast primari FA551 i la línia ja utilitzada en el cribatge inicial U2OS FANCA^{-/-}, per veure quins eren tòxics únicament en la línia tumoral. La validació es va dur a terme a distància en el mateix moment que la dels fàrmacs reactivadors i es va estudiar cada fàrmac per duplicat a dosis 1 i 10 μM , tal i com es mostra en la figura A2 de l'apartat d'annexos, però en aquest cas, sense el tractament amb HU. Es van plaquejar 250 cèl·lules/pou de les 2 línies cel·lulars en 30 μl de volum final i la fixació es va realitzar després d'una setmana de creixement. Com a control de dany, es va afegir una corba de dosis de MMC de 1 a 100 nM. Els resultats es mostren codificats amb les lletres CAT més un número, en referència als fàrmacs candidats antitumorals.

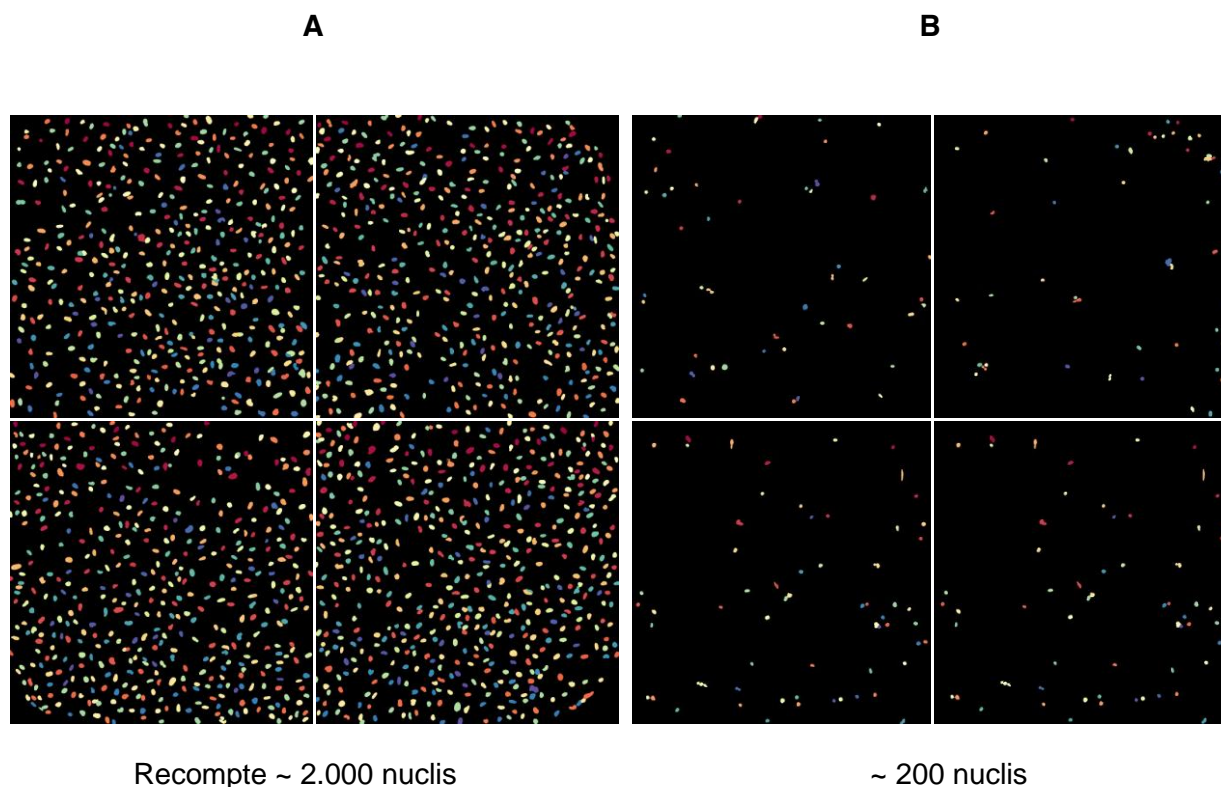


Figura 25. Recompte de nuclis utilitzant el software d'anàlisi Cell Profiler. El programa dissenyat va recomptar automàticament els nuclis totals per pou després del tractament amb cada compost a partir de les 4 imatges/pou obtingudes pel microscopi amb l'objectiu de 10 augments i va colorejar els nuclis detectats. A) Control negatiu sense tractament de fàrmac antitumoral (recompte aproximat de 2.000 nuclis). B) Efecte del fàrmac epirubicina-HCl en la viabilitat cel·lular (recompte aproximat de 200 nuclis).

3.12.2. Segona validació dels compostos antitumorals del cribatge

Més tard, es va observar que altres compostos que no estaven catalogats com a antineoplàsics i antitumorals, portaven associades les etiquetes de diferents dianes terapèutiques com EGFR, VEGFR, HDAC, mTOR i PI3K. Es van filtrar els fàrmacs que havien produït una toxicitat de més del 50 % a una dosi de 10 μM i se'n van seleccionar 51. Com que el límit de fàrmacs per fer la segona validació era de 150, es van afegir tots els compostos que, tot i que no portessin associades aquestes etiquetes, tinguessin associades dianes d'altres rutes de senyalització que tampoc danyen el DNA, entre d'altres JNK, RAF, ALK o PIM, i es van seleccionar els fàrmacs que a una dosi de 1 μM produïssin una reducció de més del 50 % de la viabilitat en el cribatge inicial i també, es van afegir els millors que ho feien a 10 μM . Tots aquests fàrmacs també es van validar per veure l'efecte en les línies tumorals Fanconi. En aquest cas, es van tractar les línies cel·lulars HNSCC VU1131-T2.8, VU1604-T i VU1365-T i els fibroblasts primaris FA551. Aquest cribatge també es va dur a terme a distància i es va estudiar cada fàrmac per duplicat a una dosi de 1 μM , tal i com es mostra en la figura A3 de l'apartat d'annexos. En aquest cas, es van plaquejar 250

cèl·lules/pou en 30 µl en les 3 línies cel·lulars i la fixació es va realitzar després d'una setmana de creixement. Com a control de dany, també es van afegir les dosis de MMC de 10 i 33 nM. Els resultats es mostren codificats amb les lletres CAT més un número, en referència als fàrmacs candidats antitumorals.

3.13. Estudi *in vivo* dels fàrmacs CAT2 i CAT29 en la disminució del volum de xenoempelts tumorals Fanconi injectats en el llom de ratolí

Per tal de portar més enllà l'estudi dels dos fàrmacs seleccionats i estudiar el seu efecte en un model *in vivo*, es va implantar la línia de HNSCC VU1131-T2.8 en el llom de 32 ratolins. Els ratolins utilitzats van ser les soques immunodeprimides amb mutacions homozigòtiques en els gens NOD-SCID, els quals tenen malmès el desenvolupament de limfòcits B i T (mutació SCID) i una deficiència en la funció de les cèl·lules *natural killer* (mutació NOD), i són ideals per l'estudi de la implantació de xenoempelts de tumors humans, per tal d'evitar el rebuig d'aquests per part dels ratolins. Els ratolins utilitzats van ser dels 2 sexes, tenien entre 6 i 9 setmanes d'edat i se'ls hi va injectar una barreja en proporcions 1:1 de cèl·lules HNSCC VU1131-T2.8 i matrigel en el llom dret. Els animals van ser monitoritzats 3 vegades per setmana i es va valorar el pes i el volum del tumor fins que els tumors van assolir una mida d'aproximadament 150 mm³. Després, els animals es van agrupar de forma al·leatòria per volum de tumor i sexe en 4 grups experimentals i es va començar a administrar el tractament. Cada grup constava de 8 animals i es corresponien a l'administració de CAT2 i el seu vehicle, i a la de CAT29 i el seu vehicle. L'administració va ser oral de manera forçada utilitzant una sonda i els tractaments es van administrar 5 dies per setmana. Els animals es van anar controlant i monitoritzant 3 vegades per setmana valorant el seu pes i volum del tumor fins que els tumors van arribar a una mida d'aproximadament 1.000 mm³. Per finalitzar l'experiment, els animals es van eutanasiar i els tumors es van extreure quirúrgicament i es van pesar. La meitat dels tumors es van processar per conservar-los fixats en formalina i embeguts en parafina a temperatura ambient i l'altra meitat es va congelar a -80 °C.

Resultats

4. Resultats

PROJECTE 1. Cribatge de fàrmacs antioxidants i antiinflamatoris pel tractament crònic de l'anèmia de Fanconi

4.1. Validació de l'assaig de MN per citometria de flux en les cèl·lules Fanconi

Es va avaluar si es podia detectar amb l'assaig de FCM el dany causat pel tractament dels agents inductors DEB, formaldehid i acetaldehid, utilitzant la línia cel·lular LFA55 i els tres agents van incrementar considerablement la freqüència de MN i la parada en G2/M respecte el control sense tractar, com també es va veure que aquests marcadors estaven elevats de manera espontània en comparació amb la línia WT (figures 26A i 26B).

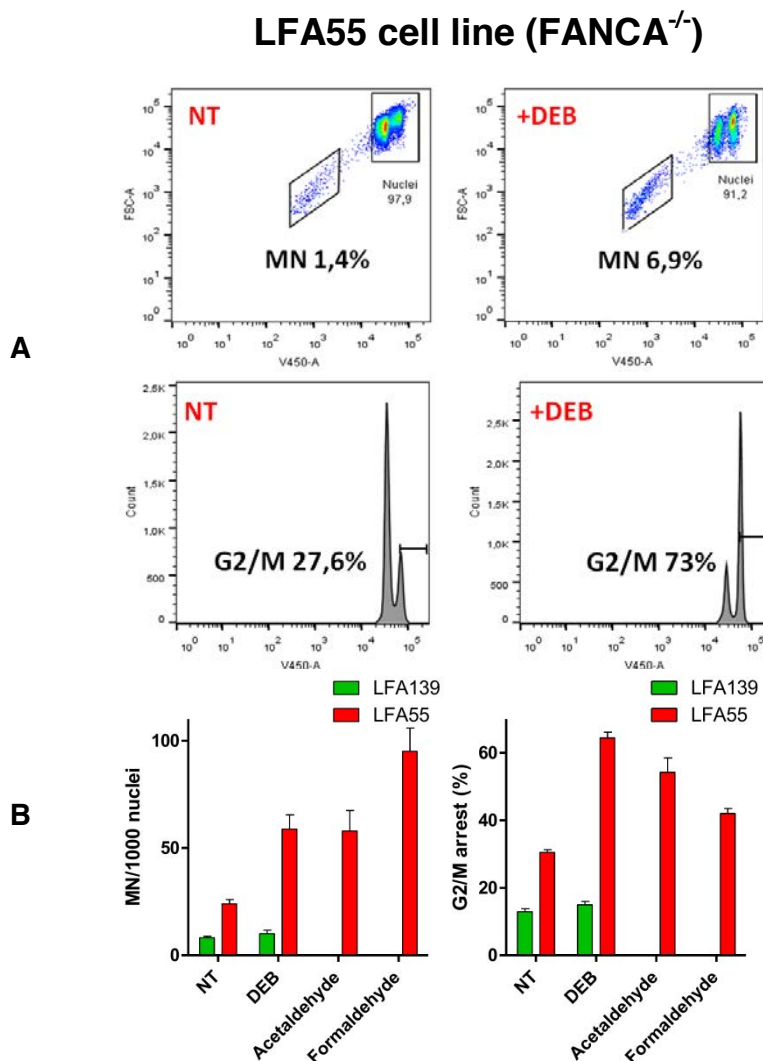


Figura 26. Assaig de MN en les línies limfoblàstics FA55 i FA139 després del tractament amb diferents agents inductors d'ICL. Les cèl·lules es van tractar amb DEB (0,1 µg/mL), formaldehid (200 µM, durant 1 hora) i acetaldehid (5 mM) durant 72 hores i es van processar les mostres segons s'ha descrit en l'apartat 3.3 dels materials i mètodes. El gràfic mostra la mitjana ± SEM d'almenys 3 experiments independents realitzats per triplicat. A) Finestres d'anàlisi de l'assaig de FCM on es mostra l'augment dels dos biomarcadors en la línia LFA55 després del tractament amb DEB. B) Els tres compostos incrementen la freqüència de MN i el bloqueig de les cèl·lules en fase G2/M en la línia Fanconi LFA55, en comparació amb la línia WT LFA139, on no hi ha increment després del tractament amb DEB. També, es mostra que la línia LFA55 té una freqüència basal de MN i parada del cicle cel·lular en G2/M augmentada en comparació amb la línia WT LFA139.

4.2. Efecte dels fàrmacs ja descrits en la literatura com a compostos beneficiosos en les cèl·lules Fanconi i cribatge d'una biblioteca redox

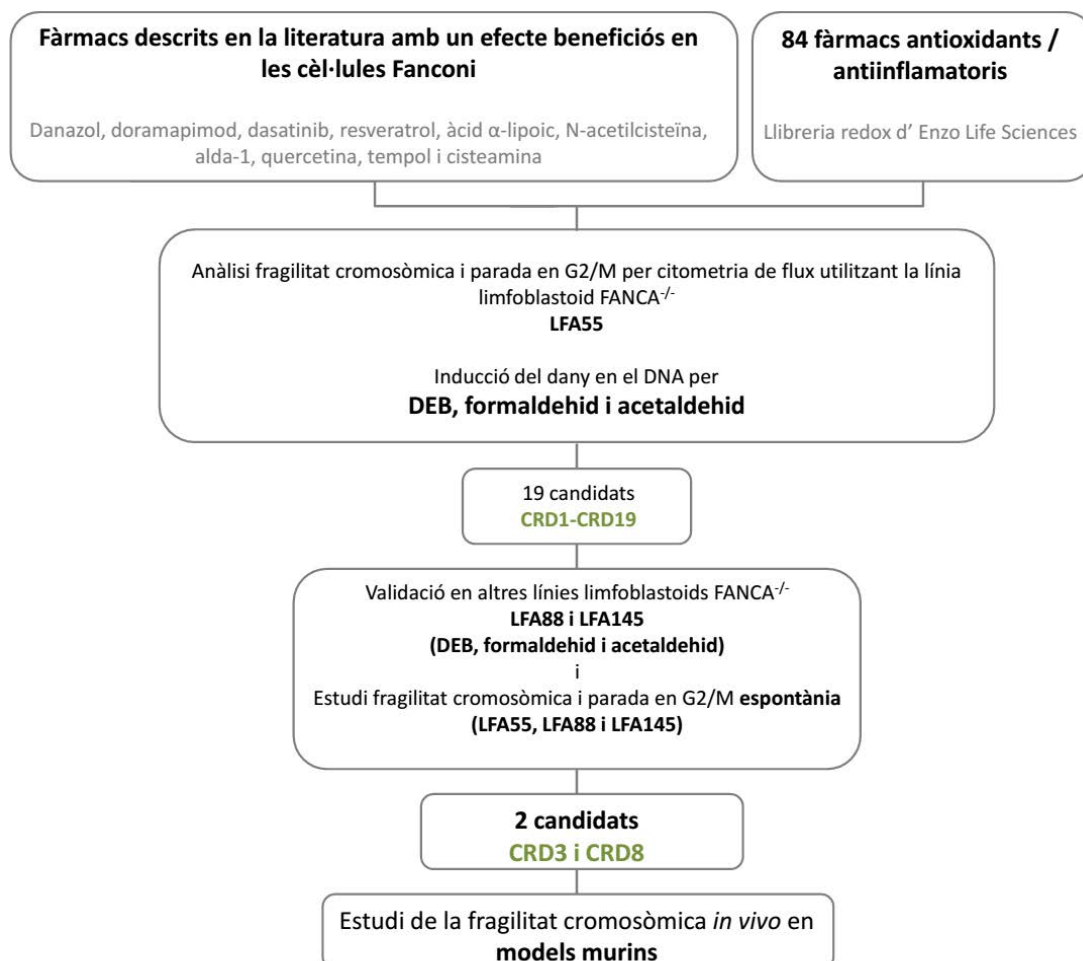


Figura 27. Esquema resum del projecte 1.

Inicialment es va avaluar per l'assaig de FCM l'efecte de 10 compostos antioxidants i inhibidors de p38 que ja estaven descrits en la literatura com a potencialment beneficiosos per les cèl·lules Fanconi (taula 10). Aquests compostos apareixen codificats com a CRD1, CRD3, CRD6, CRD7, CRD10, CRD11, CRD12, CRD17, CRD18 i CRD19.

Fàrmac	Model d'estudi	Referències
n-acetilcisteïna	<i>in vitro, in vivo</i>	(Reliene and Schiestl, 2006, Ponte <i>et al.</i> , 2011, Ponte <i>et al.</i> , 2012, Columbaro <i>et al.</i> , 2014).
tempol	<i>in vivo</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2008).
àcid α -lipoic	<i>in vivo</i>	(Ponte <i>et al.</i> , 2012).
cisteamina	<i>in vivo</i>	(Grompe <i>et al.</i> , not published)
alda-1	es proposa el seu ús	(Perez-Miller <i>et al.</i> , 2010, Neubauer <i>et al.</i> , 2015, Van Wassenhove <i>et al.</i> , 2016).
resveratrol	<i>in vitro, in vivo</i>	(Columbaro <i>et al.</i> , 2014, Zhang <i>et al.</i> , 2014)
quercetina	<i>in vivo</i> , assaig clínic fase I	(Li <i>et al.</i> , 2012), assaig clínic NCT01720147.
doramapimod	<i>in vitro</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
dasatinib	<i>in vitro</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
danazol	<i>in vitro</i>	(Liu <i>et al.</i> , 2014)

Taula 10. Fàrmacs ja descrits en la literatura amb un efecte beneficiós en l'anèmia de Fanconi.

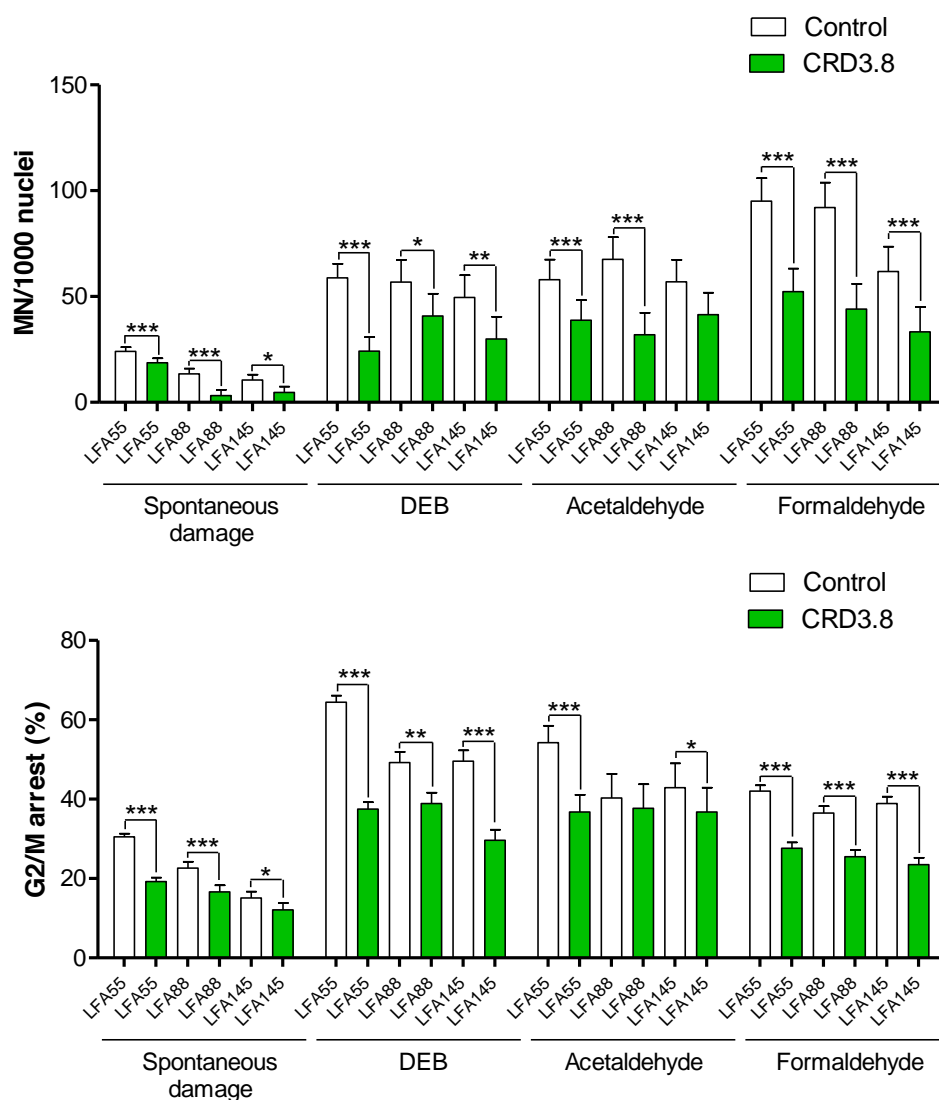
Després, es van voler identificar nous compostos que poguessin millorar o prevenir el fenotip de les cèl·lules Fanconi a partir del cribatge d'una biblioteca de 84 fàrmacs majoritàriament antioxidants, també codificats com a CRD. A la figura A4A de l'apartat d'annexos es mostren els 8 gràfics corresponents a l'efecte de tots els fàrmacs en la inestabilitat cromosòmica del primer cribatge utilitzant la línia cel·lular LFA55 després del tractament amb DEB, com també el tractament amb l'acetaldehid i el formaldehid I en condicions basals. S'observa que els compostos CRD2, CRD3, CRD4, CRD8, CRD9, CRD10, CRD11, CRD13, CRD14, CRD15, CRD16, CRD17 i CRD18 van disminuir tant la freqüència de MN com la parada en G2/M en aquesta línia cel·lular, en un o més tipus de dany. És per això que aquests fàrmacs es van seleccionar per tal de validar i demostrar el seu efecte en les línies Fanconi LFA88 i LFA145 (figura A4B i A4C de l'apartat d'annexos). També, es van incloure els compostos CRD1, CRD6, CRD7, CRD12 i CRD19, degut a que ja estaven descrits prèviament com a beneficiosos en la literatura tot i que en aquest primer cribatge no se n'observés cap efecte positiu, per tal d'observar si es confirmava el seu potencial tractant-los en una altra línia Fanconi amb un fons genètic diferent. D'altra banda, els compostos CRD21, CRD34, CRD37, CRD61, CRD50, CRD51, CRD57 i CRD66 es van descartar d'incloure'ls en el segon cribatge ja que revisant la literatura no es va considerar que fossin adequats per tractar els pacients Fanconi de manera crònica. S'observa que els compostos CRD3 i CRD17 disminueixen la fragilitat cromosòmica i la parada en G2/M tant en la línia cel·lular LFA88 com la LFA145 de manera espontània, el que els faria bon candidats pel tractament dels pacients ja que aquests no acostumen a estar exposats a cap tipus de dany extern com els utilitzats per aquest cribatge. Els fàrmacs

CRD3, CRD11 i CRD17 van disminuir els dos biomarcadors quan es va induir el dany amb el DEB, el CRD8, CRD14, CRD15, CRD16, CRD17 i CRD18 després del tractament amb acetaldehid i el CRD3, CRD8, CRD11, CRD14, CRD17 i CRD18 amb el formaldehid, tots ells en les dues línies cel·lulars utilitzades LFA88 i LFA145. L'efecte de tots aquests fàrmacs, excepte el del CRD14 amb el dany causat pel formaldehid, ja s'havia observat en el primer cribatge amb l'ús de la línia cel·lular LFA55 i per tant, es valida el seu efecte. En canvi, els compostos CRD4, CRD8, CRD14 i CRD15 van millorar el dany induït amb el DEB, el CRD2, CRD4, CRD5 el dany causat per l'acetaldehid i el CRD1 i CRD10 quan les cèl·lules es van exposar al formaldehid, únicament en la línia cel·lular LFA88. D'altra banda, el CRD9 i el CRD18 van reduir el dany causat pel DEB, el CRD12 i CRD9 el de l'acetaldehid i el CRD12 el del formaldehid, només en la línia cel·lular LFA145. Els gràfics de les figures A4 de l'apartat d'annexos s'han obtingut a partir de les dades detallades a la taula A1 del mateix apartat, on s'especifiquen tots els resultats obtinguts del primer cribatge junt amb els de les validacions, i apareix cada compost amb l'efecte en cadascun dels biomarcadors (freqüència de MN i bloqueig en G2/M) en les diferents línies cel·lulars i els diferents tipus de dany induïts. D'altra banda, a la taula A2 de l'apartat d'annexos es mostren les dades corresponents als fàrmacs que redueixen significativament els dos biomarcadors, classificats de la mateixa manera que les dades de la taula A1 de l'apartat d'annexos. Junt amb aquesta taula, es mostren també 24 gràfics corresponents a les dades de la taula A2 de l'apartat d'annexos i on es mostren els fàrmacs potencialment candidats per reduir la inestabilitat cromosòmica en les cèl·lules Fanconi (figura A5).

Considerant tots els resultats obtinguts, els millors candidats van ser el CRD3, CRD17, CRD18, CRD8, CRD11 i CRD14, ja que redueixen la fragilitat cromosòmica en almenys 3 tipus de dany diferents i aquest efecte es confirma, la majoria de vegades, en 2 o 3 línies cel·lulars Fanconi. Tot i això, per moure'ns a experiments *in vivo* i tractar models murins Fanconi es va haver de fer una selecció més exhaustiva de tots els fàrmacs antioxidants candidats, ja que no era viable disposar de tants animals. Finalment, es van seleccionar els compostos CRD3 i CRD8, pel seu bon perfil de toxicitat reportat en la literatura i el seu mecanisme d'acció similar. Tots dos fàrmacs tenen un benefici potencial molt bo pel tractament dels pacients Fanconi com a fàrmacs de reposició, són barats i es poden prendre oralment. A la figura 28 es mostren els resultats obtinguts en l'assaig de FCM dels dos fàrmacs seleccionats com a candidats per tractar els ratolins Fanconi. En aquests gràfics es mostra com el compost CRD3.8 redueix significativament tant la freqüència de MN com la parada en

G2/M del dany espontani i del dany induït tant pel DEB com pel formaldehid en les 3 línies cel·lulars. En el cas del dany causat per l'acetaldehid, el compost va disminuir la freqüència de MN en les línies cel·lulars LFA55 i LFA88, com també es veu una tendència en la reducció de la fragilitat cromosòmica en la línia LFA145 sense arribar a ser significativa després de l'anàlisi estadístic aplicat. En referència a la parada en G2/M, es va observar una reducció en les línies LFA55 i LFA145 quan es van tractar amb aquest tipus de dany. D'altra banda, el compost CRD3.8 mostra una baixada no significativa de la freqüència de MN espontània i induïda pel DEB en les línies LFA55 i LFA145 i redueix significativament la parada en G2/M en les 3 línies cel·lulars. Pel que fa tant al dany causat pel DEB en la línia LFA88, com el dany induït per l'acetaldehid i el formaldehid en totes les línies cel·lulars, s'observa una disminució significativa dels dos biomarcadors en tots els casos.

A



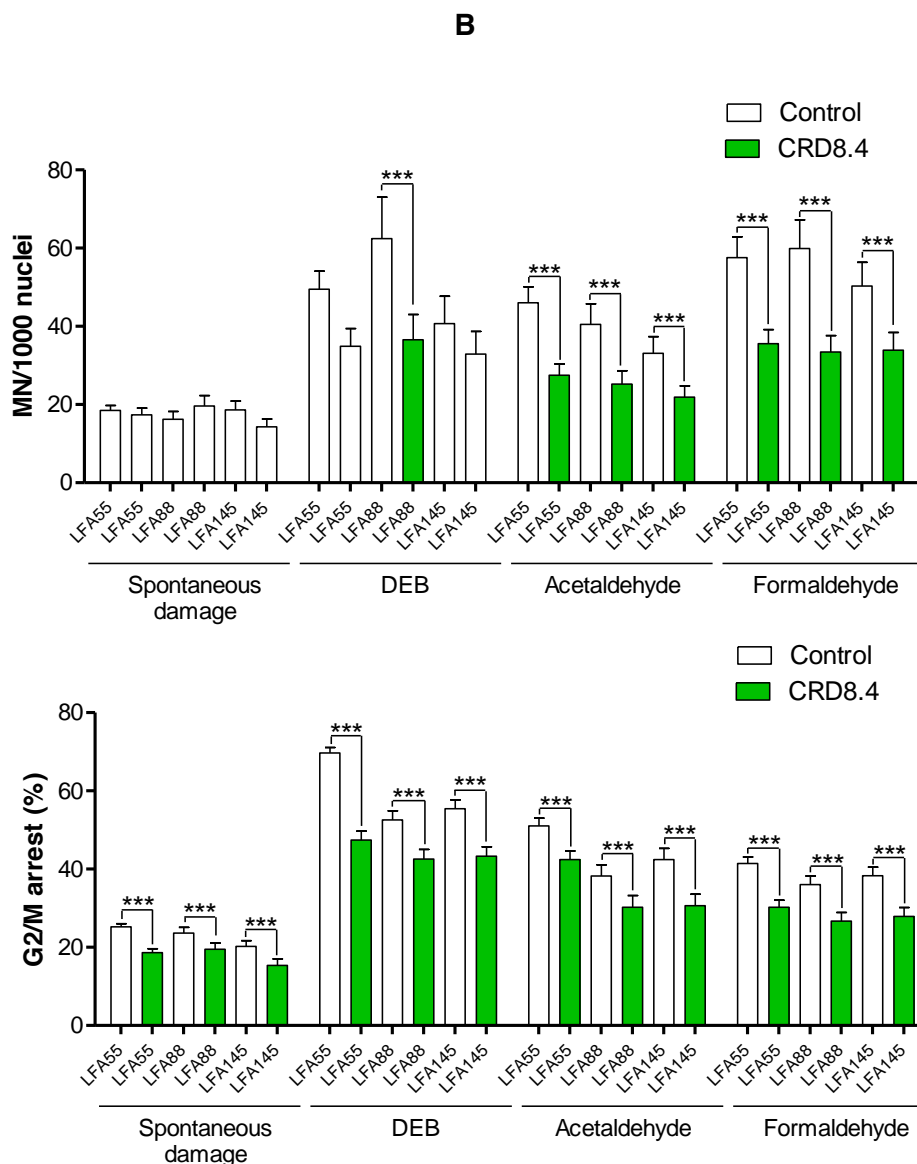


Figura 28. Efecte dels compostos CRD3.8 i CRD8.4 en la fragilitat cromosòmica i la parada en G2/M espontània i induïda per diferents agents inductors d'ICLs en tres línies limfoblàstoids Fanconi. Les línies cel·lulars LFA55, LFA88 i LFA145 es van tractar amb el CRD3.8 (A) i amb el CRD8.4 (B) en absència o presència de DEB (0,1 µg/ml), formaldehid (200 µM durant 1 hora) i acetaldehid (5 mM). Els resultats es presenten com la freqüència de MN cada 1.000 nuclis o el percentatge de cèl·lules en fase G2/M del cicle cel·lular. En el gràfic es mostra la mitjana ± SEM d'almenys 3 rèpliques. El control es correspon a la mostra sense tractar i totes les dades estan normalitzades amb l'anàlisi estadístic. La significació es va determinar amb el valor p i es va graficar amb un * quan va ser menor de 0,05, ** menor de 0,01 i *** menor de 0,001.

4.3. Estudi *in vivo* en model de ratolí *Fanca*^{-/-} amb els fàrmacs candidats

4.3.1. Anàlisi de marcadors de fragilitat *in vivo* en sang de ratolí

Es van seleccionar els fàrmacs CRD3 i el CRD8 per realitzar els experiments *in vivo* en ratolins Fanconi. Per posar a punt la tècnica, es van utilitzar mostres de sang de 10 ratolins WT i 10 ratolins *Fanca*^{-/-} (Cheng *et al.*, 2000) per determinar si hi havia

diferències en els biomarcadors d'estudi (percentatge de reticulòcits, reticulòcits amb MN i eritròcits madurs amb MN), de manera que es podrien intentar millorar amb el tractament dels compostos candidats. En la figura 29 s'observa que els ratolins Fanconi presenten nivells més baixos de reticulòcits (figura 29A) en comparació amb els WT i un percentatge més elevat de reticulòcits amb MN (figura 29B) i eritròcits madurs amb MN (figura 29C), comparat amb els ratolins sans. Per tant, aquests biomarcadors es troben alterats en els ratolins Fanconi, el que indica que hi ha un dany basal que es pot explicar amb l'alta producció de ROS per la manca d'una ruta FA/BRCA funcional associada a la falta de reparació dels ICLs, per inflamació o la presència de formaldehid endogen. Aquests biomarcadors, per tant, podrien ser millorats amb el tractament dels fàrmacs candidats per tal de veure si es poden igualar als valors dels ratolins sans.

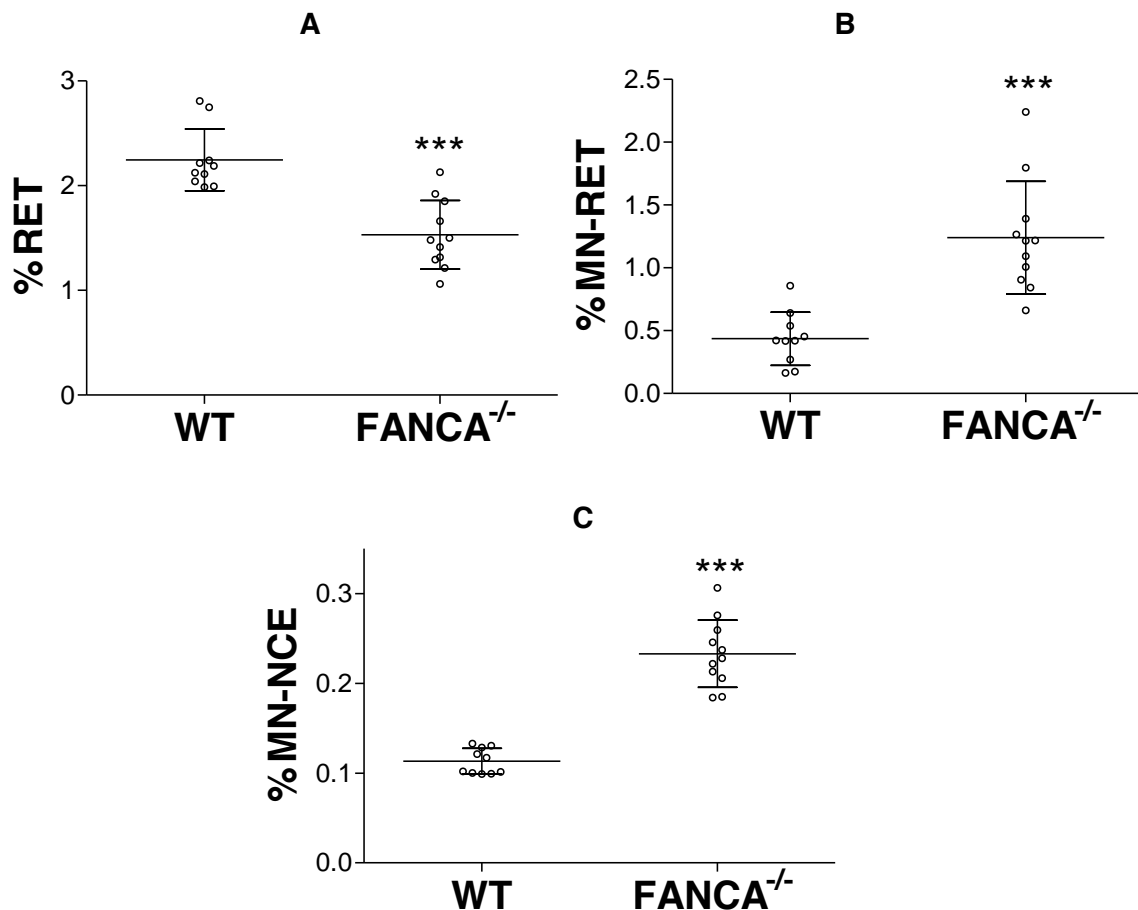
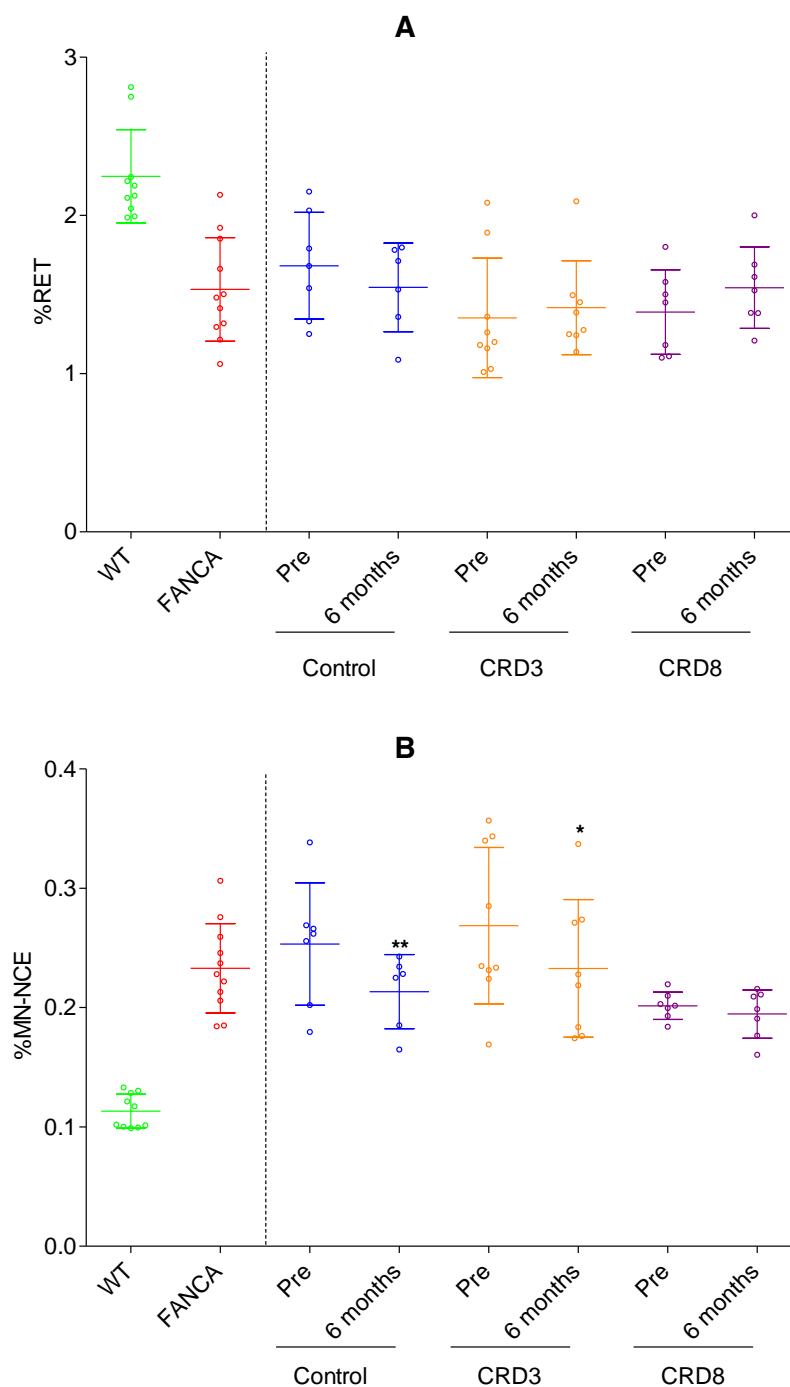


Figura 29. Fragilitat cromosòmica de les cèl·lules sanguínies en els ratolins Fanconi.

A partir de mostres de sang de 10 ratolins WT i 10 ratolins Fanconi es van determinar el percentatge de reticulòcits (A), la freqüència de reticulòcits amb MN (B) i la d'eritròcits madurs amb MN (C). Els resultats es presenten com el percentatge de reticulòcits respecte la suma de reticulòcits i eritròcits madurs multiplicat per 100 (A), el número de reticulòcits amb MN respecte els reticulòcits totals multiplicat per 100 (B) i el número d'eritròcits madurs amb MN respecte els eritròcits madurs totals multiplicat per 100 (C). En el gràfic es mostra la mitjana \pm SD dels 10 ratolins analitzats en cada grup. L'anàlisi estadístic utilitzat va ser una Anova d'un factor amb correcció de Bonferroni.

Un cop es van anar tractant els ratolins Fanconi amb els compostos CRD3 i el CRD8, ambdós dissolts en aigua bevable, es van enviar mostres des de Madrid d'aquests dos grups de tractament junt amb els ratolins control sense tractar, per tal de processar-les al nostre laboratori i anar determinant els tres biomarcadors esmentats durant les setmanes 1, 4, 6, 8, 12, 16 i 24. Com es veu a la figura 30, en cap d'aquests temps es veu una millora del percentatge de reticulòcits (figura 30A), dels eritròcits madurs amb MN (30B) ni dels reticulòcits amb MN (30C). No obstant, cal afegir que els primers ratolins que van morir van ser del grup control en els dies 82 i 177 després de començar el tractament i van morir en cap de setmana, amb la conseqüència que no es van poder obtenir mostres de sang quan es van trobar morts.



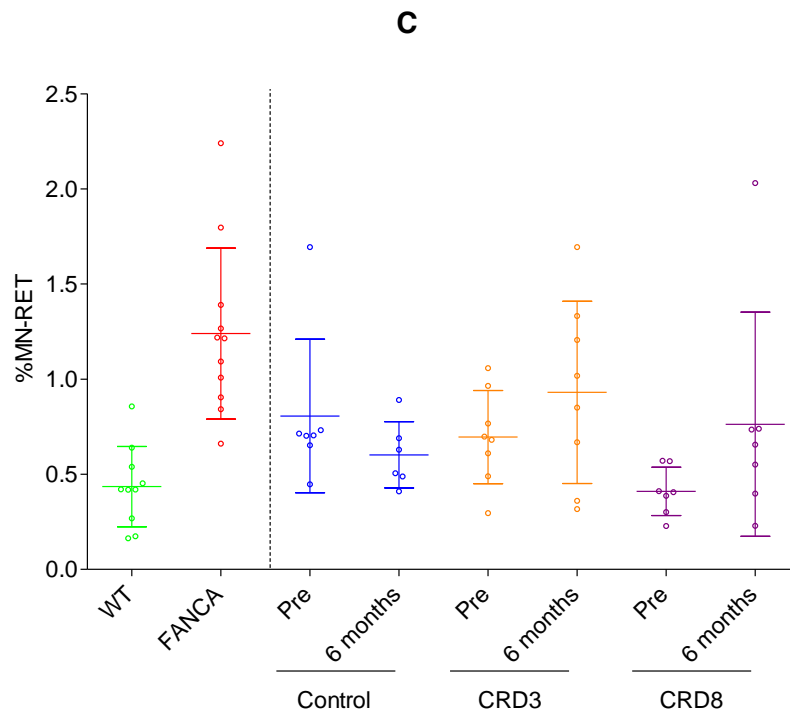


Figura 30. Manca d'efecte dels compostos CRD3 i CRD8 en la fragilitat cromosòmica de les cèl·lules sanguínies dels ratolins *Fanca*^{-/-}. Es van tractar 10 ratolins Fanconi amb el compost CRD3 i 10 ratolins Fanconi amb CRD8 dissolent els fàrmacs en aigua bevable, com també es va afegir un grup control amb ratolins sense tractar. A Madrid, es van extreure les mostres de sang durant les setmanes 1, 4, 6, 8, 12, 16 i 24 i es van processar al nostre laboratori segons el protocol descrit a l'apartat X de materials i mètodes i es van determinar el percentatge de reticulòcits (A) i la freqüència de MN en reticulòcits (B) i eritròcits madurs (C). Els resultats es presenten com el percentatge de reticulòcits respecte la suma de reticulòcits i eritròcits madurs multiplicat per 100 (A), el número de reticulòcits amb MN respecte els reticulòcits totals multiplicat per 100 (B) i el número d'eritròcits madurs amb MN respecte els eritròcits madurs totals multiplicat per 100 (C). En el gràfic es mostra la mitjana ± SD dels 10 ratolins analitzats en cada grup. L'anàlisi estadístic utilitzat va ser una Anova d'un factor amb correcció de Bonferroni.

4.3.2. Supervivència i seguiment dels ratolins *Fanca*^{-/-} amb els compostos CRD3 i CRD8

En la figura 31 es mostren els resultats de supervivència després d'11 mesos de tractament dels ratolins *Fanca*^{-/-}. El 60 % dels ratolins control van morir o van ser sacrificats per pèrdua de més d'un 20 % del pes al final de l'experiment (morts als 82, 177, 217, 307, 321 i 325 dies post-tractament). Els ratolins van ser sagnats repetides vegades durant l'experiment esmentat anteriorment i la seva mort era previsible al llarg dels mesos ja que ja s'havia descrit anteriorment que els ratolins *Fanca*^{-/-} pateixen col·lapse de cèl·lules mare hematopoètiques després d'infeccions o pèrdua de sang crònica (Walter *et al.*, 2015).

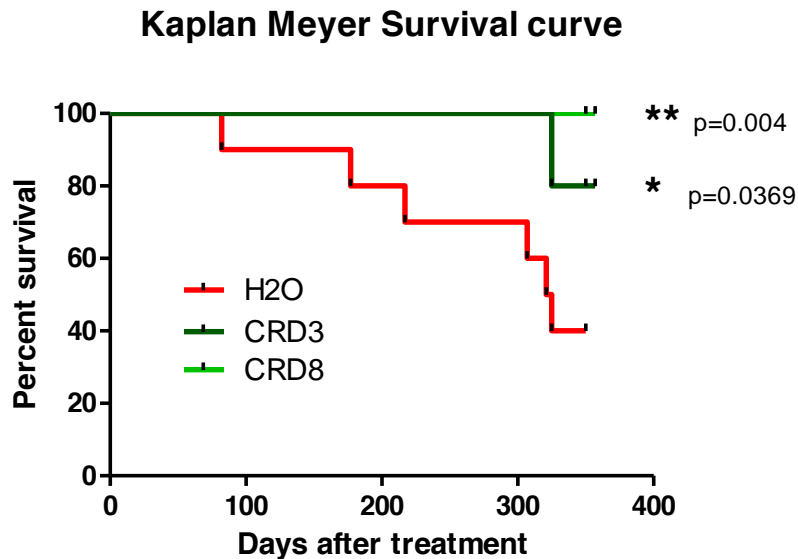


Figura 31. Efecte dels compostos CRD3 i CRD8 en la supervivència dels ratolins Fanconi. Es van tractar 10 ratolins *Fanca^{-/-}* amb el compost CRD3 i 10 ratolins *Fanca^{-/-}* amb CRD8 dissolent els fàrmacs en aigua bevable, com també es va afegir un grup control amb ratolins *Fanca^{-/-}* sense tractar. Durant tot l'experiment, quan els ratolins presentaven mal aspecte, pèrdua de pes i/o tumors s'anaven sacrificant. Es va finalitzar l'experiment després de 357 dies de tractament i es van sacrificar tots els ratolins que quedaven vius. El gràfic de Kaplan-Meier mostra el percentatge de ratolins vius que queden al llarg dels mesos.

És important destacar que les anàlisis patològiques *postmortem* van indicar que alguns ratolins morts del grup control van patir múltiples tumors en la melsa, fetge o pulmó. Tot i això, només 2 dels 10 ratolins tractats amb CRD3 van haver de ser sacrificats per pèrdua de pes i presentaven algun tipus de tumor (morts als 325 dies post-tractament). També, de manera molt interessant, tots els ratolins del grup tractats amb CRD8 estaven vius i sans al final de l'experiment. Addicionalment, es va realitzar una medicació dels paràmetres hematològics i es va determinar el nivell de plaquetes (figura A6A d'annexos), eritròcits (figura A6B d'annexos), leucòcits (figura A6C d'annexos), hemoglobina (figura A6D d'annexos) i granulòcits (figura A6E d'annexos) fins els 11 mesos que va durar l'experiment i cal destacar que els valors de tots aquests paràmetres no van variar al llarg dels mesos ni tampoc es van observar diferències entre grup control i grups amb tractament. No obstant, no s'ha descrit que els ratolins Fanconi patissin fallada hematològica i, per tant, el fet de no mostrar un fenotip sever complica que es pugui observar una millora d'aquests biomarcadors. També, cada setmana es va monitoritzar el pes dels animals, la ingesta de menjar i la d'aigua bevable i durant tot l'estudi s'observa que els animals tractats amb CRD3 i CRD8 menjaven i bevien menys, respecte el grup control (figura A7A i A7B d'annexos), i, per tant, el pes dels animals d'aquests grups també va ser menor (figura A7C d'annexos). Un cop acabat l'estudi, es van sacrificar els animals i es va realitzar un anàlisi de la bioquímica bàsica, per conèixer els nivells de glucosa (figura A8A), proteïna total

(figura A8B), amilasa (figura A8C), fosfatasa alcalina (figura A8D), creatinina (figura A8E) i alanina aminotransferasa (figura A8F), per tal de saber l'estat general de l'animal al final del tractament. Els valors de glucosa van ser menors en els dos grups que van rebre tractament de fàrmacs antioxidants respecte el grup control, el que podria indicar una millora de la salut general dels animals que explicaria els resultats de la supervivència prolongada. La resta de valors no es van veure afectats, i per tant, sembla que els compostos administrats crònicament no alteren els paràmetres bioquímics analitzats.

4.4. Algoritmes *in silico* per predir els mecanismes d'acció comuns dels fàrmacs candidats CRD3 i CRD8

Finalment, l'empresa Intelligent Pharma® va realitzar algoritmes utilitzant el software Pythia *in silico* per predir els mecanismes d'acció dels dos fàrmacs per tal de trobar mecanismes comuns que puguin explicar els efectes observats. Tal i com es mostra a la taula 11, es va predir que el CRD3 i el CRD8 tenen com a diana diferents proteïnes que podrien reduir el dany oxidatiu, incrementen la reparació del DNA o directament reparen els ICLs. Per tant, tindriem mecanismes comuns que podrien explicar la millora del fenotip Fanconi en el ratolí, com per exemple, menys producció de ROS, una incrementada reparació del DNA o una inflamació disminuïda. Per tant, en aquest estudi es proposa els compostos CRD3 i CRD8 com a fàrmacs de reposició potencials per la teràpia de prevenció del pronòstic Fanconi.

Funció	Dianes predites
Disminució del ROS	3
Augmenten la reparació del DNA	5
Reparació d'ICLs endogens / detoxificació d'aldehids	2

Taula 11. Predicció de dianes biològiques obtingudes amb el software Pythia de l'empresa Intelligent Pharma®.

**PROJECTE 2. Cribatge de fàrmacs per reactivar
la ruta FA/BRCA**

4.5. HCS per recuperar la deficiència de la proteïna FANCA

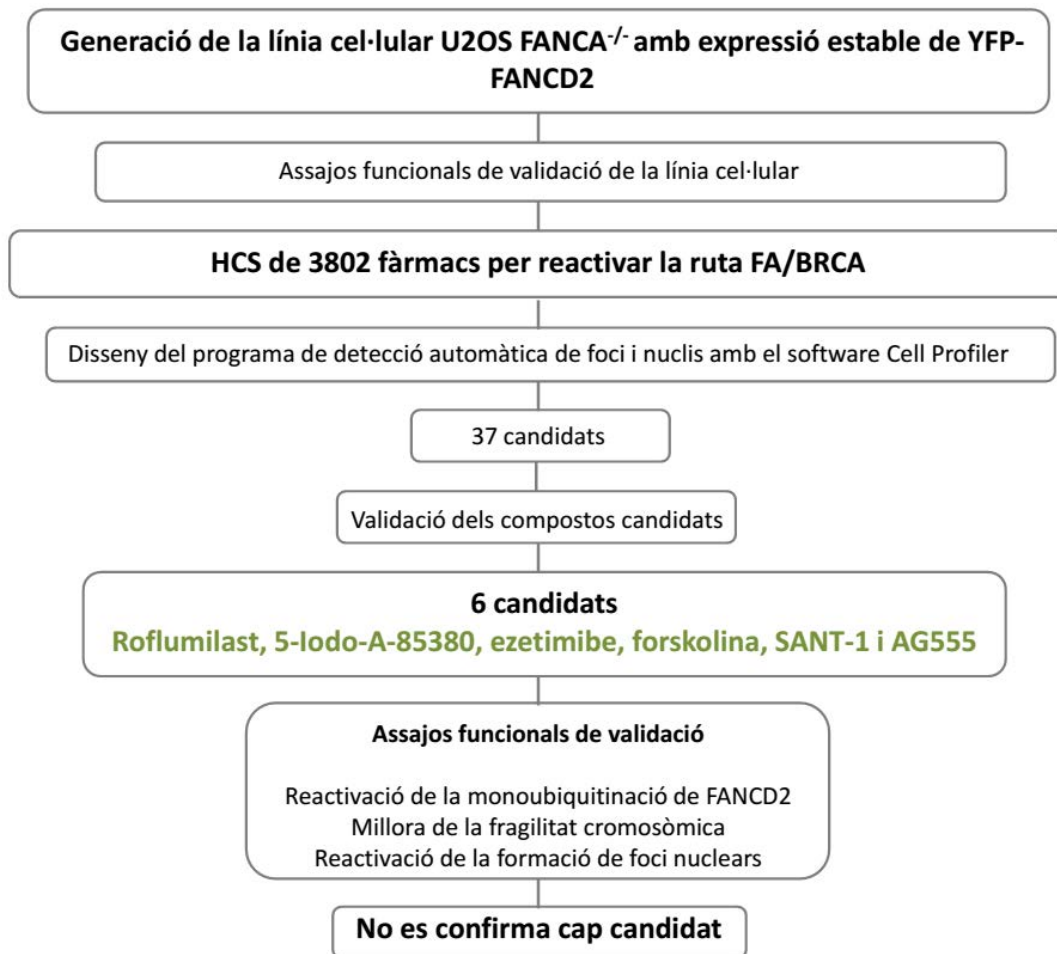


Figura 32. Esquema resum del projecte 2.

4.5.1. Generació de la línia cel·lular U2OS FANCA^{-/-} amb expressió estable de la proteïna fluorescent YFP-FANCD2

Per tal de poder realitzar un HCS per reactivar la ruta FA/BRCA no funcional, es va posar a punt un sistema cel·lular basat en la detecció de *foci* de FANCD2. Un dels requeriments per poder dur a terme el tractament dels fàrmacs amb la infraestructura de cribatge va ser el d'utilitzar la línia cel·lular d'osteosarcoma U2OS, extensament utilitzada en aquest àmbit, però amb un fons genètic Fanconi.

4.5.1.1. Producció de la línia U2OS FANCA^{-/-} amb la tecnologia TALEN

Es va recórrer a la tecnologia TALEN per generar els clons en la línia cel·lular U2OS. Tal i com es mostra a la figura 33, es van obtenir dos clons, anomenats 2F8 i 2G7 sense expressió de FANCA per WB. També, es pot observar que després del tractament amb MMC, la ruta FA/BRCA estava inactiva ja que no s'observa expressió de la segona banda de la proteïna FANCD2 monoubiquitinada.

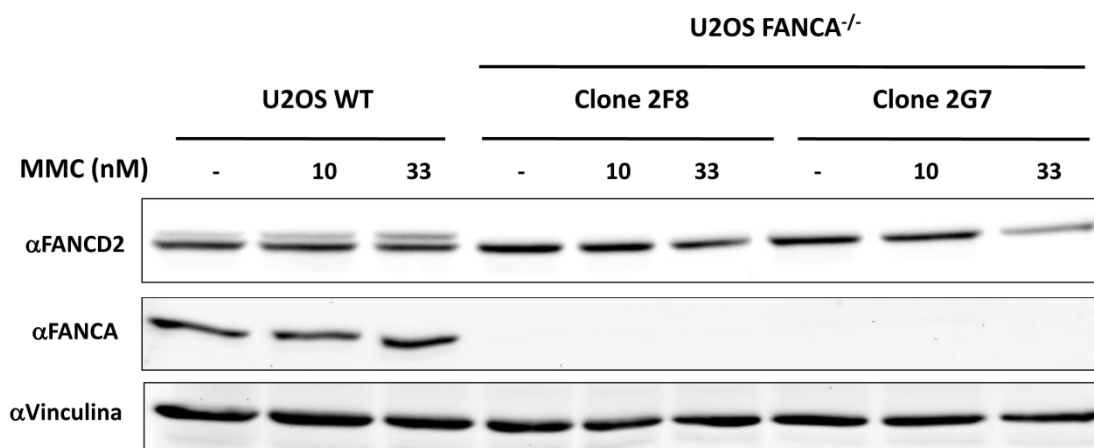


Figura 33. Anàlisi de l'expressió de FANCA i activació de FANCD2 dels clons FANCA^{-/-} obtinguts a partir de la línia U2OS per la tecnologia TALEN. Les cèl·lules es van tractar amb MMC a dosis 10 i 33 nM durant 24 hores. Les cèl·lules es van lissar i es va observar l'expressió de FANCA i de FANCD2 per WB, utilitzant la vinculina com a control de càrrega.

4.5.1.2. Seqüenciació de FANCA dels clons obtinguts

Es va comprovar per seqüenciació de l'exó 1 del gen *FANCA* que s'havia produït una deleció que feia perdre el correcte marc de lectura obert (*open reading frame*, ORF). La figura 34A, corresponent al clon 2F8, mostra que s'ha produït l'escissió de 7 parells de base de l'exó 1, en canvi, la figura 34B, corresponent al clon 2G7, mostra l'escissió de 83 parells de base del mateix exó.

A

FANCA exon 1 sequence of the 2F8 clone

Primers	Left Primer Sequence	Right Primer Sequence	Annealing Temperature (°C)	Special Conditions Used for PCR	Expected PCR Product Size (bp)	%GC
FANCA-talenF FANCA-talenR	TCATCCCGGCAGGAACCAAC	GGAGAAACCCACCAGCGACA	60	10%DMSO	825	77.2

```

tcattcccggcagggaaccagcgttgaggggcggaagctctgcccgcgcgagacgccccgcggactacaccgcgggcgaagcacaacgcaaaaact
acctcaccgcgcgacggcgcctccccaggaccaaataggcaccgacgaaggcctcgacctgaggggcgctggcctggccgcccagcacaacgggt
gtgcgcgcttggccgcagccaaataggaaaggcagcgcgggctcgggcgagggaGCCCGCCGCGGGGCTCAGTCCGACTCGT
GGTCCCGAAGTCCGCTCCGGCCAGACCCAGGGGGCCGCCGAGGGCCCTGGCCGAGCTGCTGGgtaggtgggcgcggaaggccgaggagtggtggc
ggcgtccggcccgggacgggttccgcgggttcccgatcccttcccgcagagcctccgcccgtcgatccccggacgcgcgcgggggggctgtgc
ggggtgggcggccggctggggcggcggctgctcggaccggccctcctgcgctgggaggaagccccaagcgcgcggcgggggctccct
tcttcccgaacgcccggccggcgcgcctgtcaggcgggctgggggtgcgcggcctggggtccctcagcgcagaggcggccctcgcagc
cgtccccgggtccctgctcggccctcctgggcgcttcccggcgtccgcgggtggggcgtctccgttagttcccgaagcctgcgcctgg
ggaggagccccggccctcttcgggagggtgtcgcctgggtttctcc

```

B

FANCA exon 1 sequence of the 2G7 clone

Primers	Left Primer Sequence	Right Primer Sequence	Annealing Temperature (°C)	Special Conditions Used for PCR	Expected PCR Product Size (bp)	%GC
FANCA-talenF FANCA-talenR	TCATCCCGGCAGGAACCAAC	GGAGAAACCCACCAGCGACA	60	10%DMSO	825	77.2

```

tcattcccggcagggaaccagcgttgaggggcggaagctctgcccgcgcgagacgccccgcggactacaccgcgggcgaagcacaacgcaaaaact
acctcaccgcgcgacggcgcctccccaggaccaaataggcaccgacgaaggcctcgacctgaggggcgctggcctggccgcccagcacaacgggt
gtgcgcgcttggccgcagccaaataggaaaggcagcgcgggctcgggcgagggaGCCCGCCGCGGGGCTCAGTCCGACTCGT
GGTCCCGAAGTCCGCTCCGGCCAGACCCAGGGGGCCGCCGAGGGCCCTGGCCGAGCTGCTGGgtaggtgggcgcggaaggccgaggagtggtggc
ggcgtccggcccgggacgggttccgcgggttcccgatcccttcccgcagagcctccgcccgtcgatccccggacgcgcgcgggggggctgtgc
ggggtgggcggccggctggggcggcggctgctcggaccggccctcctgcgctgggaggaagccccaagcgcgcggcgggggctccct
tcttcccgaacgcccggccggcgcgcctgtcaggcgggctgggggtgcgcggcctggggtccctcagcgcagaggcggccctcgcagc
cgtccccgggtccctgctcggccctcctgggcgcttcccggcgtccgcgggtggggcgtctccgttagttcccgaagcctgcgcctgg
ggaggagccccggccctcttcgggagggtgtcgcctgggtttctcc

```

Figura 34. Seqüenciació de l'exó 1 del gen FANCA en els clons 2F8 (A) i 2G7 (B). Es va extreure el DNA a partir d'un botó cel·lular congelat de cada clon obtingut sense expressió de FANCA per WB i es va enviar a seqüenciar amb els encebadors senyalats en blau (esquerra) i groc (dret).

4.5.1.3. Anàlisi de la viabilitat cel·lular dels clons obtinguts

Es va voler comprovar el fenotip cel·lular dels clons obtinguts per veure si els clons eren sensibles al tractament de l'agent inductor d'ICLs MMC i es va estudiar la seva viabilitat cel·lular. La figura 35 mostra la corba de supervivència tant de la línia U2OS WT, utilitzada com a control sa, com dels 2 clons obtinguts sense expressió de FANCA i s'observa com els dos clons tenen una sensibilitat molt similar a la MMC, bastant més elevada que la de la línia control. Per tant, es confirma que aquestes línies tenen un fenotip Fanconi.

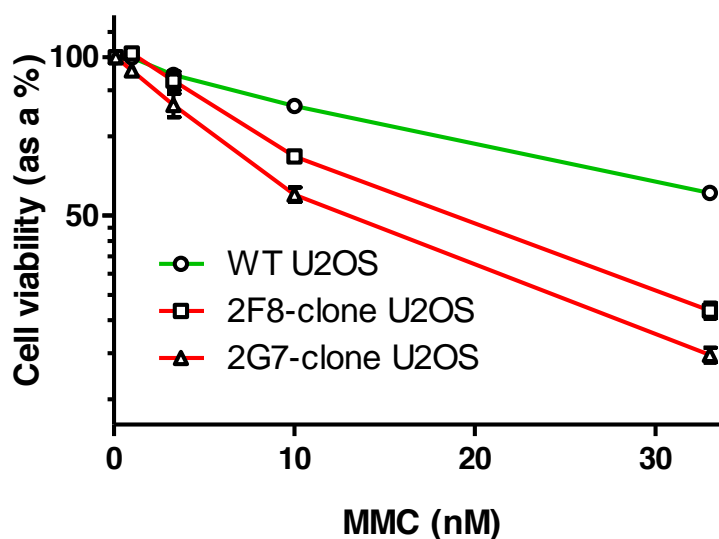


Figura 35. Sensibilitat a la MMC dels clons $FANCA^{-/-}$. Es va utilitzar els clons 2F8 i 2G7 i el control WT de la línia U2OS i es van tractar a una corba de dosis de MMC entre 1 i 100 nM. El control sense tractar està normalitzat al 100 % i els resultats es presenten com el percentatge de cèl·lules vives respecte les cèl·lules sense tractament. El gràfic mostra la mitjana \pm SEM d'almenys 3 experiments independents amb resultats similars.

4.5.1.4. Obtenció de la línia U2OS $FANCA^{-/-}$ estable per l'expressió de YFP-FANCD2

Es va seleccionar el clon 2F8 per produir la línia estable per expressió de YFP-FANCD2 i es va comprovar la seva expressió per WB. La figura 36 mostra l'expressió tant de la proteïna FANCD2 endògena com de YFP-FANCD2, aquesta segona de més pes molecular. També, es pot observar que després del tractament amb HU, la ruta FA/BRCA només es va poder activar en la línia corregida amb el plasmidi FANCA, però no en absència de l'expressió d'aquest gen, ja que no s'observa la segona banda de la proteïna FANCD2 monoubiquitinada.

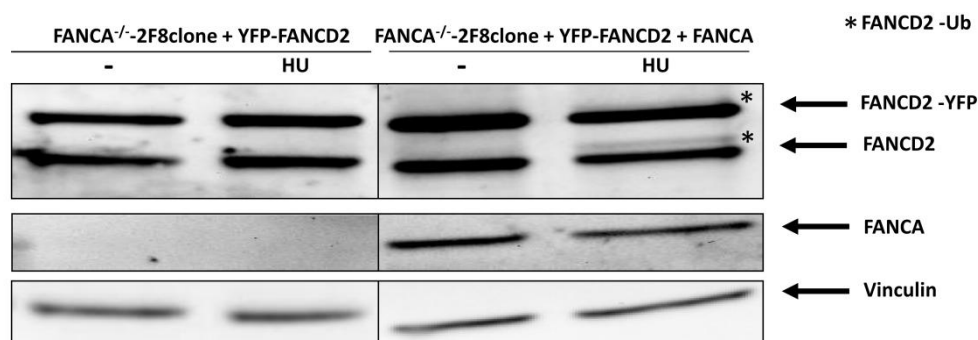


Figura 36. Anàlisi de l'expressió de FANCD2 endògena i YFP-FANCD2 del clon 2F8 obtingut a partir de la línia U2OS. Les cèl·lules es van tractar amb HU a una dosi de 2 mM durant 24 hores i les cèl·lules es van lisar i es va observar l'expressió de FANCA i de FANCD2 per WB, utilitzant la vinculina com a control de càrrega. La banda superior marcada amb un asterisc indica FANCD2-Ub.

4.5.1.5. Observació de *foci* nuclears per microscopia confocal

La formació de *foci* de FANCD2 després d'induir el dany en el DNA és un indicador molt utilitzat per comprovar que la ruta FA/BRCA funciona perfectament, almenys *upstream* a la monoubiquitinació de FANCD2. Per tal d'identificar compostos que puguin recuperar la funcionalitat de la ruta en cèl·lules Fanconi, es va posar a punt aquest sistema basat en cèl·lules U2OS FANCA^{-/-} que expressen de manera estable la proteïna YFP-FANCD2. Abans de fer el cribatge de compostos, ens vam assegurar que aquestes cèl·lules no formaven *foci* de YFP-FANCD2 després del tractament amb dany, i que quan es tornava a expressar la proteïna FANCA, es recuperava la ruta i es tornava a veure la formació de *foci*, el que es va utilitzar com a control positiu. En la figura 37A es mostren imatges obtingudes per microscopia confocal on s'observa que les cèl·lules U2OS FANCA^{-/-} després d'un tractament de 24 hores amb HU no formen *foci* nuclears i que l'expressió de YFP-FANCD2 és totalment difusa. En canvi, la figura 37B mostra aquesta mateixa línia cel·lular quan va ser corregida amb la transducció d'un plasmidi que contenia la proteïna FANCA WT, i s'observa la recuperació de la formació de *foci* i, per tant, la reactivació de la ruta FA/BRCA.

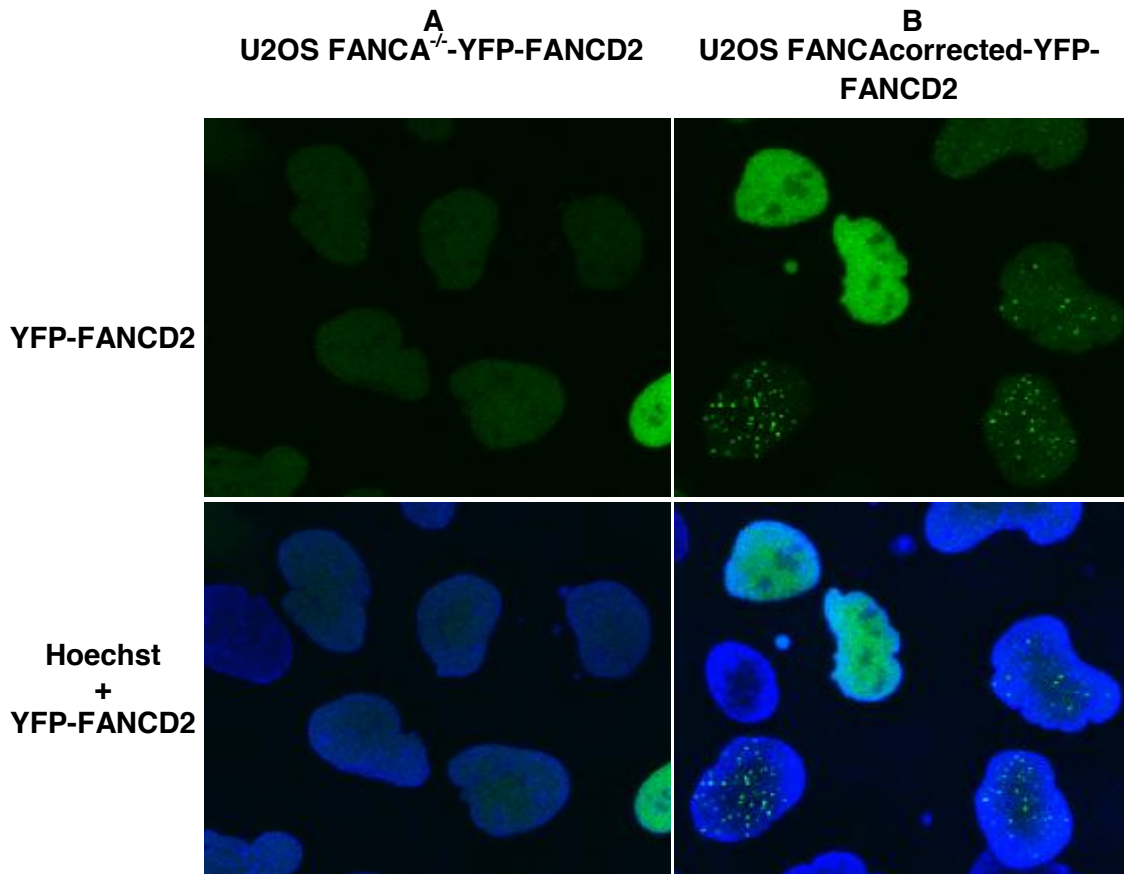


Figura 37. Manca de formació de *foci* en la línia Fanconi després d'induir trencaments de doble cadena en el DNA. A) La línia U2OS FANCA^{-/-}-YFP-FANCD2 no pot formar *foci* nuclears després del tractament amb HU. B) La línia U2OS FANCA^{corrected}-YFP-FANCD2 reactiva la ruta FA/BRCA i forma *foci* nuclears. Les cèl·lules es van tractar amb HU a una dosis de 2 mM, es van fixar a les 24 hores i es van observar amb un microscopi confocal.

4.5.2. HCS per reactivar la ruta FA/BRCA

Amb la finalitat de trobar algun fàrmac eficient pel tractament de l'anèmia de Fanconi, es va realitzar un HCS utilitzant 3 biblioteques que contenen aproximadament 3800 compostos, d'entre ells la biblioteca Prestwick, amb 1280 compostos aprovats com a medicaments per la FDA. D'aquesta manera, es pretenia descobrir noves indicacions de fàrmacs ja utilitzats prèviament pel tractament d'altres malalties i així, seria més fàcil arribar a assajos clínics amb els pacients. L'estratègia per dur a terme el HCS es basava en que en una línia cel·lular WT quan se li transdueix la proteïna YFP-FANCD2 i es tracta amb un agent que indueixi el dany en el DNA, es pot observar la presència de *foci* nuclear de la proteïna YFP-FANCD2 (figura 38A). En canvi, una línia FANCA^{-/-} amb l'expressió estable de YFP-FANCD2, en presència de dany, no té la ruta FA/BRCA funcional i no s'observa la presència de *foci* de YFP-FANCD2 (figura 38B). El que es volia aconseguir després de la realització del cribatge de compostos era identificar-ne algun que, en absència de l'expressió de la proteïna FANCA, reactivés la ruta FA/BRCA i recuperés la capacitat de formació de *foci* en presència de dany en el DNA (figura 38C).

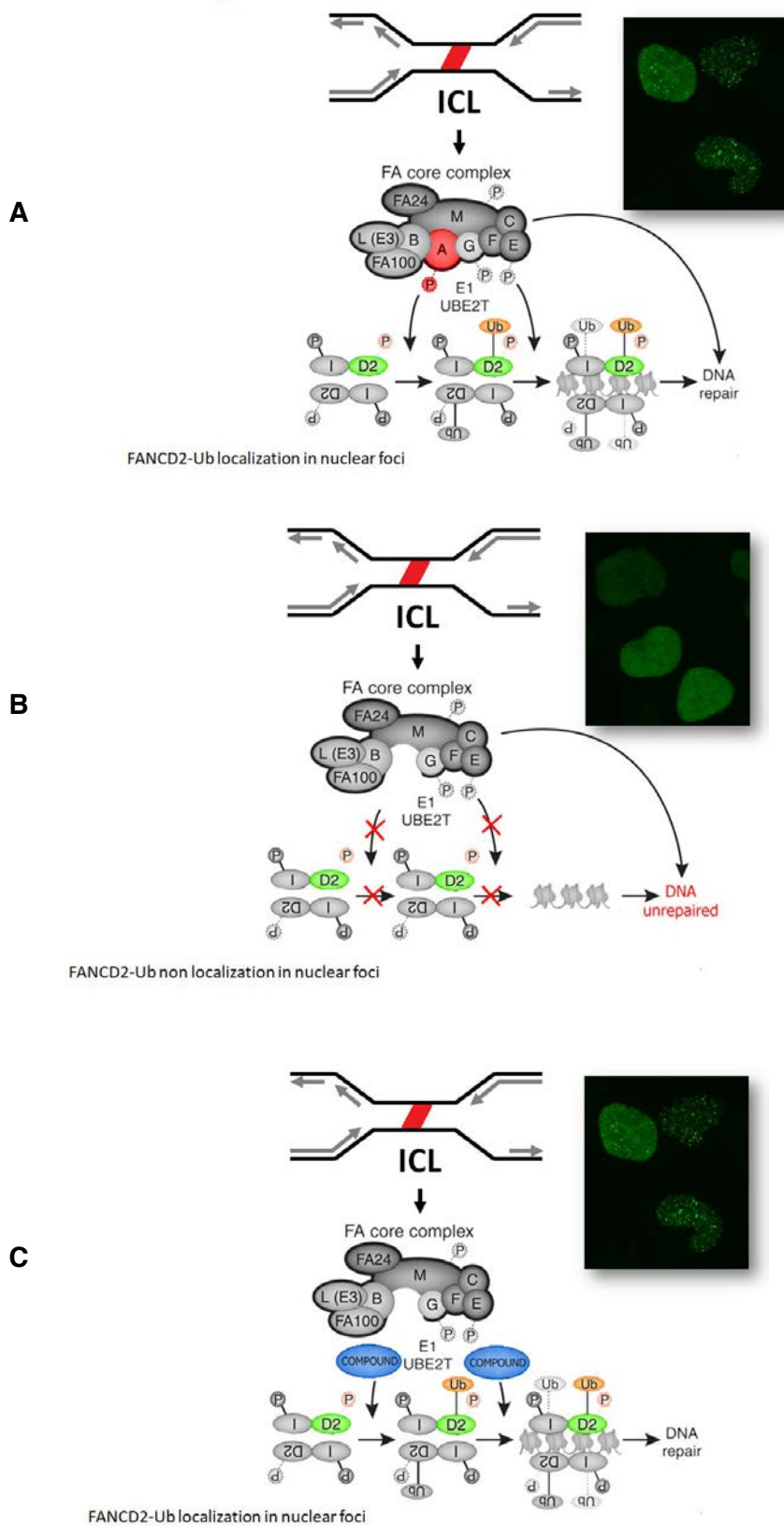


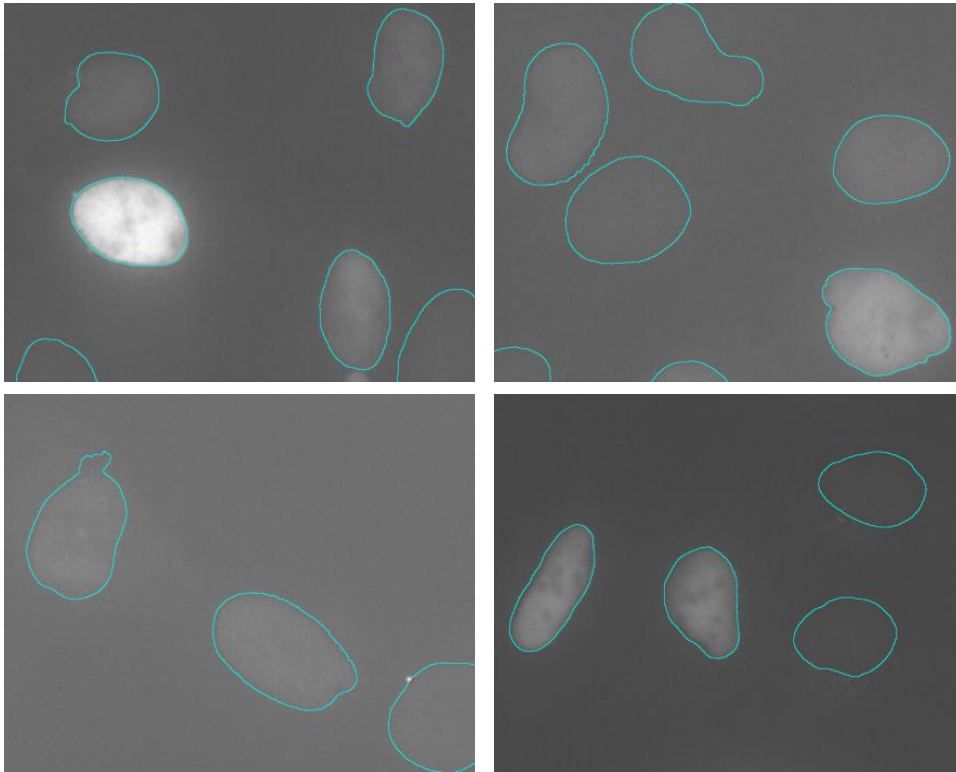
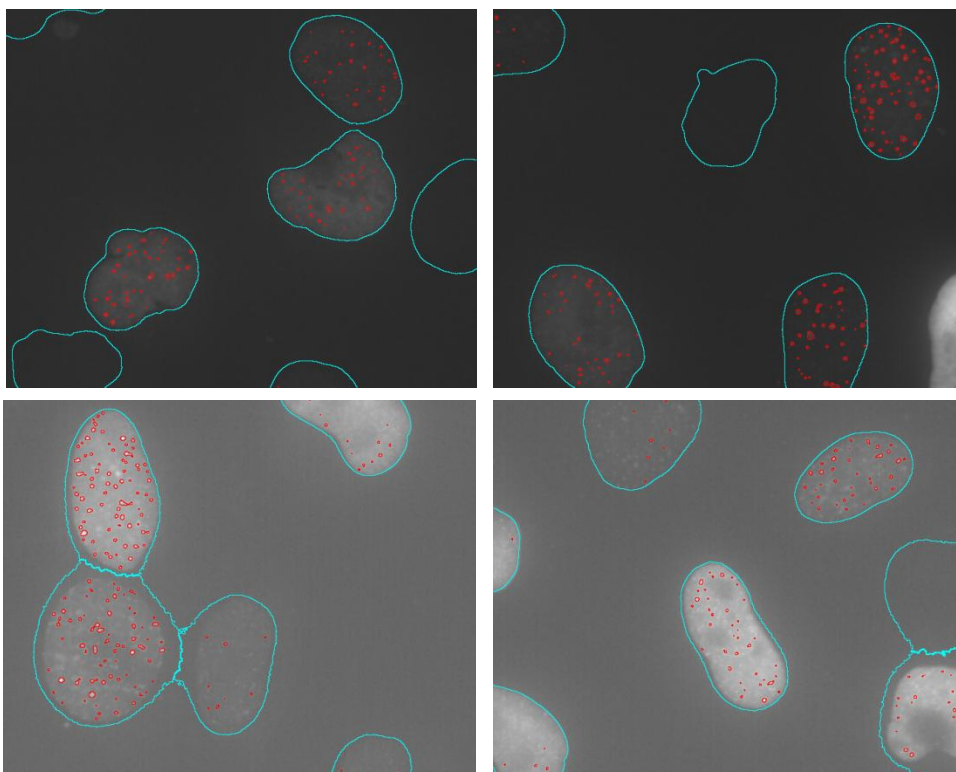
Figura 38. Sistema cel·lular utilitzat per la realització del HCS. A) Ruta FA/BRCA funcional en una línia cel·lular WT. B) Ruta FA/BRCA no funcional en una línia cel·lular Fanconi. C) Reactivació de la ruta FA/BRCA per un compost en una línia cel·lular Fanconi.

Per valorar la qualitat de l'assaig cel·lular es va determinar el factor Z' en un experiment pilot. La mitjana i desviació estàndard de nuclis amb 5 o més *foci* del control positiu va ser de $16,87 \pm 3,34$ i del control negatiu de $0,086 \pm 0,19$ i el factor Z' es va determinar en 0,4 (figura 39).

$$\text{Factor Z}' = 1 - \frac{3 \cdot 3,34 + 3 \cdot 0,19}{(16,87 - 0,086)} = 0,4$$

Figura 39. Càlcul del factor Z' a partir de les dades obtingudes en l'experiment pilot.

El programa de software dissenyat per l'anàlisi d'imatges dels pous tractats amb les biblioteques de compostos va identificar que les cèl·lules corregides utilitzades com a control positiu tenien 70 vegades més nuclis amb formació de 5 o més *foci* (25 %) respecte el control negatiu (0,3 %) (figures 40A i 40B). També, va identificar varis fàrmacs amb un elevat comptatge de nuclis amb *foci* (figura A9A de l'apartat d'annexos), no obstant, quan es van voler confirmar visualment, es va veure que tots ells eren nuclis on el fàrmac o bé era autofluorescent, o bé, havia precipitat, ja que en la dosi més alta del compost aquesta fluorescència s'intensificava (figura A9B de l'apartat d'annexos). Donat que no es van treure resultats conclusius de l'anàlisi automàtic amb el software, paral·lelament, dos membres del laboratori van observar les imatges descarregades una per una de manera manual, per veure si es detectaven nuclis amb *foci* que el programa no hagués tingut en compte. D'aquesta manera, es van localitzar 37 compostos amb presència d'algun nucli aparentment amb *foci* (figura 41). Els compostos identificats com a possibles candidats van ser l'ezetimiba, SB-SO5124, butalbital, glipzida, talidomida, clormezanona, benserazida, salmeterol, bacitracina, àcid quinurènic, PI 828, LY 320135, 5-Iodo-A-85382, JNJ 26854165, zatebradina, cidofovir, estradiol, roflumilast, cinchonida, palomid 529, procaïna hidroclorur, sulmazol, ibutilide fumarato, ifosfamida, dioxibenzona, tosilat de bretili, dimaprita, fenilbutazona, monastrol, SANT-1, AG555, DMNB, PNU 22394, Forskolina i PIK-93, Vemurafenib i el compost codificat com a N20 del laboratori del Thomas Helleday.

A**U2OS FANCA^{-/-}-YFP-FANCD2 (Control -)****U2OS FANCA^{corrected}-YFP-FANCD2 (Control +)**

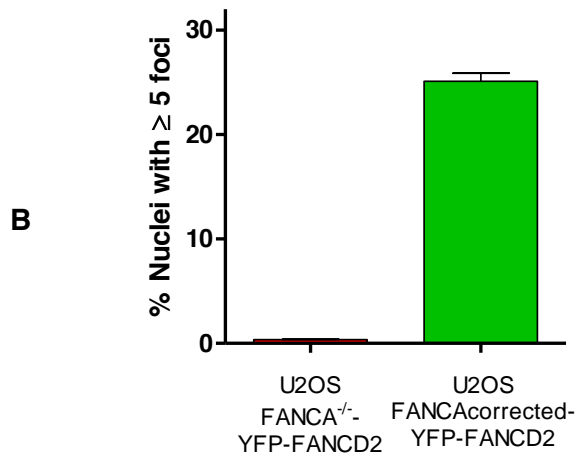


Figura 40. Detecció dels nuclis amb 5 o més *foci* per part del software d'anàlisi en el control positiu (línia U2OS FANCAcorrected-YFP-FANCD2) en comparació amb el control negatiu (línia U2OS FANCA^{-/-} YFP-FANCD2). A) Imatges analitzades pel programa de les cèl·lules control. B) Histograma amb la quantificació dels nuclis amb més de 5 *foci*. Les cèl·lules es van plaquejar en pous que contenien els compostos transferits i a les 24 hores es van tractar amb HU a una dosi de 2 mM. Al dia següent es van fixar amb PFA al 4 % i es van realitzar les imatges automàticament amb el microscopi ImageXpress acoblat al braç robòtic VALet. Els resultats s'expressen com el percentatge de nuclis amb 5 o més *foci* dividit entre els nuclis totals.

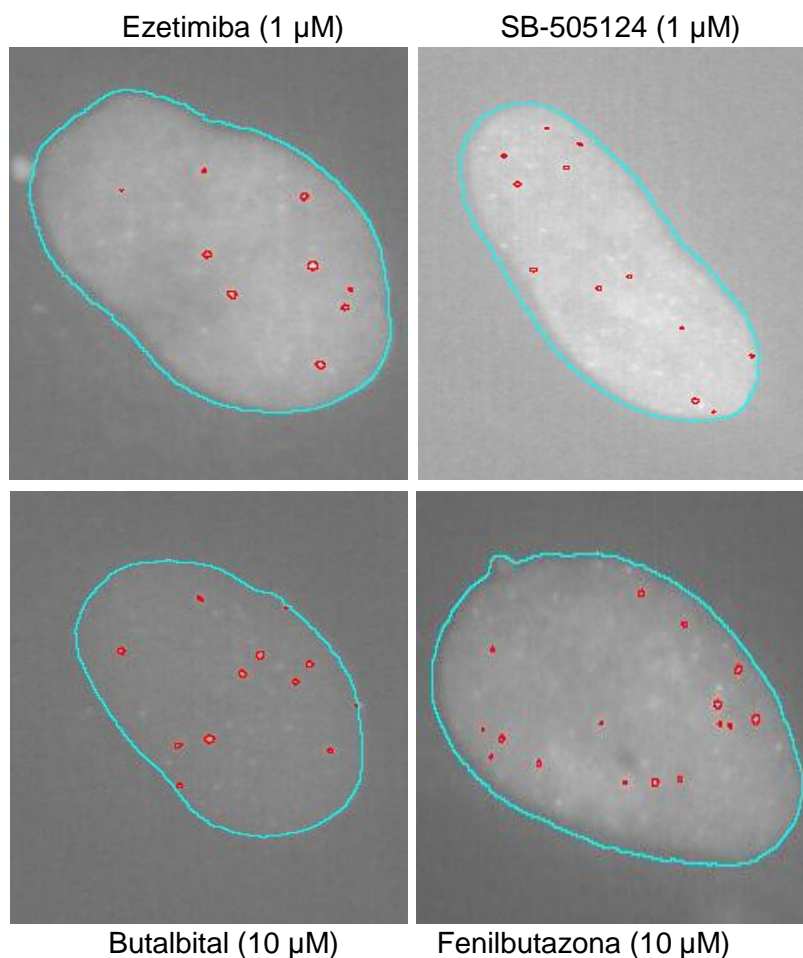


Figura 41. Exemples de fàrmacs seleccionats amb presència de nuclis amb 5 o més *foci*.

4.5.3. Validació dels fàrmacs candidats reactivadors de la ruta FA/BRCA

Es va procedir a una repetició del tractament dels 37 compostos candidats per validar els resultats i es va dur a terme a distància. Veient els problemes associats al primer cribatge on la detecció d'autofluorescència va resultar en falsos positius, es va decidir directament validar els compostos visualment observant les imatges una a una. Després que dos membres del laboratori comprovessin les imatges generades, es va decidir estudiar l'efecte dels fàrmacs roflumilast, 5-Iodo-A-85380, ezetimiba, forskolina, SANT-1 i AG555, ja que es van tornar a veure nuclis amb *foci* de YFP-FANCD2 en les imatges. També, es va revisar a la literatura el mecanisme d'acció de tots els compostos candidats i varis d'ells incrementaven, directa o indirectament, els nivells de la PKA i el cAMP. També vam voler incloure com a control positiu el 8-Bromo-cAMP, un activador de la PKA.

4.5.3.1. Anàlisi de la localització de FANCD2 al lloc del dany

Es va voler validar si els candidats reactivaven la formació de *foci* amb una tècnica més resolutiva, la immunofluorescència clàssica. La figura 42A mostra els nuclis sense presència de *foci* en la línia U2OS FANCA^{-/-} quan es va detectar l'expressió de FANCD2 amb l'ús d'un anticòs fluorescent després del tractament amb un dels fàrmacs candidats (5-Iodo-A-85380). La figura 42B mostra els comptatges de nuclis amb presència de 5 o més *foci* després del tractament amb els 7 compostos candidats i s'observa que cap d'ells va produir formació de *foci*. Per tant, es conclou que la presència de nuclis amb *foci* de la proteïna FANCD2 observats en el cribatge inicial eren falsos positius.

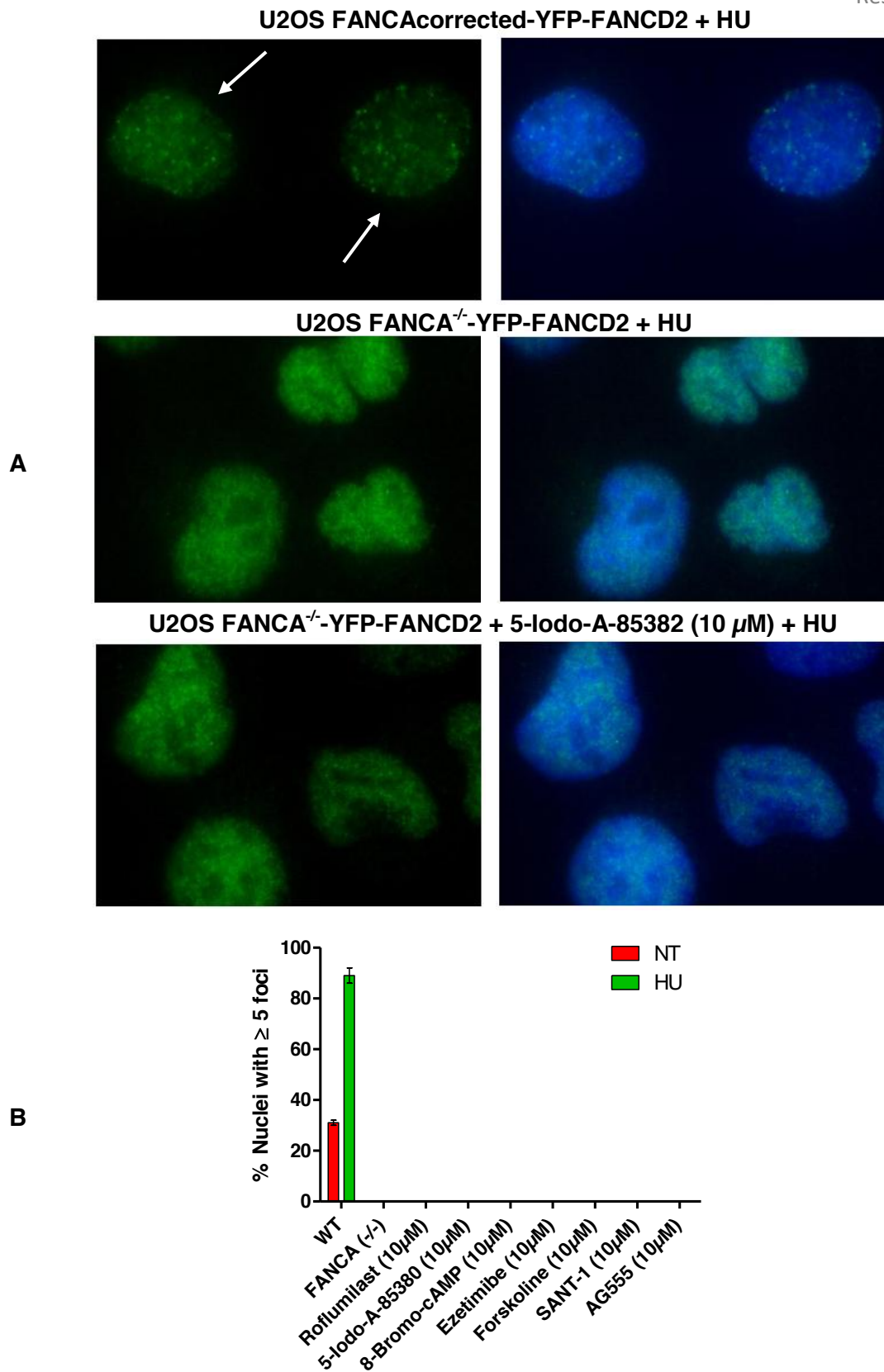


Figura 42. Anàlisi de la localització de FANCD2 al lloc del dany després del tractament amb els 7 fàrmacs candidats per assaig d'immunofluorescència amb l'ús d'un anticòs específic contra FANCD2. A) Imatges amb nuclis amb absència o presència de foci en els controls i el fàrmac 5-Iodo-A-85382. B) Histograma amb la quantificació dels nuclis amb més de 5 *foci*. Les cèl·lules es van tractar amb els fàrmacs 5-Iodo-A-85380, roflumilast, 8-Bromo-cAMP, SANT-1, ezetimibe, forskolin i AG 555 a dosis 10 μ M i es van exposar entre 4-6 hores més tard a la HU a una dosi de 2 mM durant 24 hores. Les fletxes blanques indiquen les cèl·lules amb *foci* i els resultats s'expressen com el percentatge de nuclis amb 5 o més *foci* dividit entre els nuclis totals i es va utilitzar com a control de formació de *foci* la línia WT.

4.5.3.2. Estudi de la monoubiquitinació de FANCD2

La monoubiquitinació de FANCD2 en resposta a les lesions del DNA durant la replicació és un pas clau per l'activació de la ruta FA/BRCA. Donat que la visualització dels *foci* en els experiments del criatge era poc clara i evident, es va voler comprovar per WB l'expressió de la proteïna FANCD2 monoubiquitinada com un pas previ essencial a la formació dels *foci* que hipotèticament s'havien validat. La figura 43 mostra WB d'un dels set fàrmacs seleccionats (els altres WB es troben a la figura A10 de l'apartat d'annexos) i no s'observa, en cap cas, la banda corresponent a FANCD2 monoubiquitinada en les cèl·lules FANCA^{-/-}, ja sigui sense induir el dany com quan es tracten amb l'agent inductor d'ICLs MMC.

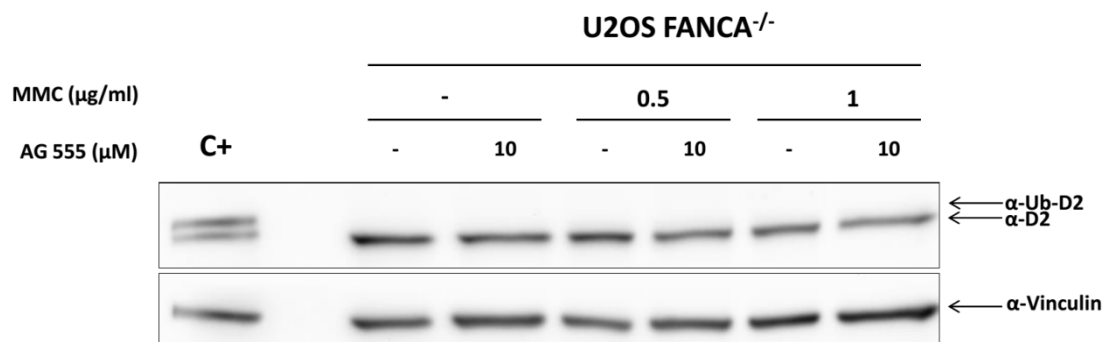
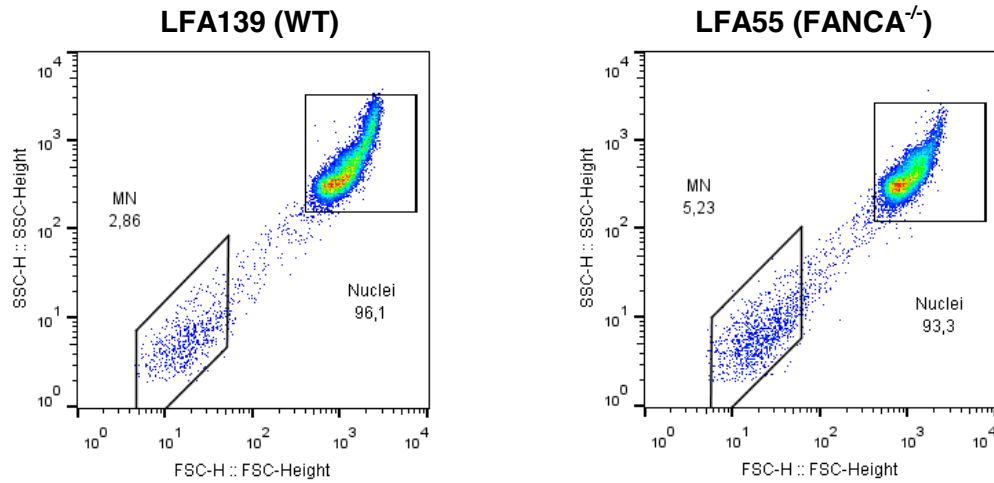
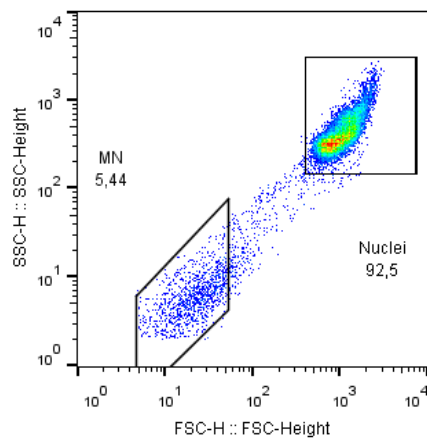
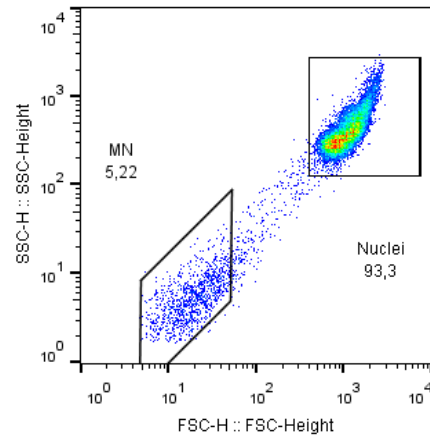


Figura 43. Anàlisi de l'expressió de FANCD2 monoubiquitinada després del tractament amb AG 555, un dels fàrmacs candidats per reactivar la ruta FA/BRCA. Les cèl·lules U2OS FANCA^{-/-} es van tractar amb els fàrmacs candidats a dosis de 1 i 10 µM, com també es van exposar a la MMC a dosis de 0,5, 1 i 2 µg/mL durant 24 hores. Les cèl·lules es van lissar i es va observar l'expressió de FANCD2 per WB, utilitzant la vinculina com a control de càrrega.

4.5.3.3. Valoració de la fragilitat cromosòmica i parada en G2/M

Per tal de comprovar la recuperació de la ruta FA/BRCA amb el tractament dels fàrmacs candidats, una conseqüència directa seria la millora de la fragilitat cromosòmica. Tot i que en els WB no s'observés la presència de FANCD2 monoubiquitinada, hi ha articles que parlen d'un paper alternatiu de FANCD2 no monoubiquitinat en resposta al dany induït per la HU (Chen et al., 2017) i és per això que es va voler acabar d'estudiar si la formació de *foci*, suposadament de la proteïna FANCD2 sense monoubiquitinar, era capaç de millorar la fragilitat cromosòmica. Es va estudiar la freqüència de MN després del tractament dels compostos amb i sense d'induir el dany amb el DEB en la línia limfoblastoid LFA55 (dades no mostrades). Les figures 44A i 44B mostren com cap d'aquests compostos seleccionats va ser capaç de reduir la freqüència de MN espontània associada a les cèl·lules Fanconi.

A

LFA55 (FANCA^{-/-}) + 8-Bromo-AMPC (1 μM)LFA55 (FANCA^{-/-}) + 8-Bromo-AMPC (10 μM)

B

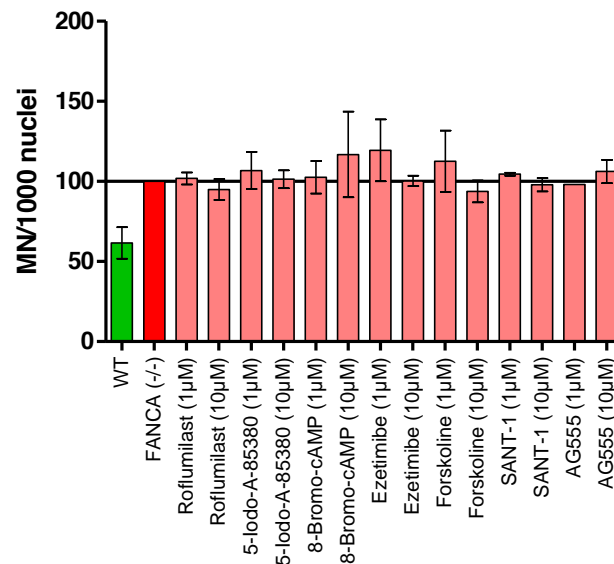


Figura 44. Fragilitat cromosòmica espontània dels fàrmacs candidats com a reactivadors de la ruta FA/BRCA. A) Finestres d'anàlisi de l'assaig de FCM de la línia LFA139 WT i LFA55 amb i sense tractament del compost. B) Histograma amb la quantificació dels MN després del tractament dels 7 compostos. La línia cel·lular limfoblastoid LFA55 es va tractar amb els fàrmacs candidats a concentracions 1 i 10 μM. Els resultats es presenten com la freqüència de MN cada 1.000 nuclis i es mostra la mitjana ± SEM d'almenys 3 experiments independents. El control es correspon a la mostra sense tractar i està normalitzat al 100 %. També, s'ha inclòs la línia WT per tenir com a referència la freqüència de MN en cèl·lules d'un pacient sa.

**PROJECTE 3. Cribatge de fàrmacs pel tractament
de tumors sòlids en l'anèmia de Fanconi**

4.6. HCS per inhibir el creixement de línies cel·lulars tumorals Fanconi

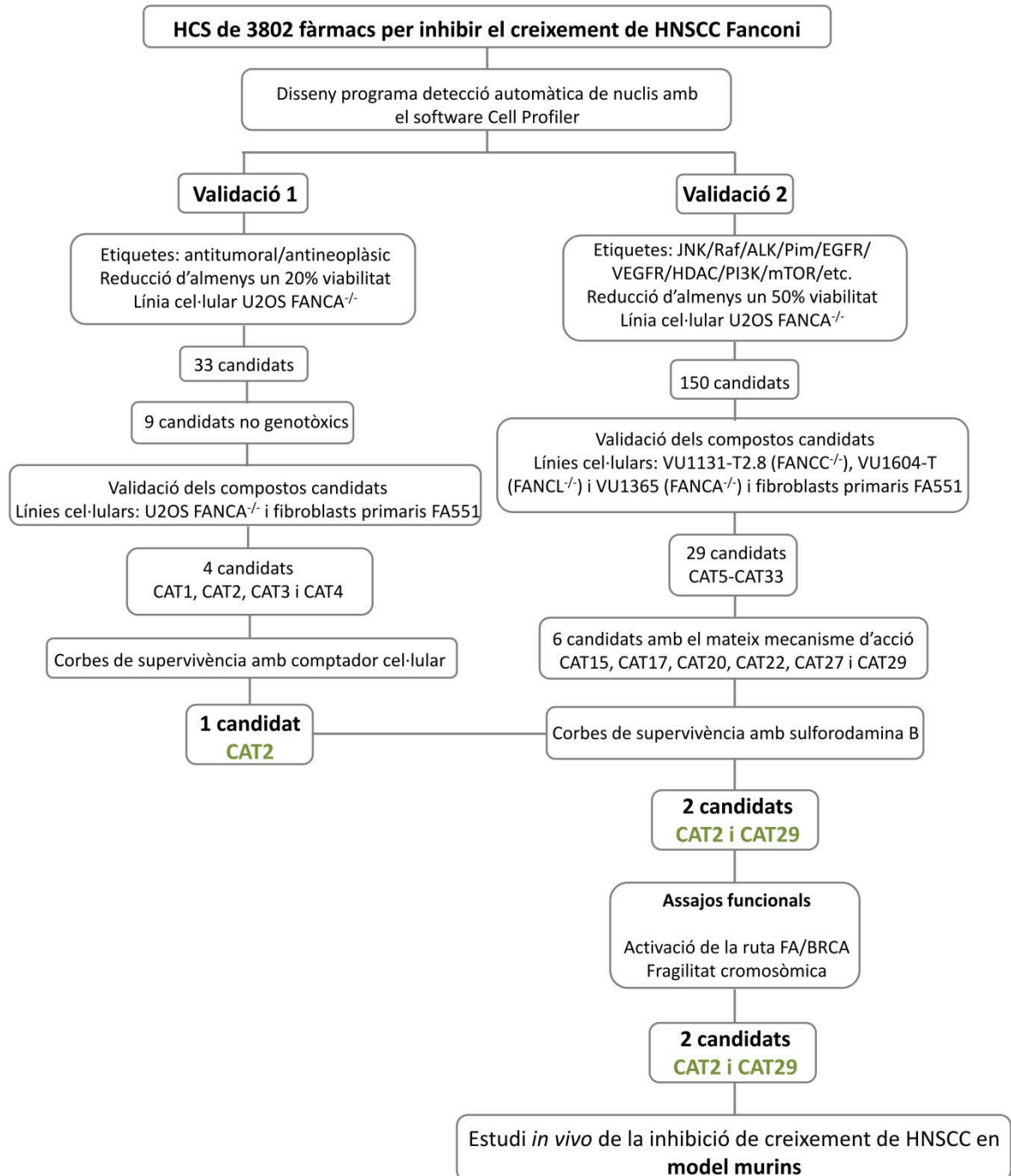


Figura 45. Esquema resum del projecte 3.

Aprofitant el cribatge realitzat per trobar fàrmacs reactivadors de la ruta FA/BRCA, es va filtrar la llista que contenia el nom i descripció de tots els compostos per seleccionar aquells que portaven l'etiqueta d'antitumorals i antineoplàsics. D'aquesta manera, tenint en compte els comptatges dels nuclis obtinguts en el primer cribatge de les cèl·lules tumorals U2OS FANCA^{-/-} després del tractament dels 3802 fàrmacs durant 48 hores i amb HU durant 24 hores, es van seleccionar tots aquells que reduïssin la viabilitat un 20 % en comparació amb el control sense tractar. Així doncs, es van obtenir 33 fàrmacs candidats tal i com es mostra a la figura A11 de l'apartat d'annexos, els quals es va revisar en la literatura el seu mecanisme d'acció i únicament 9 d'ells no induïen el dany en el DNA, senyalats en aquesta mateixa figura amb un asterisc.

4.6.1. Primera validació dels fàrmacs antitumorals candidats

Així doncs, es va realitzar una primera validació tractant els 9 fàrmacs en la línia de fibroblasts primaris FA551 i la línia ja utilitzada en el cribatge inicial U2OS FANCA^{-/-} per veure quins eren tòxics únicament en les línies tumorals. En aquesta validació ja no es va induir el dany amb la HU i els compostos es van tractar durant 7 dies. Després del tractament, es va fer el recompte dels nuclis per pou amb el software d'anàlisi i es van seleccionar els millors 4 fàrmacs, codificats com a CAT1, CAT2, CAT3 i CAT4, que produïen una toxicitat més severa en la línia tumoral d'osteosarcoma U2OS FANCA^{-/-} en comparació amb els fibroblasts primaris FA551, tant en la dosi de 1 µM com la de 10 µM (figura A12A de l'apartat d'annexos). També, es pot veure que l'agent inductor d'ICLs MMC, utilitzat com a control positiu de dany, és tòxica en les dues línies Fanconi utilitzades, ja sigui primària o tumoral (figura A12B de l'apartat d'annexos).

4.6.2. Segona validació dels fàrmacs antitumorals candidats

D'altra banda, també es va observar que altres compostos que no estaven etiquetats com a antineoplàsics i antitumorals, portaven associades les etiquetes de diferents dianes terapèutiques usades en terapia antitumoral, com EGFR, VEGFR, HDAC, mTOR i PI3K. Així doncs, es va voler estudiar el seu efecte en les línies de HNSCC VU1131-T2.8, VU1604-T i VU1365-T i els fibroblasts primaris FA551. La figura A13A de l'apartat d'annexos mostra el percentatge de supervivència obtingut a partir del recompte de nuclis de cada pou tractats amb els fàrmacs candidats com a antitumorals i la figura A13B de l'apartat d'annexos el tractament amb MMC, utilitzada com a control positiu. De tots ells, es van seleccionar els 29 millors fàrmacs que reduïen, almenys en una de les 3 línies HNSCC, més del 50 % de la supervivència, i alhora, no ho feien en la línia de fibroblasts primaris (figura 46). Tot i això, es van classificar els compostos,

els quals tenien un mecanisme d'acció conegut en la literatura, per tal de poder catalogar cada fàrmac en un grup comú i així, poder observar si hi havia algun grup de fàrmacs que compartien la mateixa diana. Així doncs, les dianes que es van trobar van ser MAO-A, FAK, EGFR, ALK, 5HT1B, D2R, PIM1, VEGFR2, SIRT1 i S1PR1. D'aquests, es van seleccionar 6 compostos, codificats com a CAT15, CAT17, CAT20, CAT22, CAT27 i CAT29, ja que estaven aprovats per la FDA per al tractaments de diversos tumors o estaven en fases clíniques.

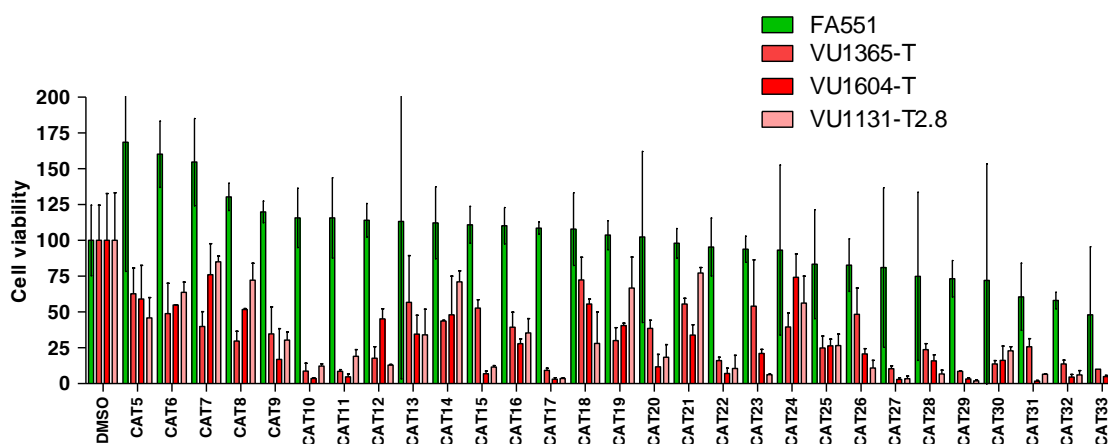


Figura 46. Fàrmacs aprovats per la FDA o en fase avançada d'assaigs clínics que van reduir, almenys, un 50 % del creixement d'alguna de les 3 línies cel·lulars de HNSCC però no els fibroblasts primaris. Les línies cel·lulars de HNSCC VU1131-T2.8, VU1604-T i VU1365-T i els fibroblasts primaris FA551 es van tractar durant 7 dies amb els compostos seleccionats a una dosi de 1 μ M. El control sense tractament de fàrmac està normalitzat al 100 % i els resultats es presenten com el percentatge de cèl·lules vives respecte les cèl·lules sense tractament. En el gràfic es mostra la mitjana \pm SD de dues rèpliques.

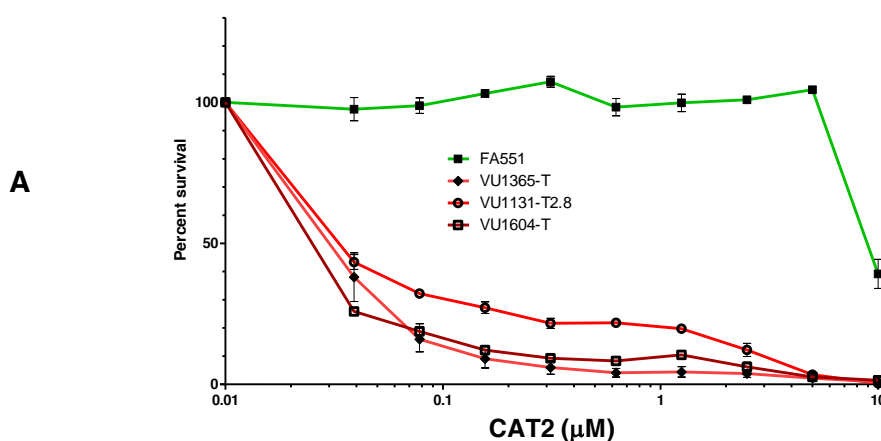
4.7. Estudi del fenotip cel·lular de fibroblasts primaris i línies de HNSCC tractats amb els candidats antitumorals

4.7.1. Assajos de supervivència cel·lular

Es va voler confirmar per assajos de supervivència la capacitat dels compostos seleccionats d'eliminar selectivament les cèl·lules tumorals Fanconi utilitzant diferents dosis del fàrmac, per tal de calcular la IC50 tant de les línies de HNSCC com dels fibroblasts primaris, de manera que poguéssim seleccionar més acuradament els millors compostos pel tractament dels tumors dels pacients. Es va valorar la resposta de les línies cel·lulars de HNSCC VU1131-T2.8, VU1604-T i VU1365-T, els fibroblasts primaris FA551 i la línia de fibroblasts primaris PN com a control sa, amb una corba de dosis de cadascun dels fàrmacs. Es van realitzar dues validacions diferents dels fàrmacs antitumorals, en la primera vam obtenir 4 compostos candidats (CAT1, CAT2, CAT3 i CAT4) i es van realitzar corbes de supervivència utilitzant el comptador

Beckman Coulter. En la segona validació es van obtenir 6 compostos candidats (CAT15, CAT17, CAT20, CAT22, CAT27 i CAT29) i es van realitzar corbes de supervivència amb l'assaig de sulfurodamina B.

En la figura A14J de l'apartat d'annexos es mostra l'efecte de l'agent inductor d'ICLs MMC utilitzat com a control positiu, i es pot observar que la línia de fibroblasts primaris FA551 va ser molt sensible a baixes dosis d'aquest compost en comparació amb els fibroblasts primaris PN, de la mateixa manera que les 3 línies de HNSCC Fanconi VU1131-T2.8, VU1604-T i VU1365-T i WT VU040-T també van ser molt sensibles a aquest fàrmac. Els resultats obtinguts mostren que dels 4 primers compostos que es van validar CAT1, CAT2, CAT3 i CAT4 (figures A14A, A14B, A14C i A14D, de l'apartat d'annexos), el CAT2 va ser el que a baixes dosis mostrava una toxicitat més elevada en la línia HNSCC VU1131-T2.8. Aquest compost, per tant, es va incloure en la validació de la resta de compostos per assaig de sulfurodamina. En aquest cas, va ser també el compost CAT2 (figura 47A) el fàrmac que va mostrar una ràtio d'IC₅₀ de la línia no tumoral respecte les línies tumorals més elevada, de 1572 vegades més tòxic, seguit del CAT29 (figura 47B) i el CAT22 (figura A14H de l'apartat d'annexos), amb una ràtio de 340 i 330, respectivament. Per sota d'aquesta ràtio es troben el CAT27 (figura A14I de l'apartat d'annexos) i el CAT17 (figura A14F de l'apartat d'annexos), amb uns valors de 13,5 i 11. En canvi, els compostos CAT20 (figura A14G de l'apartat d'annexos) i CAT15 (figura A14E de l'apartat d'annexos) van tenir una toxicitat bastant similar en les línies primàries respecte els HNSCC, obtenint una ràtio d'IC₅₀ de 3 i 1, respectivament. A més, les línies cel·lulars no van mostrar una sensibilitat fins a altes dosis del compost, el que faria poc efectiu el seu ús. Tots els valors d'IC₅₀ i les ràtios calculades es mostren a la figura 47C i es pot comprovar que la ràtio més baixa correspon al control positiu de dany al DNA MMC, de 0,2.



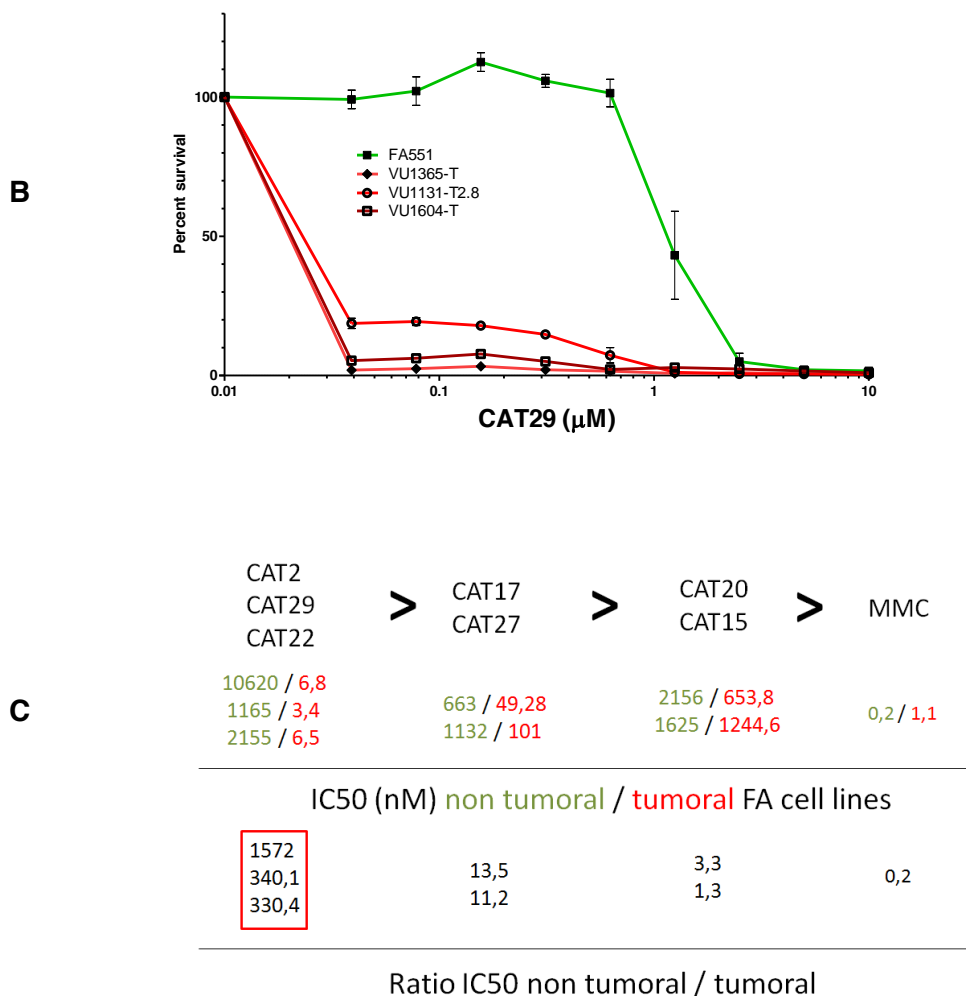


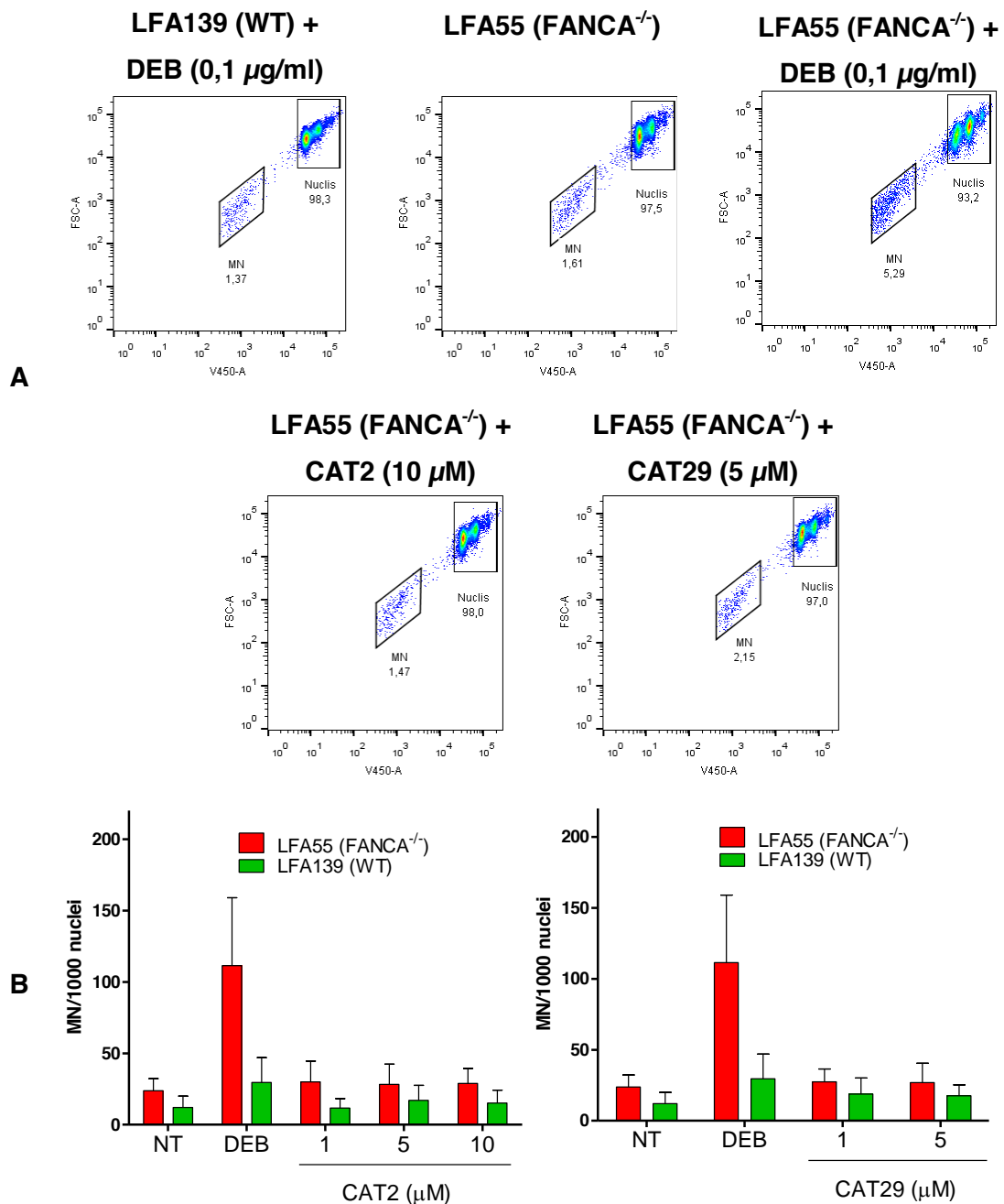
Figura 47. Efecte dels compostos antitumorals CAT2 i CAT29 en la supervivència de les línies de fibroblasts primaris i els HNSCC Fanconi. Les línies de HNSCC VU1131-T2.8, VU1604-T i VU1365-T i els fibroblasts primaris FA551 es van tractar durant 7 dies amb els compostos CAT2 (A) i CAT29 (B) amb una corba de dosi entre 0,03 i 10 µM. La ràtio d'IC50 de la línia no tumoral FA551 respecte la mitjana de les 3 línies tumorals es va calcular amb el programa GraphPad (C). El control sense tractament de fàrmac està normalitzat al 100 % i els resultats es presenten com el percentatge de cèl·lules vives respecte les cèl·lules sense tractament. En el gràfic es mostra la mitjana ± SEM d'almenys 3 experiments independents.

4.7.2. Ubiquitinació de FANCD2

Es van seleccionar els compostos CAT2 i CAT29 com a millors candidats per tractar els HNSCC Fanconi, per l'alta sensibilitat que van patir les línies tumorals a baixes dosis dels fàrmacs en els assajos de supervivència i per la baixa toxicitat per part dels fibroblasts primaris. Com que no hi ha res descrit en l'ús d'aquests compostos pel tractament de tumors Fanconi, vam voler veure si aquests compostos produïen dany en el DNA i, com a conseqüència, activaven la ruta FA/BRCA, el que no els faria recomanables pel tractament dels pacients. Com que les cèl·lules Fanconi no tenen la ruta FA/BRCA funcional, es va utilitzar la línia U2OS WT per veure si el tractament dels fàrmacs activava la monoubiquitinació de la proteïna FANCD2 per WB. La figura

4.7.3. Fragilitat cromosòmica i parada en G2/M

D'altra banda, tot i observar que el tractament amb aquests fàrmacs no activava la ruta, també es va voler comprovar si el tractament dels fàrmacs seleccionats en la línia limfoblastoid LFA55 elevava la freqüència de MN i el bloqueig de les cèl·lules en fase G2/M, conseqüència directa de la falta de reparació de la ruta FA/BRCA quan aquesta és activada. En la figura 49 es pot observar com la fragilitat cromosòmica (49A i 49B) i la parada de les cèl·lules en fase G2/M (49C i 49D) no es veuen incrementats, a diferència del tractament amb l'agent inductor d'ICLs, DEB, utilitzat com a control positiu, indicant que els fàrmacs candidats antitumorals no causen cap tipus de dany que requereixi la ruta FA/BRCA per la seva reparació.



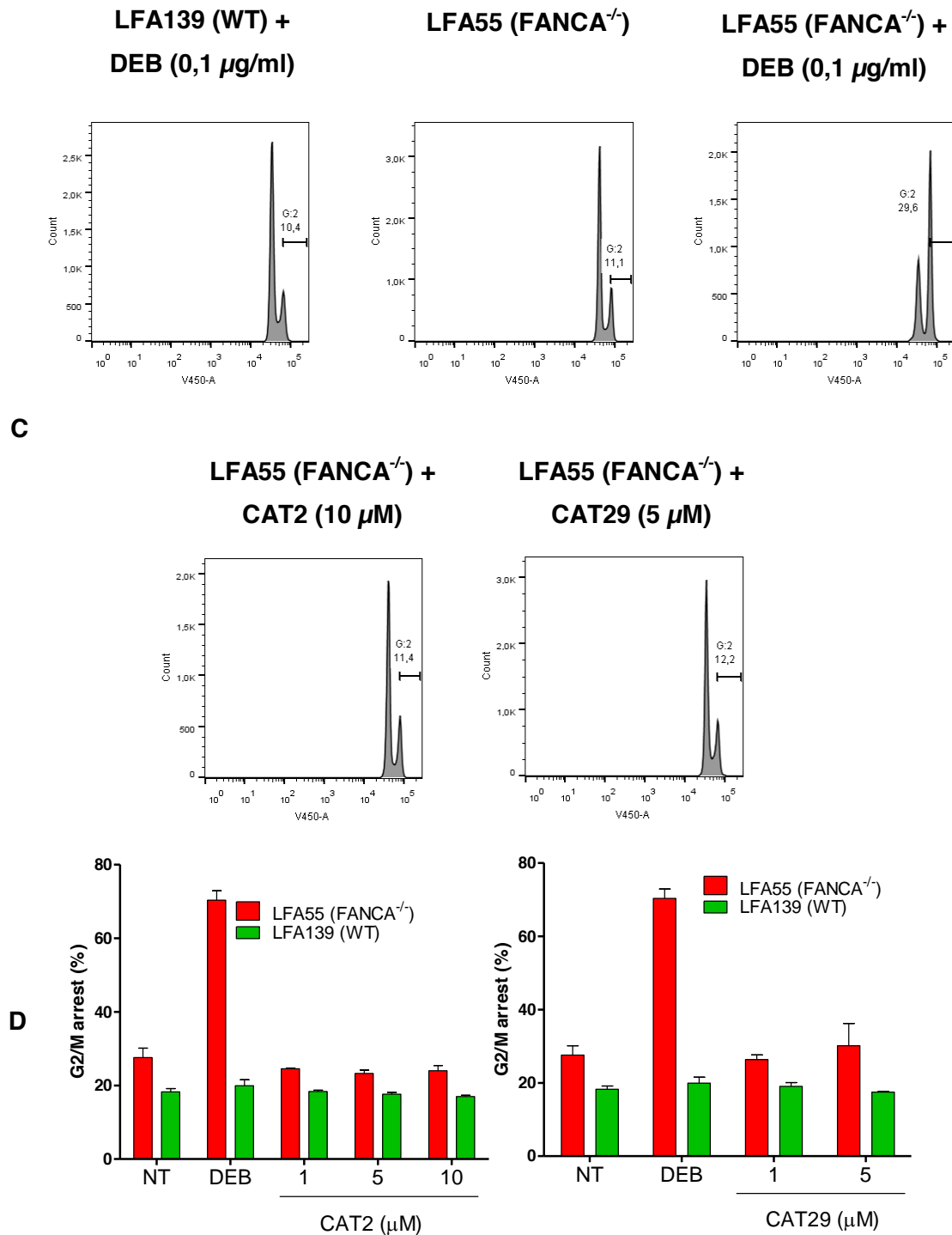
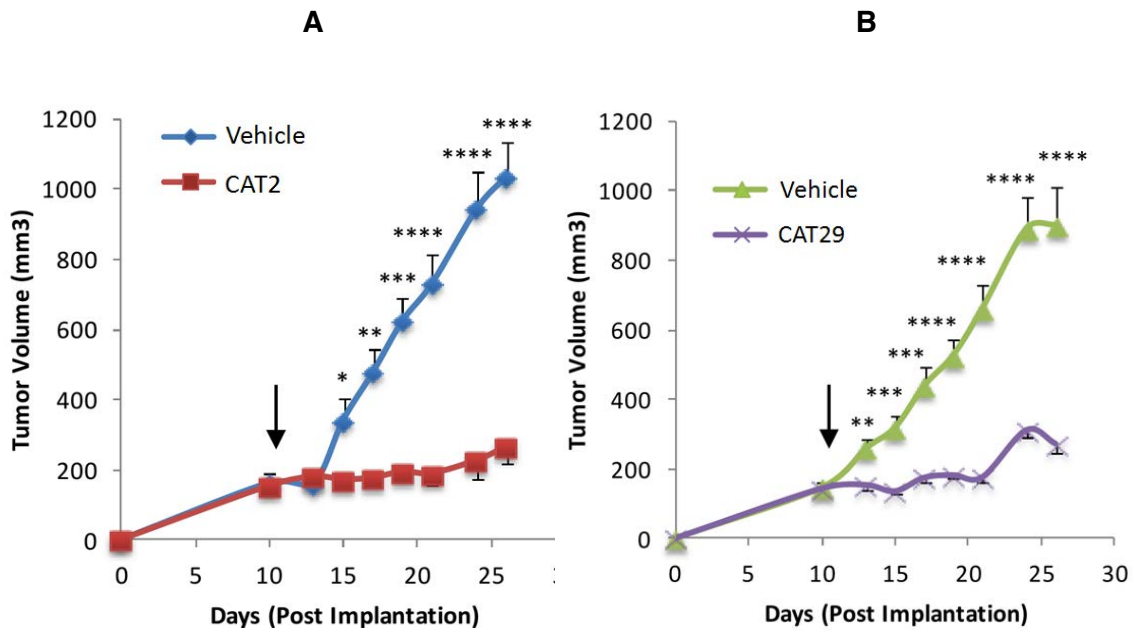


Figura 49. Fragilitat cromosòmica i bloqueig en fase G2/M d'una línia cel·lular Fanconi després del tractament amb els fàrmacs antitumorals CAT2 i CAT29. A i C) Finestres d'anàlisi per citometria de flux. B i D) Histogrames amb la quantificació dels MN i parada en G2/M després del tractament dels 2 compostos. Les cèl·lules es van tractar amb els fàrmacs CAT2 i CAT29 a dosis 1, 5 i 10 µM durant 24 hores i es va utilitzar com a control de dany el DEB a 0,1 µg/mL. Els resultats es presenten amb la freqüència de MN cada 1.000 nuclis o el percentatge de cèl·lules en fase G2/M del cicle cel·lular. En el gràfic es mostra la mitjana ± SEM d'almenys 2 experiments independents.

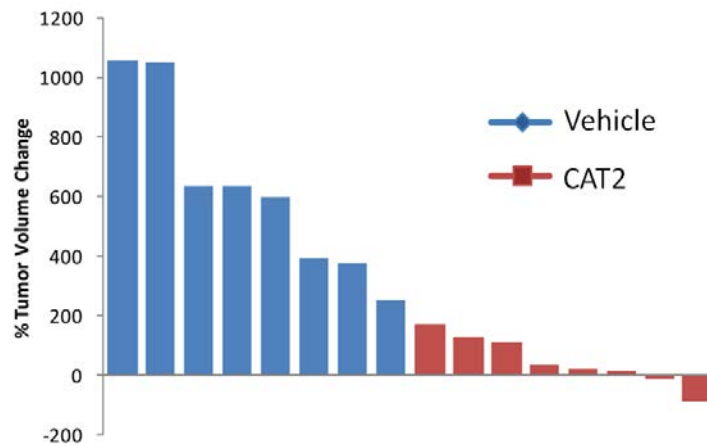
4.8. Estudi *in vivo* dels fàrmacs CAT2 i CAT29 en el creixement de HNSCCs en models murins

Es va implantar de manera subcutània la línia cel·lular de HNSCC VU1131-T2.8 (FANCC) en el llom de ratolins immunodeprimits, per tal de veure l'efecte del compost en un organisme viu. Com que la mitjana de vida d'un ratolí és més curta que la d'un humà, el tumor evoluciona més ràpidament i aquest fet ajuda a determinar i predir què podria passar al pacient si s'administrés el fàrmac. Així doncs, els tumors van assolir un volum d'aproximadament 150 mm³ després de 10 dies d'haver-los implantat i és llavors quan es van administrar oralment de manera forçada els fàrmacs CAT2 i CAT29 o els seu corresponents vehicles. Els ratolins control, els quals se'ls administrava el vehicle, van tenir una taxa de creixement del tumor molt elevada, i va ser als 25 dies després de la implantació del tumor i 15 dies després de l'administració del tractament, que el tumor va assolir un volum al voltant de 1.000 mm³. En canvi, en els ratolins tractats amb els fàrmacs CAT2 i CAT29 després d'aquest temps, els tumors van assolir un volum d'aproximadament 200 i 250 mm³, respectivament (figures 50A i 50B), amb diferències molt significatives respecte els seus vehicles. També, es mostra el percentatge del canvi del volum de cadascun dels tumors individualment des del començament del tractament fins el final de l'estudi (figures 50C i 50D) i s'observa com tots els tumors estan molt per sota del volum dels controls i fins i tot, dos dels tumors tractats amb el CAT2 regressionen. De la mateixa manera, la mitjana del pes dels tumors al finalitzar l'experiment també va ser molt diferent entre tractaments i controls, sent de 0,2 grams aproximadament en els ratolins tractats amb els compostos CAT2 (figura 50E) i CAT29 (figura 50F) i de 0,8 i 0,6 grams en els seus corresponents vehicles. Les figures 50G i 50I mostren els ratolins eutanasiats just abans de realitzar la cirurgia dels tumors, i les figures 50H i 50J els tumors resseccionats de cadascun dels grups d'estudi. Es pot veure visualment que les mides dels tumors són més grans en els ratolins sense rebre el tractament dels compostos antitumorals respecte els controls. No obstant, sembla que el tractament amb aquests fàrmacs no és totalment innocu, ja que durant la monitorització dels animals també es va controlar el pes de tots ells, i tot i que les mitges de tots els ratolins durant els diferents dies que va durar l'estudi no mostren diferències significatives (figures 50K i 50L), quan es va normalitzar a 0 el valor inicial i es mostra el percentatge de guany de pes respecte el començament del tractament, sí que hi ha diferències significatives a partir del dia 20 des de la implantació del tumor en ambdós compostos, sent més visibles en el CAT2 (figures 50M i 50N). No obstant, en cap cas, la diferència de pes va superar el 20 %, i per tant, no va ser necessari parar l'estudi. En la imatge dels

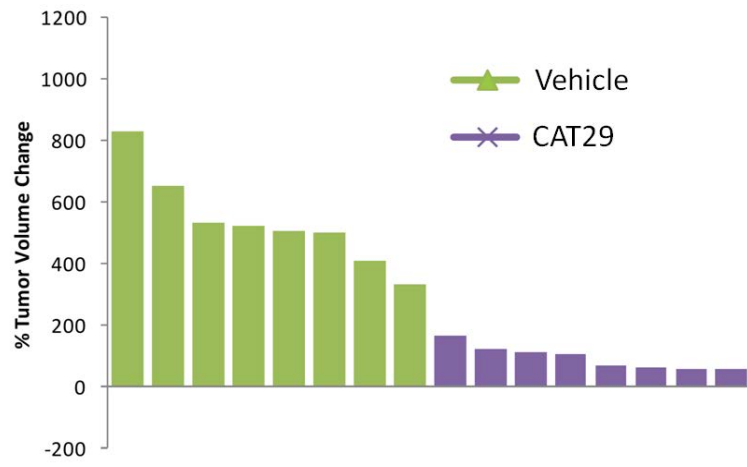
ratolins (figures 50G i 50I) s'observa com els ratolins tractats amb CAT2 visualment estan molt més afectats en quan al pelatge i les mucoses dels ulls, respecte els tractats amb CAT29, i per tant, els efectes secundaris associats a aquest segon fàrmac semblen ser molt més favorables.



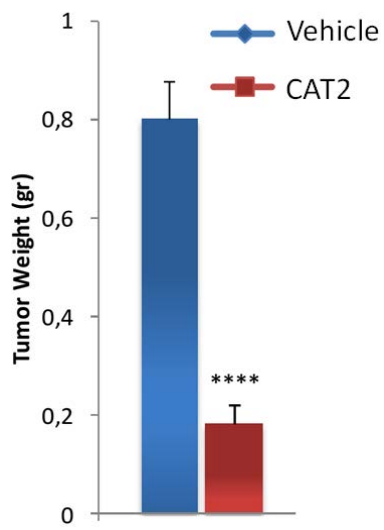
C



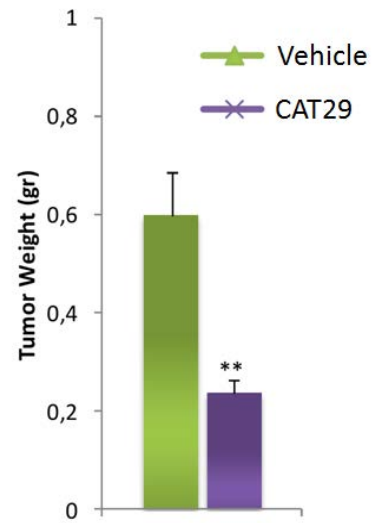
D



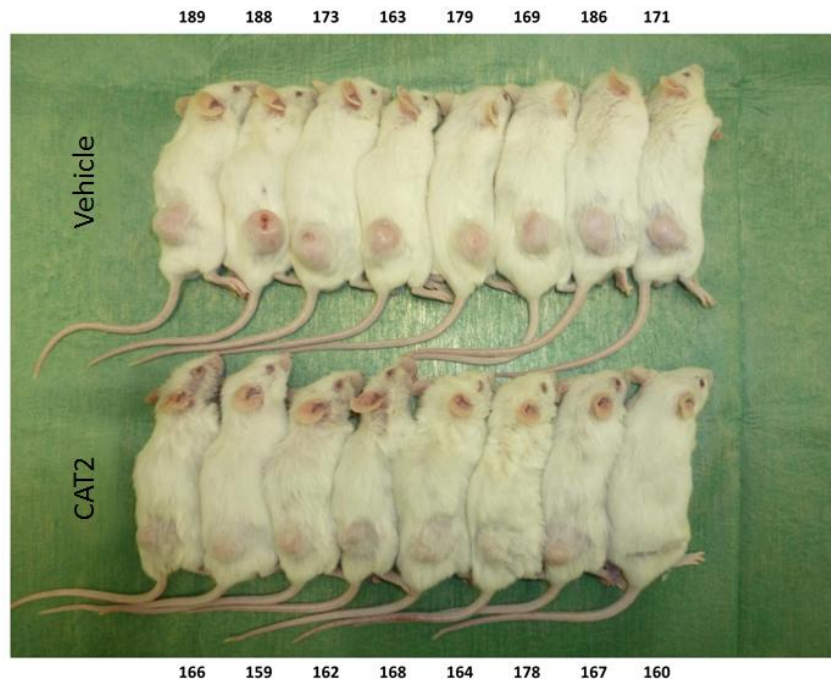
E



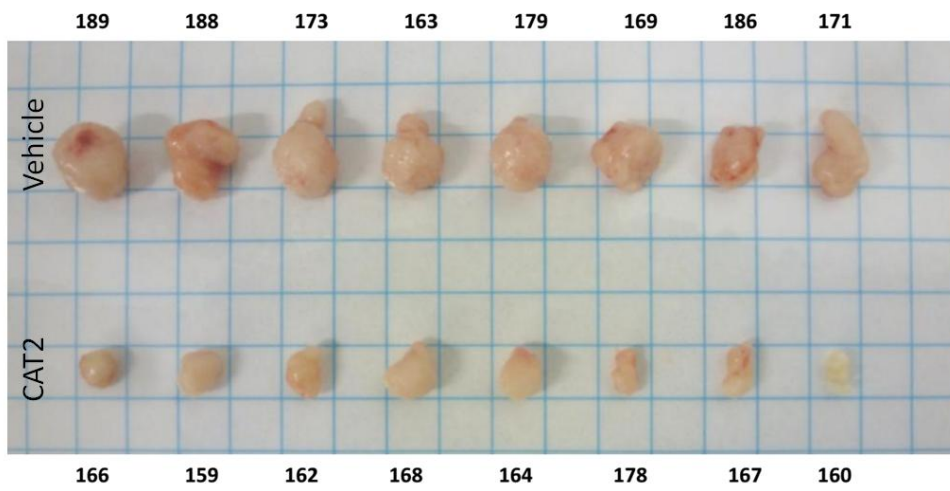
F



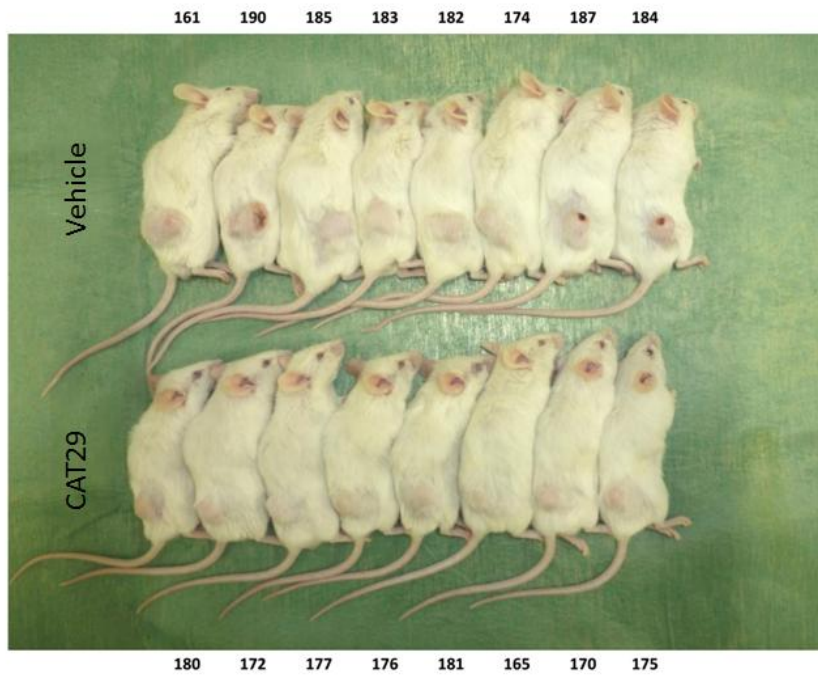
G



H



I



J



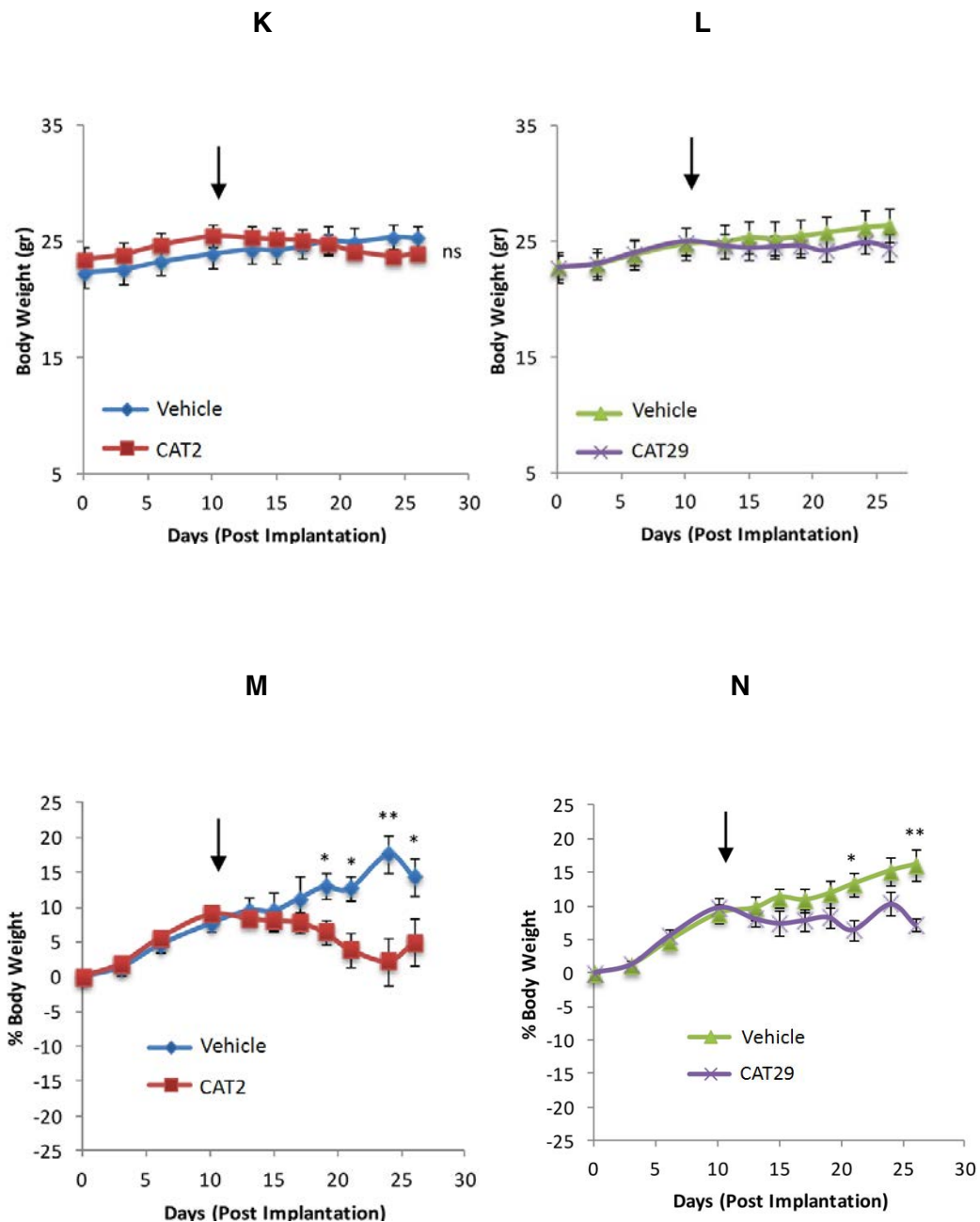


Figura 50. Els fàrmacs CAT2 i CAT29 inhibeixen el creixement tumoral de HNSCC implantats de manera subcutània en el llom de ratolins immunodeprimits. A i B) Volums dels tumors dels ratolins tractats amb els fàrmacs CAT2 i CAT29 i amb els seus corresponents vehicles. C i D) Percentatge del canvi del volum de cadascun dels tumors individualment des del començament del tractament fins el final de l'estudi. E i F) Mitjana del pes dels tumors dels ratolins tractats amb els compostos CAT2 i CAT29 al finalitzar l'experiment. G i I) Ratolins sacrificats al finalitzar l'experiment després del tractament amb CAT2 i CAT29. H i J) Tumors resseccionats dels ratolins tractats amb CAT2 i CAT29 després del sacrifici. K i L) Mitjana del pes dels ratolins tractats amb CAT2 i amb CAT29 durant els diferents dies que va durar l'estudi. M i N) Percentatge de guany de pes respecte l'inici del tractament dels ratolins tractats amb CAT2 i CAT29.

Discussió

5. Discussió

L'Anèmia de Fanconi és una malaltia genètica rara caracteritzada per múltiples anomalies físiques, fallada hematològica i un risc elevat a patir càncer. L'única teràpia eficient actual dels pacients Fanconi que pateixen una fallada de moll de l'os és el trasplantament de precursors hematopoètics, sempre i quan no aparegui una toxicitat al tractament, un rebuig o la malaltia de l'empelt contra l'hoste, ja que estan associats a una alta taxa de mortalitat. Les cèl·lules Fanconi són molt sensibles als agents inductors d'ICLs i cal anar molt en compte amb la teràpia que s'administra pel trasplantament, ja que tenen una sensibilitat incrementada a l'exposició de la ciclofosfamida o a la irradiació, els quals s'administren en altes dosis en pacients no afectats per aquesta malaltia per tal d'evitar el rebuig i altres complicacions de caràcter immunològic. En els últims anys, s'han millorat els protocols de trasplantament en els pacients Fanconi administrant l'acondicionament amb fludarabina i la depleció de les cèl·lules T en els empelts. No obstant, hi ha pacients que no disposen de donants compatibles. Alguns acudeixen al diagnòstic genètic preimplantacional per tal de seleccionar un embrió no afectat amb HLA idèntic de manera que, al néixer, faci de donant utilitzant la sang del cordó umbilical com una font alternativa de cèl·lules mare hematopoètiques. Tot i això, la tècnica és molt costosa i els resultats no tenen molta taxa d'èxit (Trujillo and Surralles, 2015). La gran majoria no poden acudir a aquesta opció terapèutica i una teràpia alternativa que es pot administrar són els andrògens i els factors de creixement hematopoètics per tal de retardar la depleció de les cèl·lules mare hematopoètiques. Es tracta d'un tractament que també té efectes secundaris associats i no és del tot efectiu. Els andrògens són hormones masculines que estimulen la producció d'eritròcits, plaquetes i limfòcits de la sang i l'androgen més comunament utilitzat és l'oximetolona. Cal tenir en compte que els pacients responen bé als andrògens només si el tractament es comença a una edat primerenca i aquests, no tenen una cura permanent, sinó que prolonguen la vida dels pacients. Entre els efectes secundaris associats a aquesta teràpia es troba la masculinització, l'acne, el creixement accelerat, un tancament prematur de l'epífisis i l'aparició de tumors hepàtics (Mulvihill *et al.*, 1975, Moldvay *et al.*, 1991, Touraine *et al.*, 1993, Ozenne *et al.*, 2008). D'altra banda, l'administració de factors de creixement hematopoètics fa que s'uneixen a receptors específics expressats en la superfície de les cèl·lules mare i dels progenitors hematopoètics, i que s'estimuli el seu creixement, de la mateixa manera que també activen algunes cèl·lules diferenciades. Alguns d'aquests factors són la IL-3 recombinant i el G-CSF, i s'ha vist que aquesta teràpia millora els comptatges de

neutròfils en molts pacients que ja pateixen una pancitopènia, tot i que els comptatges d'hemoglobina i plaquetes no es veuen millorats (Rackoff *et al.*, 1996).

És per això que encara cal dedicar molts esforços en la recerca per tal de trobar una teràpia eficient pels pacients, que tot i que el problema hematològic es pugui solucionar trobant un donant compatible hi ha moltes esperances en l'assaig clínic de teràpia gènica on es corregeixen les pròpies cèl·lules mare hematopoètiques amb un vector lentiviral que conté el cDNA del gen *FANCA*, per tal de realitzar un trasplantament del propi pacient, de manera que es puguin evitar els efectes secundaris associats al trasplantament heteròleg, com la toxicitat pulmonar i renal, els problemes immunològics, el desenvolupament de càncers secundaris i les endocrinopaties. La comunitat científica confia molt en l'èxit d'aquest assaig clínic que ja s'està provant en els primers pacients, ja que s'espera que les cèl·lules somàtiques que es corregeixen tinguin un avantatge de creixement selectiu i que col·lonitzin el moll de l'os de la mateixa manera que succeeix en els pacients Fanconi mosaics.

No obstant, encara queden molts problemes associats a la malaltia que encara no es coneix com abordar. L'absència de la ruta FA/BRCA funcional afecta a la reparació dels ICLs en el DNA el que acaba causant mutacions i l'aparició del càncer (Du *et al.*, 2008, Muller and Williams, 2009), com també s'ha observat que les cèl·lules Fanconi són sensibles al dany oxidatiu i els aldehids, el que afecta a la viabilitat i proliferació de les cèl·lules mare hematopoètiques (Du *et al.*, 2014). És per això que en aquest estudi es va voler realitzar un cribatge de compostos antioxidants i antiinflamatoris per reduir el dany oxidatiu en el DNA i prevenir o retardar l'aparició dels tumors, com també realitzar un cribatge a gran escala amb compostos de diferent diversitat química per tal d'aconseguir que el seu tractament provoqui modificacions bioquímiques que reactivin la ruta FA/BRCA des d'una perspectiva molecular. D'altra banda, es va voler trobar un fàrmac per inhibir o retardar el creixement tumoral donada l'escassetat d'opcions terapèutiques dels pacients un cop són diagnosticats de tumors sòlids, amb una alta freqüència de HNSCC.

El desenvolupament de teràpies específiques i el descobriment de nous fàrmacs en les malalties rares té poc interès per la indústria farmacèutica pel temps i diners que suposa i la poca probabilitat d'èxit. No obstant, la recerca ha crescut molt en les dues últimes dècades (figura 51A) com també els nous fàrmacs aprovats (figura 51B). El Consorci Internacional de la Recerca en Malalties Rares (*International Rare Diseases Research Consortium*, IRDiRC) és una iniciativa promoguda pel Consell de la Unió Europea (*European Union*, EU) i pels EEUU, i es va marcar l'objectiu d'aconseguir per

l'any 2020 el desenvolupament de 200 noves estratègies terapèutiques per les malalties rares, com també innovacions en el diagnòstic i una base de dades global en base als registres estatals. L'objectiu de les 200 noves teràpies disponibles ja s'ha aconseguit aquest any i entre els nous objectius fins l'any 2027 s'inclou que s'aprovin 1000 noves teràpies que s'enfoquin en malalties rares sense opcions terapèutiques aprovades. Per tant, aquest estudi està contribuint als objectius establerts per l'IRDiRC.

Els avenços en el diagnòstic de les malalties i la farmacogenòmica han permès una millora en la seva caracterització, sobretot en les de tipus monogènic. Tot i això, és tot un repte desenvolupar tractaments efectius per aquestes malalties ja que hi ha moltes mutacions que poden afectar a un únic gen i que resultin amb un fenotip similar, el que podria fer que el fàrmac tingués diferents graus d'eficàcia (Sun *et al.*, 2017).

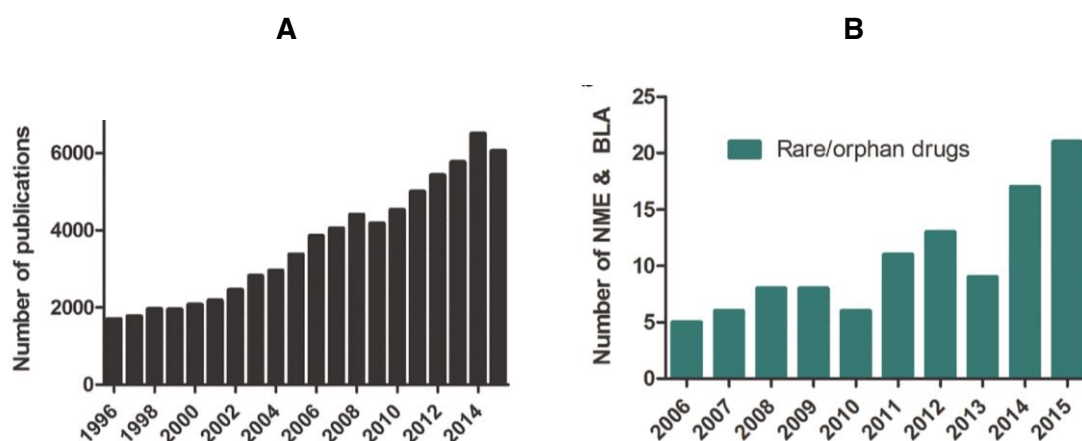


Figura 51. Publicacions de malalties rares des de 1996 a 2015 (A). Noves entitats moleculars (*new molecular entities*, NMEs) i llicències per productes biològics (*biologics license applications*, BLAs) aprovats per la FDA (B) (Sun *et al.*, 2017).

El procés de desenvolupament de nous fàrmacs per les malalties rares és similar al de les malalties comuns, i dura entre 10 i 15 anys. Aquest procés inclou la seqüenciació del genoma i l'exoma per tal d'identificar una proteïna o enzim diana que causin la malaltia per tal de desenvolupar un assaig específic i realitzar un cribatge de biblioteques de petites molècules per determinar l'activitat terapèutica dels fàrmacs candidats. Aquests assajos poden ser bioquímics, per tal de mesurar l'activitat dels enzims o interaccions entre proteïnes o entre proteïnes i DNA, o bé, també es poden utilitzar línies cel·lulars modificades per enginyeria genètica per tal de realitzar assajos fenotípics i trobar compostos que millorin el fenotip de la malaltia sense conèixer exactament la diana específica del fàrmac. Després, es realitza la validació i l'optimització d'aquests compostos, el desenvolupament preclínic on s'estudien els candidats en models animals per tal de comprovar l'eficàcia i la toxicologia abans de

passar a assajos clínics i s'aproven per part de l'Agència Europea del Medicament (*European Medicines Agency*). També, es realitzen assajos clínics de fase I, II i III per tal que el fàrmac sigui aprovat per la seva comercialització.

No obstant, en les malalties rares la recerca busca enfocar-se en el reposicionament de fàrmacs, on un compost ja aprovat com a teràpia eficient per una malaltia s'utilitza per tractar una malaltia diferent. El procediment és similar al que s'ha comentat en el paràgraf anterior però s'utilitzen col·leccions de fàrmacs aprovats enlloc d'una biblioteca de compostos de diversitat química, el que fa que els estudis preclínics siguin més curts (figura 52). És per això que en aquest estudi es van escollir, entre d'altres, compostos disponibles comercialment ja aprovats per l'Administració d'Aliments i Medicaments nord-americana (*Food and Drug Administration, FDA*), de manera que anar a assajos clínics sigui molt més fàcil.

Els medicaments orfes són els productes medicinals que serveixen per diagnosticar, prevenir o tractar malalties greus que comprometen la vida i que són rares. Una de les condicions necessàries perquè un medicament sigui considerat orfe és que no hi hagi un tractament autoritzat per la malaltia i si hi és, ha de proporcionar un benefici significatiu respecte l'antic medicament. Se'ls anomena orfes ja que la indústria farmacèutica té poc interès per desenvolupar i posar al mercat productes dirigits només a una petita quantitat de pacients que pateixen condicions molt rares. Per tal de poder desenvolupar un medicament orfe, cal obtenir la designació d'aquest per part del Comitè de Productes Medicinals Orfes (*Committee for Orphan Medicinal Products, COMP*) de l'Agència Europea del Medicament, amb base a Londres. Per aconseguir la designació és important tenir, almenys, estudis *in vivo* que demostrin un benefici clar del medicament, com també, és important que tots els resultats siguin patentats de manera que puguin atraure les indústries farmacèutiques a l'hora de continuar la recerca i dur a terme els assajos clínics. És per aquest motiu que aquesta tesi ha estat totalment codificada, per tal de protegir els resultats obtinguts amb propietat intel·lectual ja que l'objectiu final és poder realitzar assajos clínics en pacients amb els fàrmacs identificats i estudiats en aquest treball.

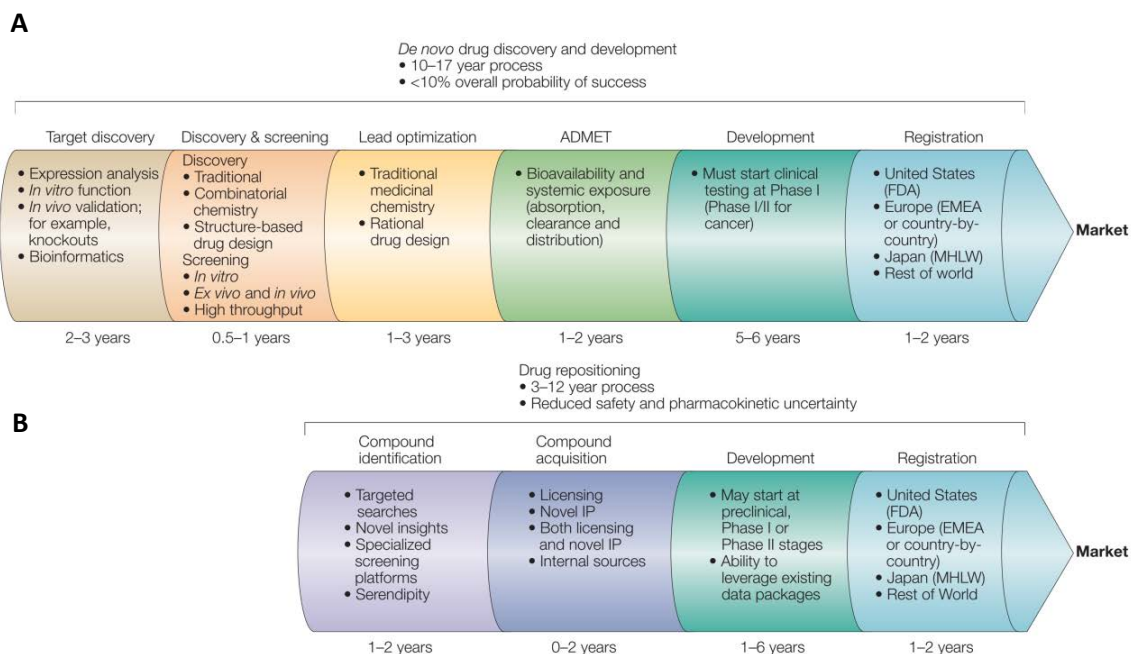


Figura 52. Procés de descobriment i desenvolupament de fàrmacs per malalties rares. Descobrimet de petites molècules (A) i reposicionament de fàrmacs (B) (Ashburn and Thor, 2004).

El cribatge d'un gran nombre de fàrmacs requereix de tècniques de detecció de biomarcadors que siguin automatitzables, en aquest cas de les cèl·lules Fanconi, ja que resulta molt costós en quant a temps l'ús de tècniques manuals que s'hagin d'analitzar per personal molt expert i que requereixin de moltes rèpliques per tal de validar els resultats. Per exemple, resultaria molt complicat utilitzar el test clàssic de fragilitat cromosòmica per tal d'observar l'efecte de fàrmacs candidats en la reducció dels trencaments cromosòmics observant metafases de limfòcits. Així doncs, es va posar a punt la tècnica de detecció de MN per analitzar la fragilitat cromosòmica de cèl·lules Fanconi en suspensió utilitzant la citometria de flux, tal i com va descriure Lukamowicz i col·laboradors l'any 2011 (Lukamowicz *et al.*, 2011). Es va utilitzar la tinció seqüencial de DAPI i EMA i es va adaptar el processament de les mostres i l'anàlisi a plaques de 96 pous, amb un robot adaptat al citòmetre per l'adquisició de les mostres automàticament (Lukamowicz *et al.*, 2011). Tot i que no s'havia descrit l'ús d'aquesta tècnica utilitzant la citometria cel·lular pel diagnòstic de l'anèmia de Fanconi ni la mateixa línia cel·lular per la determinació de la freqüència de MN, sí que es coneixia que les línies cel·lulars deficientes per gens Fanconi tenien un increment dels MN quan es tractaven amb diferents agents inductors de dany en el DNA, com la MMC (Callen *et al.*, 2002b, Rodriguez *et al.*, 2015), el formaldehid (Speit *et al.*, 2000), o la radiació ultravioleta (Federico *et al.*, 2016), en comparació amb les línies control sanes. Per posar a punt la tècnica i per realitzar el cribatge vam induir el dany amb el DEB, ja que el seu ús està altament estandarditzat pel diagnòstic de l'anèmia de

Fanconi. D'aquesta manera la freqüència de MN i la parada en G2/M s'incrementaven i es podia observar més fàcilment una millora amb el tractament dels fàrmacs antioxidants en comparació amb el dany espontani. Com que els pacients Fanconi no estan exposats al DEB en condicions normals, també es va induir el dany amb els agents inductors d'aldehids acetaldehid i formaldehid, ja que són compostos orgànics molt reactius produïts pel metabolisme cel·lular i una font de dany endogen en el DNA, que podrien mimetitzar el dany fisiològic que pateixen les cèl·lules constantment. Així doncs quan vam valorar els dos biomarcadors amb la presència d'aquests agents, es va observar un gran increment en la freqüència de MN i parada en G2/M. Per tant, la tècnica de MN per citometria de flux va ser una bona plataforma per tal de tractar amb diferents fàrmacs antioxidants i antiinflamatoris i intentar restablir aquests valors alterats, però no arriba a ser un sistema d'alt rendiment ja que el tractament dels compostos, el processament de les mostres i l'anàlisi d'una placa de 96 pous (estudi aproximat de 17 fàrmacs) implica 12 hores d'una persona treballant de manera activa.

Després de realitzar el tractament dels fàrmacs en diferents línies cel·lulars Fanconi i utilitzant el tractament de diferents tipus de dany, els compostos CRD3, CRD8, CRD11, CRD14, CRD17 i CRD18 van reduir la fragilitat cromosòmica en almenys 3 tipus de dany i l'efecte es va confirmar en 2 o 3 línies cel·lulars Fanconi. No obstant, es van seleccionar els compostos CRD3 i CRD8 ja que utilitzen la mateixa diana farmacològica i actualment s'utilitzen per tractar la mateixa malaltia. A més a més, fa dècades que aquests dos fàrmacs s'utilitzen en la clínica i tenen un bon perfil de seguretat. D'altra banda, les dosis que s'han utilitzat en aquest treball i que s'ha vist que no són genotòxiques són compatibles amb un futur reposicionament. Cal afegir que aquests dos compostos es poden prendre oralment i tenen un baix cost.

Així doncs, vam voler estudiar l'efecte dels dos fàrmacs quan es tractaven de manera crònica els ratolins deficients per la ruta FA/BRCA. Hi ha varis models murins generats amb deficiències en diferents gens Fanconi com *Fancc*^{-/-} (Chen *et al.*, 1996, Whitney *et al.*, 1996), *Fanca*^{-/-} (Cheng *et al.*, 2000), *Fancg*^{-/-} (Yang *et al.*, 2001), *Fanci*^{-/-} (Agoulnik *et al.*, 2002), *Fancd2*^{-/-} (Houghtaling *et al.*, 2003) i *Fancd1*^{Δ27/Δ27} (Connor *et al.*, 1997, McAllister *et al.*, 2002). Aquests ratolins són generalment petits, tenen una fertilitat reduïda per un desenvolupament anormal de les cèl·lules germinals i una sensibilitat molt elevada als agents inductors d'ICLs en les cèl·lules primàries (Parmar *et al.*, 2009). No obstant, els ratolins Fanconi no desenvolupen anormalitats esquelètiques o comptatges anormals en els diferents tipus de cèl·lules sanguínies i per tant no desenvolupen de forma espontània l'anèmia aplàsica característica dels humans

(Parmar *et al.*, 2009). Els ratolins Fanconi tampoc desenvolupen una fallada de moll de l'os espontània, amb l'excepció dels ratolins *Fancd2^{-/-}*, *Fancc^{-/-}* o els que tenen una mutació hipomòrfica en *Fancd1/Brca2^{Δ27/Δ27}*, els quals presenten disfuncions de les cèl·lules hematopoètiques com la proliferació dels precursors hematopoètics, la capacitat de repoblament del moll de l'os, sensibilitat a la MMC i aberracions cromosòmiques. Tot i això, es van escollir els ratolins *Fanca^{-/-}* per tractar-los de manera crònica amb els dos compostos candidats ja que més d'un 70 % dels pacients Fanconi tenen aquest gen mutat. Tanmateix, primer es va posar a punt la tècnica de MN en sang de ratolí per citometria de flux analitzant mostres de ratolins WT i *Fanca^{-/-}* per tal de comprovar si podíem veure diferències entre ells. Els resultats van mostrar que els ratolins Fanconi presentaven nivells més baixos de reticulòcits i un percentatge més elevat de reticulòcits i eritròcits madurs amb MN, en comparació amb els ratolins sans. No obstant, quan els ratolins *Fanca^{-/-}* es van tractar de manera crònica durant 6 mesos amb els 2 compostos, no es va observar cap millora significativa en els 3 biomarcadors estudiats. Cal destacar que els primers ratolins que van morir van ser del grup control sense tractament, i no es va poder obtenir sang per determinar aquests paràmetres ja que van morir en cap de setmana. Això ha fet que la n del grup control s'hagi vist reduïda. A més a més, la tècnica mostra molta variabilitat dels resultats obtinguts ja que els valors de pretractament entre els 3 grups van resultar ser diferents entre ells, i, fins i tot, en el grup del CRD8, la freqüència de reticulòcits amb MN té valors molt similars als ratolins control, i, per tant, aquest grup ja presentava valors normals abans de l'administració del compost. L'aspecte més rellevant d'aquest estudi en models murins ha sigut que el 60% dels ratolins control van morir o van ser sacrificats pel seu estat de salut als 12 mesos que va durar el tractament, a diferència del 80 i 100% dels ratolins tractats amb els compostos CRD3 i CRD8, respectivament. És important destacar que l'estudi de Walter i col·laboradors l'any 2015 va demostrar que tot i que els ratolins *Fanca^{-/-}* no desenvolupen espontàniament la fallada de moll de l'os, el sistema hematopoètic col·lapsa com a resposta fisiològica a infeccions o a l'estrès per sagnats crònics constants. Això, podria explicar que varis ratolins del grup control patissin una mort prematura com a conseqüència dels sagnats continus que es van anar obtenint fins les 24 setmanes, ja que hi ha estudis que han reportat experiments amb ratolins *Fanca^{-/-}* fins a 500 dies de vida (Walter *et al.*, 2015). En canvi, sembla que els dos fàrmacs antioxidants protegeixen els animals de la mort i és el primer cop que es descriu que un fàrmac pot augmentar la supervivència dels ratolins Fanconi. A més a més, els valors de glucosa en sang estaven elevats en els ratolins control i es van veure normalitzats amb el tractament dels dos fàrmacs antioxidants. Està descrit que els ratolins WT tenen uns nivells de glucosa més baixos

en comparació amb els ratolins *Fanca^{-/-}*, el que podria indicar una millora de l'estat de salut general dels animals, que explicaria els resultats de la supervivència prolongada ja que alts nivells de glucosa estan associats amb diabetes i envelliment (Berglund *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2012). La resta de valors no es van veure afectats, i sembla que aquests fàrmacs administrats de manera crònica no alteren els paràmetres bioquímics analitzats.

No obstant, no tenim un mecanisme d'acció que expliqui per què els fàrmacs van protegir els ratolins de la mort prematura ja que des del punt de vista del fenotip hematològic no es va observar cap efecte. És per això que vam contactar amb l'empresa Intelligent Pharma® per que realitzés algorismes *in silico* utilitzant el software Pythia per identificar mecanismes d'acció comuns dels compostos CRD3 i CRD8. Es va observar que ambdós compostos disminuïen el ROS i la inflamació i augmentaven la reparació del DNA a través de diferents dianes farmacològiques. D'altra banda, queden pendents estudis amb la melsa, el pulmó i el fetge dels quals es disposen mostres parafinades dels diferents ratolins per tal de realitzar talls histològics i determinar si els ratolins control tenen els òrgans més envellits amb estudis de longitud telomèrica o bé, si tenen infiltrats leucèmics que puguin explicar aquesta protecció dels fàrmacs antioxidants davant la mort prematura dels animals control.

Així com en la literatura hi ha varis estudis on utilitzen els HTS per identificar candidats terapèutics pel tractament de diferents malalties, com per exemple, la fibrodisplàsia ossificant progressiva (Cappato *et al.*, 2016) o la hiperoxalúria primària de tipus 1 (Wang *et al.*, 2016), en aquest estudi també es va recórrer a plataformes de cribatge de fàrmacs per tal d'utilitzar biblioteques amb gran quantitat de compostos amb un potencial terapèutic per curar l'anèmia de Fanconi. Per tal d'avaluar l'eficàcia terapèutica dels compostos es va posar a punt un sistema cel·lular fenotípic per tal de caracteritzar l'activació de la ruta FA/BRCA amb la presència o absència de formació de *foci* de FANCD2 en les cèl·lules Fanconi després del tractament dels compostos. La formació de *foci* és un pas crític de la ruta ja que només es dona quan FANCD2 és monoubiquitinada, i per tant, el que es pretenia era que els compostos actuessin a un nivell *upstream* a aquesta modificació post-traducciona. Els cribatges s'avaluen amb el càlcul del factor Z', i és recomanable que sigui superior al 0,5. En aquest cas, el factor Z' va donar 0,4, però es va considerar que el sistema cel·lular era prou bo per detectar si la ruta FA/BRCA era o no activada, així com també el programa de software va identificar molt bé els *foci* en el control positiu però no en el negatiu durant l'experiment pilot. El valor baix del factor Z' es va associar a que la ruta FA/BRCA només pot ser

activada quan les cèl·lules es troben en la fase S del cicle cel·lular, i per tant, no totes les cèl·lules de les imatges podien ser detectades pel programa com a positives. Es va intentar afegir el marcador de proliferació cel·lular EdU en el canal vermell, per tal d'enriquir i filtrar la població de cèl·lules en fase S, però aquest marcador va afectar i emmascarar la fluorescència associada a la YFP, fent que els *foci* s'observessin molt menys clars i al final, no el vam poder utilitzar. No obstant, un cop es van obtenir les dades dels resultats, es va observar que tots els compostos que havia identificat el software com a positius en realitat es corresponien a fàrmacs autofluorescents que havien agregat i precipitat dins dels nuclis de les cèl·lules i es van considerar com a falsos positius. Tot i això, si hi hagués hagut un fàrmac capaç de reactivar la ruta FA/BRCA com es reactivava en el control positiu, s'hagués pogut detectar. Tots els compostos que es va sospitar que podien reactivar la formació de *foci* es van reanalitzar visualment per dues persones del laboratori i tot i que no es va trobar cap compost que activés la ruta d'una manera molt clara, sí que es van observar alguns fàrmacs que formaven alguns *foci* en poques cèl·lules, mai tant intensos ni en tanta freqüència com en el control positiu, i que finalment van resultar ser també falsos positius. Per tant, tot i que es van testar 3802 compostos, no van ser suficients per trobar un reactivador de la ruta FA/BRCA. Tot i això, es tracta d'un sistema cel·lular ràpid i fiable que permet l'anàlisi de milers de compostos en poques setmanes i que pot resultar una eina útil per realitzar altres cribatges amb més compostos de diferent diversitat química ja que actualment no n'hi cap més reportat per tal de trobar una teràpia eficient pels pacients amb anèmia de Fanconi. A més, hi ha membres del grup desenvolupant assajos encara més versàtils per poder realitzar HTS de manera que es puguin analitzar fàrmacs d'un o dos ordres de magnitud més ràpid que amb el sistema de HCS descrit en aquest estudi.

En el cribatge de fàrmacs per estudiar els compostos potencialment reactivadors de la ruta FA/BRCA es va utilitzar la línia U2OS. Aquesta línia cel·lular té un origen tumoral i li vam inactivar el gen *FANCA* per la tecnologia TALEN i per tant, des d'un punt de vista funcional, aquesta línia és un model tumoral d'un pacient *FANCA*^{-/-}. Aprofitant aquest sistema cel·lular, durant l'anàlisi dels resultats va sorgir la possibilitat d'aprofitar les dades obtingudes per obtenir informació de compostos antitumorals no genotòxics pel tractament dels tumors sòlids en l'anèmia de Fanconi. A la literatura hi ha varis estudis de HTS per trobar compostos per tractar diferents tipus de càncer, com per exemple l'adrenocortical (Nilubol *et al.*, 2012), de tiroides (Zhang *et al.*, 2012) o la leucèmia limfocítica crònica (Shen *et al.*, 2013), però en cap cas hi ha literatura enfocada a una teràpia que es pugui administrar als pacients Fanconi quan són

diagnosticats de malignitats. Els únics estudis que han utilitzat la ruta FA/BRCA per realitzar HCS tenien la finalitat de trobar inhibidors de la formació de *foci* de FANCD2 i, per tant, compostos que bloquegin l'activació de la ruta per tal de tractar tumors de pacients no Fanconi que desenvolupin resistències als ICLs, usualment utilitzats com a quimioterapèutics. No obstant, no és una teràpia que es pugui administrar als pacients Fanconi ja que aquests ja no tenen la ruta activa. Un dels tumors més freqüentment diagnosticats en els pacients Fanconi és el HNSCC i es manifesta en una edat molt més primerenca respecte la població general. Els tumors primaris acostumen a aparèixer en la cavitat oral, principalment en la llengua o la geniva com també en l'orofaringe, nasofaringe o la laringe. Un seguiment inadequat i el creixement tumoral ràpid fa que els pacients arribin a la consulta quan els tumors són excessivament grans i difícils de controlar i en pocs mesos apareix la metàstasi i els càncers secundaris. Desafortunadament, l'únic tractament eficaç en l'actualitat és la resecció quirúrgica en fases poc avançades del tumor i és molt important que es deixin els marges lliures de cèl·lules tumorals, ja que el tractament amb cisplatí o la radioteràpia generen una alta toxicitat amb fallada d'òrgans que pot resultar amb complicacions més greus que el propi tumor. Així doncs, és molt necessària la recerca de teràpies personalitzades que tinguin com a diana mecanismes essencials en el creixement i proliferació dels tumors sense induir dany en el DNA.

Dels comptatges de nuclis obtinguts en el cribatge per trobar fàrmacs reactivadors de la ruta, es van seleccionar un total de 183 compostos antitumorals que utilitzaven mecanismes que no implicaven el dany en el DNA i que reduïen la viabilitat de les cèl·lules U2OS FANCA^{-/-}. Es van validar en dues fases diferents ja que disposàvem d'estocs limitats en el conveni de col·laboració amb el centre de recerca suec. Un cop arribat a aquest punt, vam decidir contactar amb la Dra. Josephine Dorsman (VU University Medical Center, Amsterdam) perquè ens proporcionés línies de HNSCC de pacients Fanconi i vam dissenyar un programa específic amb el software d'anàlisi per detectar els nuclis en aquestes línies cel·lulars, com també en fibroblasts primaris de pacients Fanconi. Finalment es van obtenir 2 compostos candidats que específicament inhibien el creixement de les 3 línies Fanconi de HNSCC utilitzades, sense fer-ho en les línies primàries. Els dos compostos estan aprovats per la FDA pel tractament de diferents tumors i, per tant, tenen un bon perfil de seguretat en la població general. A més a més, els assajos clínics realitzats amb aquests fàrmacs demostren que no causen problemes secundaris en el sistema hematopoètic i es poden administrar de manera crònica. No obstant, era important confirmar que no induïen el dany en el DNA ni la fragilitat cromosòmica en les cèl·lules Fanconi, fet que vam comprovar estudiant

la monoubiquitinació de FANCD2 i la fragilitat cromosòmica per la producció de MN. És per això que els estudis *in vitro* van mostrar un molt bon potencial d'aquests fàrmacs i es va continuar amb un estudi *in vivo* utilitzant models murins immunodeprimits on vam injectar el tumor en el llom dels ratolins. Els dos fàrmacs van inhibir el creixement de manera molt efectiva utilitzant la línia de HNSCC VU1131-T2.8 i s'espera que en les pròximes setmanes es repeteixi la mateixa efectivitat en la línia VU1604-T. Un cop s'acabin els estudis *in vivo* amb els HNSCC, queda pendent analitzar la possible toxicitat dels fàrmacs *in vivo* en ratolins Fanconi com també protegir els resultats per tal de facilitar l'obtenció de la designació de medicament orfe per part de les autoritats competents. Per tal d'aconseguir la designació de fàrmac orfe cal que el medicament inclogui diferents criteris, que el fàrmac tingui intenció de curar una malaltia que suposi un risc per la vida o sigui crònicament debilitant, que la prevalença de la malaltia no superi els 5 afectats cada 10.000 persones de la EU i que no hi hagi un mètode de prevenció o tractament autoritzat per la malaltia, o si existeix que es demostrï que el nou medicament proporciona un benefici significatiu en comparació amb el que s'administra (figura 53). L'Agència Europea del Medicament envia l'opinió a la Comissió Europea, la qual és responsable de concedir la designació orfe. Si es concedeix, la EU ofereix incentius per promoure el desenvolupament dels fàrmacs orfes i atraure empreses farmacèutiques ja que el desenvolupament de fàrmacs per malalties rares on un petit nombre de pacients se'n poden beneficiar té un atractiu comercial baix en les condicions de mercat actuals.

Creiem que el tractament crònic dels fàrmacs identificats CRD3 i CRD8 podrien augmentar el temps lliure dels pacients sense l'aparició de l'anèmia i/o les malignitats. D'altra banda, els fàrmacs CAT2 i CAT29 es podrien utilitzar en els pacients diagnosticats d'un tumor sòlid ja que el pronòstic sovint acostuma a ser fatal i, en el millor dels casos, al cap de pocs mesos apareixen tumors secundaris o nous primaris, el que justificaria l'ús d'aquests fàrmacs. A més a més, tots ells compleixen perfectament els criteris exigits per l'Agència Europea del Medicament ja que:

- 1) Tant l'anèmia com les malignitats dels pacients amb anèmia de Fanconi suposen un risc per la vida.
- 2) Es tracta d'una malaltia rara ja que té una prevalença d'1 a 5 per cada milió de naixements amb uns 200 pacients a l'estat espanyol.

3) L'únic tractament aprovat i efectiu és el transplantament de progenitors hematopoètics per tal de curar la fallada del moll de l'os, tot i que no és efectiva en tots els pacients. A més a més, no tots els pacients tenen un donant compatible i té efectes secundaris severos associats i, per tant, no és una teràpia òptima.

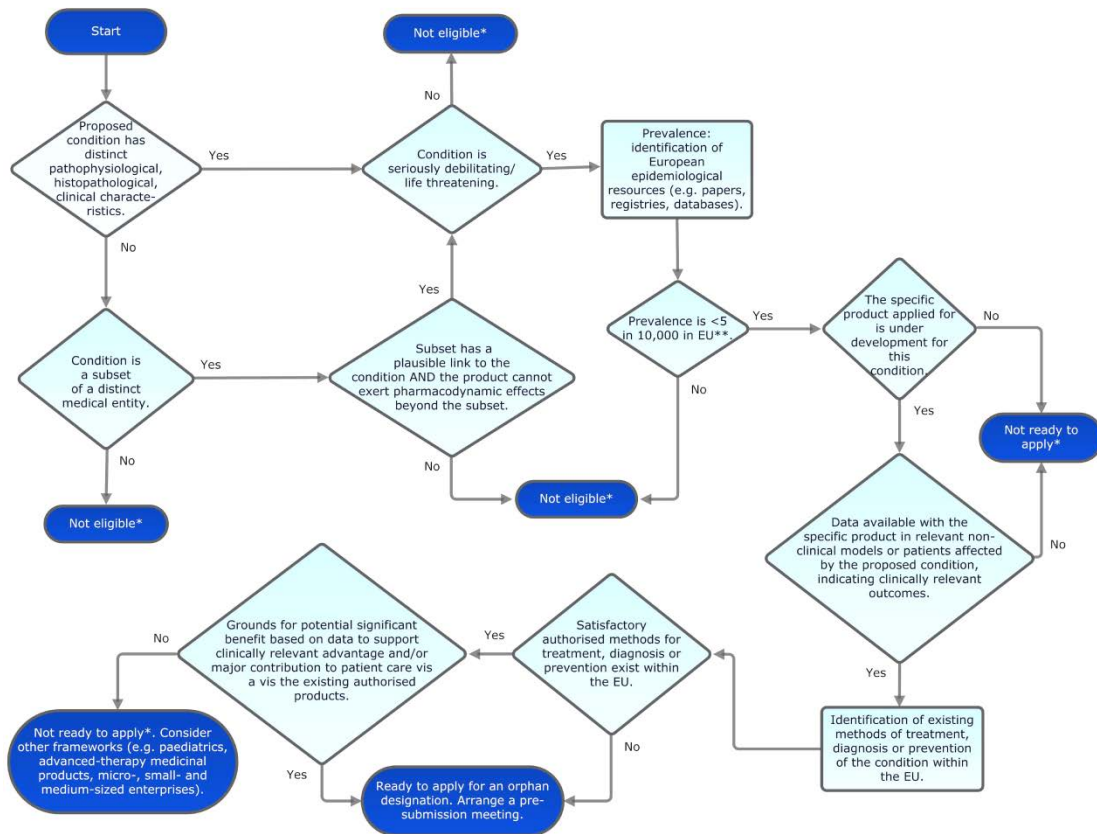


Figura 53. Guia per sol·licitar la designació orfe (EMA, 2015).

Conclusions

6. Conclusions

- Flow cytometric micronucleus assay using FANCA-deficient lymphoblastoid cell lines is a good method to detect genome instability caused by ICL inducing agents such as dyepoxibutane, formaldehyde and acetaldehyde.
- The first compound screening performed using the flow cytometric micronucleus assay identified CRD3 and CRD8 as candidate compounds. These two drugs protect Fanca-deficient mice from early death.
- The newly developed cell-based system on FANCD2 foci detection is a good platform to perform HCS in search of compounds to restore the FA/BRCA pathway.
- None of the compounds tested in the HCS using the cell-based system on FANCD2 foci detection restored the FA/BRCA pathway, suggesting that none of the currently approved FDA drugs can be repurposed for the treatment of Fanconi anemia.
- The second HCS performed in search of non-genotoxic antitumoral drugs identified CAT2 and CAT29 as candidate compounds. Both drugs strongly inhibited Fanconi anemia patient-derived HNSCC cell line growth *in vitro* and Fanconi HNSCC xenograft implanted into immunodeficient mice.
- We propose to continue the preclinical studies in order to repurpose CDR3 and CDR8 to treat Fanconi anemia and CAT2 and CAT29 to treat Fanconi HNSCC.

6. Conclusions

- L'assaig de micronuclis per citometria de flux en línies limfoblastoids humanes deficientes per FANCA és un bon mètode per detectar la inestabilitat genòmica induïda per agents inductors d'enllaços creuats entre cadenes com el diepoxibutà, el formaldehid o l'acetaldehid.
- El primer cribatge de fàrmacs realitzat, utilitzant l'assaig de micronuclis, va identificar el CRD3 i CRD8 com a compostos candidats. Aquests, protegeixen els ratolins deficientes per Fanca d'una mort prematura.
- L'assaig cel·lular basat en la detecció de *foci* de FANCD2 desenvolupat recentment és una bona plataforma per la realització de HCS, per la recerca de fàrmacs que puguin reconstituir la ruta FA/BRCA.
- Cap dels fàrmacs analitzats en el HCS utilitzant l'assaig cel·lular basat en la detecció de *foci* de FANCD2 va ser capaç de reconstituir la ruta FA/BRRCA, suggerint que cap dels compostos actualment aprovats per la FDA pot ser reposicionat pel tractament de l'anèmia de Fanconi.
- El segon HCS realitzat per trobar fàrmacs antitumorals no genotòxics va identificar el CAT2 i el CAT29 com a compostos candidats. Els dos fàrmacs van inhibir considerablement el creixement cel·lular *in vitro* de HNSCC derivats de pacients Fanconi i el d'un xenoempelt de HNSCC Fanconi implantat en models murins immunodeprimits.
- Proposem continuar els estudis preclínic amb la finalitat de reposicionar els compostos CDR3 i CRD8 per tractar l'anèmia de Fanconi i el CAT2 i el CAT29 per tractar els HNSCC Fanconi.

Bibliografia

7. Bibliografia

- Adair, J. E., Sevilla, J., De Heredia, C. D., Becker, P. S., Kiem, H. P. & Bueren, J. 2017. Lessons Learned from Two Decades of Clinical Trial Experience in Gene Therapy for Fanconi Anemia. *Curr Gene Ther.*
- Adamo, A., Collis, S. J., Adelman, C. A., Silva, N., Horejsi, Z., Ward, J. D., Martinez-Perez, E., Boulton, S. J. & La Volpe, A. 2010. Preventing nonhomologous end joining suppresses DNA repair defects of Fanconi anemia. *Mol Cell*, 39, 25-35.
- Agoulnik, A. I., Lu, B., Zhu, Q., Truong, C., Ty, M. T., Arango, N., Chada, K. K. & Bishop, C. E. 2002. A novel gene, Pog, is necessary for primordial germ cell proliferation in the mouse and underlies the germ cell deficient mutation, gcd. *Hum Mol Genet*, 11, 3047-53.
- Alpi, A., Langevin, F., Mosedale, G., Machida, Y. J., Dutta, A. & Patel, K. J. 2007. UBE2T, the Fanconi anemia core complex, and FANCD2 are recruited independently to chromatin: a basis for the regulation of FANCD2 monoubiquitination. *Mol Cell Biol*, 27, 8421-30.
- Alpi, A. F., Pace, P. E., Babu, M. M. & Patel, K. J. 2008. Mechanistic insight into site-restricted monoubiquitination of FANCD2 by Ube2t, FANCL, and FANCI. *Mol Cell*, 32, 767-77.
- Alter, B. P. 2005. Fanconi's anemia, transplantation, and cancer. *Pediatr Transplant*, 9 Suppl 7, 81-6.
- Alter, B. P. & Rosenberg, P. S. 2013. VACTERL-H Association and Fanconi Anemia. *Mol Syndromol*, 4, 87-93.
- Andreassen, P. R., D'andrea, A. D. & Taniguchi, T. 2004. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes Dev*, 18, 1958-63.
- Antonio Casado, J., Callen, E., Jacome, A., Rio, P., Castella, M., Lobitz, S., Ferro, T., Munoz, A., Sevilla, J., Cantalejo, A., Cela, E., Cervera, J., Sanchez-Calero, J., Badell, I., Estella, J., Dasi, A., Olive, T., Jose Ortega, J., Rodriguez-Villa, A., Tapia, M., Molines, A., Madero, L., Segovia, J. C., Neveling, K., Kalb, R., Schindler, D., Hanenberg, H., Surralles, J. & Bueren, J. A. 2007. A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J Med Genet*, 44, 241-9.
- Ashburn, T. T. & Thor, K. B. 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 673-83.
- Auerbach, A. D. 2003. Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 8, Unit 8 7.
- Auerbach, A. D. 2009. Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res*, 668, 4-10.
- Auerbach, A. D. 2015. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Hum Genet*, 85, 8 7 1-17.
- Balch, C., Huang, T. H., Brown, R. & Nephew, K. P. 2004. The epigenetics of ovarian cancer drug resistance and resensitization. *Am J Obstet Gynecol*, 191, 1552-72.
- Balmus, G., Karp, N. A., Ng, B. L., Jackson, S. P., Adams, D. J. & Mcintyre, R. E. 2015. A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability screening in mice. *Nat Protoc*, 10, 205-15.
- Bellomo, F., Medina, D. L., De Leo, E., Panarella, A. & Emma, F. 2017. High-content drug screening for rare diseases. *J Inherit Metab Dis*, 40, 601-607.
- Berglund, E. D., Li, C. Y., Poffenberger, G., Ayala, J. E., Fueger, P. T., Willis, S. E., Jewell, M. M., Powers, A. C. & Wasserman, D. H. 2008. Glucose metabolism in vivo in four commonly used inbred mouse strains. *Diabetes*, 57, 1790-9.
- Bijangi-Vishehsaraei, K., Saadatzaheh, M. R., Werne, A., Mckenzie, K. A., Kapur, R., Ichijo, H. & Haneline, L. S. 2005. Enhanced TNF-alpha-induced apoptosis in Fanconi anemia type C-

- deficient cells is dependent on apoptosis signal-regulating kinase 1. *Blood*, 106, 4124-30.
- Birkeland, A. C., Auerbach, A. D., Sanborn, E., Parashar, B., Kuhel, W. I., Chandrasekharappa, S. C., Smogorzewska, A. & Kutler, D. I. 2011. Postoperative clinical radiosensitivity in patients with fanconi anemia and head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 137, 930-4.
- Blasco, M. A., Gasser, S. M. & Lingner, J. 1999. Telomeres and telomerase. *Genes Dev*, 13, 2353-9.
- Bluteau, D., Masliah-Planchon, J., Clairmont, C., Rousseau, A., Ceccaldi, R., Dubois D'enghien, C., Bluteau, O., Cuccuini, W., Gachet, S., Peffault De Latour, R., Leblanc, T., Socie, G., Baruchel, A., Stoppa-Lyonnet, D., D'andrea, A. D. & Soulier, J. 2016. Biallelic inactivation of REV7 is associated with Fanconi anemia. *J Clin Invest*, 126, 3580-4.
- Bocker, W., Streffer, C., Muller, W. U. & Yu, C. 1996. Automated scoring of micronuclei in binucleated human lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 70, 529-37.
- Bogliolo, M., Lyakhovich, A., Callen, E., Castella, M., Cappelli, E., Ramirez, M. J., Creus, A., Marcos, R., Kalb, R., Neveling, K., Schindler, D. & Surralles, J. 2007. Histone H2AX and Fanconi anemia FANCD2 function in the same pathway to maintain chromosome stability. *EMBO J*, 26, 1340-51.
- Bogliolo, M., Schuster, B., Stoepker, C., Derkunt, B., Su, Y., Raams, A., Trujillo, J. P., Minguillon, J., Ramirez, M. J., Pujol, R., Casado, J. A., Banos, R., Rio, P., Knies, K., Zuniga, S., Benitez, J., Bueren, J. A., Jaspers, N. G., Scharer, O. D., De Winter, J. P., Schindler, D. & Surralles, J. 2013. Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet*, 92, 800-6.
- Bogliolo, M. & Surralles, J. 2015. Fanconi anemia: a model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics. *Curr Opin Genet Dev*, 33, 32-40.
- Bonfim, C., Ribeiro, L., Nichele, S., Bitencourt, M., Loth, G., Koliski, A., Funke, V. A., Pilonetto, D. V., Pereira, N. F., Flowers, M. E., Velleuer, E., Dietrich, R., Fasth, A., Torres-Pereira, C. C., Pedruzzi, P., Eapen, M. & Pasquini, R. 2016. Long-term Survival, Organ Function, and Malignancy after Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Fanconi Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*, 22, 1257-63.
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralto, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S., Baselga, J., Youssofian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K. & Ang, K. K. 2006. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 354, 567-78.
- Boulton, S. J. 2006. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans*, 34, 633-45.
- Brown, J. S., O'carrigan, B., Jackson, S. P. & Yap, T. A. 2017. Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors. *Cancer Discov*, 7, 20-37.
- Bryce, S. M., Avlasevich, S. L., Bemis, J. C., Phonethepswath, S. & Dertinger, S. D. 2010. Miniaturized flow cytometric in vitro micronucleus assay represents an efficient tool for comprehensively characterizing genotoxicity dose-response relationships. *Mutat Res*, 703, 191-9.
- Buchser, W., Collins, M., Garyantes, T., Guha, R., Haney, S., Lemmon, V., Li, Z. & Trask, O. J. 2004. Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging. In: Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Brimacombe, K., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Bejcek, B., Chung, T. D. Y., Dahlin, J. L., Devanaryan, V., Foley, T. L., Glicksman, M., Hall, M. D., Hass, J. V., Inglese, J., Iversen, P. W., Kahl, S. D., Kales, S. C., Lal-Nag, M., Li, Z., Mcgee, J., Mcmanus, O., Riss, T., Trask, O. J., Jr., Weidner, J. R., Xia, M. & Xu, X. (eds.) *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD).

- Buettner, R., Mesa, T., Vultur, A., Lee, F. & Jove, R. 2008. Inhibition of Src family kinases with dasatinib blocks migration and invasion of human melanoma cells. *Mol Cancer Res*, 6, 1766-74.
- Burnet, N. G. & Peacock, J. H. 2002. Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Radiother Oncol*, 62, 350-1; author reply 351-2.
- Butturini, A., Gale, R. P., Verlander, P. C., Adler-Brecher, B., Gillio, A. P. & Auerbach, A. D. 1994. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood*, 84, 1650-5.
- Callen, E., Samper, E., Ramirez, M. J., Creus, A., Marcos, R., Ortega, J. J., Olive, T., Badell, I., Blasco, M. A. & Surralles, J. 2002a. Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. *Hum Mol Genet*, 11, 439-44.
- Callen, E., Ramirez, M. J., Creus, A., Marcos, R., Frias, S., Molina, B., Badell, I., Olive, T., Ortega, J. J. & Surralles, J. 2002b. The clastogenic response of the 1q12 heterochromatic region to DNA cross-linking agents is independent of the Fanconi anaemia pathway. *Carcinogenesis*, 23, 1267-71.
- Callen, E., Casado, J. A., Tischkowitz, M. D., Bueren, J. A., Creus, A., Marcos, R., Dasi, A., Estella, J. M., Munoz, A., Ortega, J. J., De Winter, J., Joenje, H., Schindler, D., Hanenberg, H., Hodgson, S. V., Mathew, C. G. & Surralles, J. 2005. A common founder mutation in FANCA underlies the world's highest prevalence of Fanconi anemia in Gypsy families from Spain. *Blood*, 105, 1946-9.
- Callisen, H. H., Pincu, M. & Norman, A. 1986. Feasibility of automating the micronucleus assay. *Anal Quant Cytol Histol*, 8, 219-23.
- Cappato, S., Tonachini, L., Giacomelli, F., Tirone, M., Galiotta, L. J., Sormani, M., Giovenzana, A., Spinelli, A. E., Canciani, B., Brunelli, S., Ravazzolo, R. & Bocciardi, R. 2016. High-throughput screening for modulators of ACVR1 transcription: discovery of potential therapeutics for fibrodysplasia ossificans progressiva. *Dis Model Mech*, 9, 685-96.
- Cappelli, E., Ravera, S., Vaccaro, D., Cuccarolo, P., Bartolucci, M., Panfoli, I., Dufour, C. & Degan, P. 2013. Mitochondrial respiratory complex I defects in Fanconi anemia. *Trends Mol Med*, 19, 513-4.
- Castella, M., Pujol, R., Callen, E., Ramirez, M. J., Casado, J. A., Talavera, M., Ferro, T., Munoz, A., Sevilla, J., Madero, L., Cela, E., Belendez, C., De Heredia, C. D., Olive, T., De Toledo, J. S., Badell, I., Estella, J., Dasi, A., Rodriguez-Villa, A., Gomez, P., Tapia, M., Molines, A., Figuera, A., Bueren, J. A. & Surralles, J. 2011a. Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact. *J Med Genet*, 48, 242-50.
- Castella, M., Pujol, R., Callen, E., Trujillo, J. P., Casado, J. A., Gille, H., Lach, F. P., Auerbach, A. D., Schindler, D., Benitez, J., Porto, B., Ferro, T., Munoz, A., Sevilla, J., Madero, L., Cela, E., Belendez, C., De Heredia, C. D., Olive, T., De Toledo, J. S., Badell, I., Torrent, M., Estella, J., Dasi, A., Rodriguez-Villa, A., Gomez, P., Barbot, J., Tapia, M., Molines, A., Figuera, A., Bueren, J. A. & Surralles, J. 2011b. Origin, functional role, and clinical impact of Fanconi anemia FANCA mutations. *Blood*, 117, 3759-69.
- Chao, M. M., Ebell, W., Bader, P., Beier, R., Burkhardt, B., Feuchtinger, T., Handgretinger, R., Hanenberg, H., Koehl, U., Kratz, C., Kremens, B., Lang, P., Meisel, R., Mueller, I., Roessig, C., Sauer, M., Schlegel, P. G., Schulz, A., Strahm, B., Thol, F. & Sykora, K. W. 2015. Consensus of German transplant centers on hematopoietic stem cell transplantation in Fanconi anemia. *Klin Padiatr*, 227, 157-65.
- Chaudhury, I., Sareen, A., Raghunandan, M. & Soback, A. 2013. FANCD2 regulates BLM complex functions independently of FANCI to promote replication fork recovery. *Nucleic Acids Res*, 41, 6444-59.
- Chaudhury, S., Auerbach, A. D., Kernan, N. A., Small, T. N., Prockop, S. E., Scaradavou, A., Heller, G., Wolden, S., O'reilly, R. J. & Boulad, F. 2008. Fludarabine-based cytoreductive

- regimen and T-cell-depleted grafts from alternative donors for the treatment of high-risk patients with Fanconi anaemia. *Br J Haematol*, 140, 644-55.
- Chembl 2017. <https://www.ebi.ac.uk/chembl>.
- Chen, M., Tomkins, D. J., Auerbach, W., Mckerlie, C., Youssoufian, H., Liu, L., Gan, O., Carreau, M., Auerbach, A., Groves, T., Guidos, C. J., Freedman, M. H., Cross, J., Percy, D. H., Dick, J. E., Joyner, A. L. & Buchwald, M. 1996. Inactivation of Fac in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anaemia. *Nat Genet*, 12, 448-51.
- 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. & Arwert, F. 2000. Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog Fanca. *Hum Mol Genet*, 9, 1805-11.
- 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. & D'andrea, A. D. 2006. Chemosensitization to cisplatin by inhibitors of the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cancer Ther*, 5, 952-61.
- Chuhjo, T., Yamazaki, H., Omine, M. & Nakao, S. 2008. Danazol therapy for aplastic anemia refractory to immunosuppressive therapy. *Am J Hematol*, 83, 387-9.
- Ciardello, F., Troiani, T., Caputo, F., De Laurentiis, M., Tortora, G., Palmieri, G., De Vita, F., Diadema, M. R., Orditura, M., Colantuoni, G., Gridelli, C., Catalano, G., De Placido, S. & Bianco, A. R. 2006. Phase II study of gefitinib in combination with docetaxel as first-line therapy in metastatic breast cancer. *Br J Cancer*, 94, 1604-9.
- Ciccia, A., Ling, C., Coulthard, R., Yan, Z., Xue, Y., Meetei, A. R., Laghmani El, H., Joenje, H., McDonald, N., De Winter, J. P., Wang, W. & West, S. C. 2007. Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. *Mol Cell*, 25, 331-43.
- Cohen-Haguenauer, O., Peault, B., Bauche, C., Daniel, M. T., Casal, I., Levy, V., Dausset, J., Boiron, M., Auclair, C., Gluckman, E. & Marty, M. 2006. In vivo repopulation ability of genetically corrected bone marrow cells from Fanconi anemia patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2340-5.
- Cohn, M. A., Kowal, P., Yang, K., Haas, W., Huang, T. T., Gygi, S. P. & D'andrea, A. D. 2007. A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*, 28, 786-97.
- Cole, A. R., Lewis, L. P. & Walden, H. 2010. The structure of the catalytic subunit FANCL of the Fanconi anemia core complex. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 294-8.
- Collins, N. B., Wilson, J. B., Bush, T., Thomashevski, A., Roberts, K. J., Jones, N. J. & Kupfer, G. M. 2009. ATR-dependent phosphorylation of FANCA on serine 1449 after DNA damage is important for FA pathway function. *Blood*, 113, 2181-90.
- Collis, S. J., Ciccia, A., Deans, A. J., Horejsi, Z., Martin, J. S., Maslen, S. L., Skehel, J. M., Elledge, S. J., West, S. C. & Boulton, S. J. 2008. FANCM and FAAP24 function in ATR-mediated checkpoint signaling independently of the Fanconi anemia core complex. *Mol Cell*, 32, 313-24.
- Columbaro, M., Ravera, S., Capanni, C., Panfoli, I., Cuccarolo, P., Stroppiana, G., Degan, P. & Cappelli, E. 2014. Treatment of FANCA cells with resveratrol and N-acetylcysteine: a comparative study. *PLoS One*, 9, e104857.
- Connor, F., Bertwistle, D., Mee, P. J., Ross, G. M., Swift, S., Grigorieva, E., Tybulewicz, V. L. & Ashworth, A. 1997. Tumorigenesis and a DNA repair defect in mice with a truncating Brca2 mutation. *Nat Genet*, 17, 423-30.
- Coulson, A., Levy, A. & Gossell-Williams, M. 2014. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy: Mechanisms, Successes and Limitations. *West Indian Med J*, 63, 650-4.
- Coulthard, R., Deans, A. J., Swuec, P., Bowles, M., Costa, A., West, S. C. & McDonald, N. Q. 2013. Architecture and DNA recognition elements of the Fanconi anemia FANCM-FAAP24 complex. *Structure*, 21, 1648-58.

- Crawford, S. 2013. Is it time for a new paradigm for systemic cancer treatment? Lessons from a century of cancer chemotherapy. *Front Pharmacol*, 4, 68.
- Crossan, G. P. & Patel, K. J. 2012. The Fanconi anaemia pathway orchestrates incisions at sites of crosslinked DNA. *J Pathol*, 226, 326-37.
- Csiszar, A. 2011. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1215, 117-22.
- Cumming, R. C., Lightfoot, J., Beard, K., Youssoufian, H., O'Brien, P. J. & Buchwald, M. 2001. Fanconi anemia group C protein prevents apoptosis in hematopoietic cells through redox regulation of GSTP1. *Nat Med*, 7, 814-20.
- D'andrea, A. D. & Grompe, M. 2003. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer*, 3, 23-34.
- De Silva, I. U., Mchugh, P. J., Clingen, P. H. & Hartley, J. A. 2000. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 20, 7980-90.
- De Winter, J. P., Waisfisz, Q., Rooimans, M. A., Van Berkel, C. G., Bosnoyan-Collins, L., Alon, N., Carreau, M., Bender, O., Demuth, I., Schindler, D., Pronk, J. C., Arwert, F., Hoehn, H., Digweed, M., Buchwald, M. & Joenje, H. 1998. The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet*, 20, 281-3.
- De Winter, J. P., Rooimans, M. A., Van Der Weel, L., Van Berkel, C. G., Alon, N., Bosnoyan-Collins, L., De Groot, J., Zhi, Y., Waisfisz, Q., Pronk, J. C., Arwert, F., Mathew, C. G., Scheper, R. J., Hoatlin, M. E., Buchwald, M. & Joenje, H. 2000a. The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet*, 24, 15-6.
- De Winter, J. P., Leveille, F., Van Berkel, C. G., Rooimans, M. A., Van Der Weel, L., Steltenpool, J., Demuth, I., Morgan, N. V., Alon, N., Bosnoyan-Collins, L., Lightfoot, J., Leegwater, P. A., Waisfisz, Q., Komatsu, K., Arwert, F., Pronk, J. C., Mathew, C. G., Digweed, M., Buchwald, M. & Joenje, H. 2000b. Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *Am J Hum Genet*, 67, 1306-8.
- Deans, A. J. & West, S. C. 2011. DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer*, 11, 467-80.
- Decordier, I., Papine, A., Plas, G., Roesems, S., Vande Loock, K., Moreno-Palomo, J., Cemeli, E., Anderson, D., Fucic, A., Marcos, R., Soussaline, F. & Kirsch-Volders, M. 2009. Automated image analysis of cytokinesis-blocked micronuclei: an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring. *Mutagenesis*, 24, 85-93.
- Dewit, L. 1987. Combined treatment of radiation and cisdiamminedichloroplatinum (II): a review of experimental and clinical data. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 13, 403-26.
- Diaz, D., Scott, A., Carmichael, P., Shi, W. & Costales, C. 2007. Evaluation of an automated in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells. *Mutat Res*, 630, 1-13.
- Dimasi, J. A., Grabowski, H. G. & Hansen, R. W. 2016. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ*, 47, 20-33.
- Dong, Z. 2003. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res*, 523-524, 145-50.
- Du, W., Adam, Z., Rani, R., Zhang, X. & Pang, Q. 2008. Oxidative stress in Fanconi anemia hematopoiesis and disease progression. *Antioxid Redox Signal*, 10, 1909-21.
- Du, W., Erden, O. & Pang, Q. 2014. TNF-alpha signaling in Fanconi anemia. *Blood Cells Mol Dis*, 52, 2-11.
- Eiler, M. E., Frohnmayer, D., Frohnmayer, L., Larsen, K. & Olsen, J. 2008. Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. 3 ed. *Fanconi Anemia Research Fund, Inc. Eugene, OR*.
- Ekstrom, A. M., Serafini, M., Nyren, O., Wolk, A., Bosetti, C. & Bellocco, R. 2011. Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: results from a population-based study in Sweden. *Ann Oncol*, 22, 438-43.

- Elia, A. E., Wang, D. C., Willis, N. A., Boardman, A. P., Hajdu, I., Adeyemi, R. O., Lowry, E., Gygi, S. P., Scully, R. & Elledge, S. J. 2015. RFD3-Dependent Ubiquitination of RPA Regulates Repair at Stalled Replication Forks. *Mol Cell*, 60, 280-93.
- Ellis, L. M., Takahashi, Y., Liu, W. & Shaheen, R. M. 2000. Vascular endothelial growth factor in human colon cancer: biology and therapeutic implications. *Oncologist*, 5 Suppl 1, 11-5.
- Ema 2015. Sponsor's guide to an orphan designation (online). <http://www.ema.europa.eu>.
- Esashi, F., Christ, N., Gannon, J., Liu, Y., Hunt, T., Jasin, M. & West, S. C. 2005. CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature*, 434, 598-604.
- Evans, H. J., Neary, G. J. & Williamson, F. S. 1959. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 1, 216-29.
- Fakhry, C. & Gillison, M. L. 2006. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol*, 24, 2606-11.
- Fanconi, G. 1927. Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (pernizioses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische*, 117:257–280.
- Farzin, A., Davies, S. M., Smith, F. O., Filipovich, A., Hansen, M., Auerbach, A. D. & Harris, R. E. 2007. Matched sibling donor haematopoietic stem cell transplantation in Fanconi anaemia: an update of the Cincinnati Children's experience. *Br J Haematol*, 136, 633-40.
- Federico, M. B., Vallerga, M. B., Radl, A., Paviolo, N. S., Bocco, J. L., Di Giorgio, M., Soria, G. & Gottifredi, V. 2016. Chromosomal Integrity after UV Irradiation Requires FANCD2-Mediated Repair of Double Strand Breaks. *PLoS Genet*, 12, e1005792.
- Fenech, M., Jarvis, L. R. & Morley, A. A. 1988. Preliminary studies on scoring micronuclei by computerised image analysis. *Mutat Res*, 203, 33-8.
- Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*, 2, 1084-104.
- Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S. & Cavazzana-Calvo, M. 2010. 20 years of gene therapy for SCID. *Nat Immunol*, 11, 457-60.
- Forastiere, A. A., Hakes, T. B., Wittes, J. T. & Wittes, R. E. 1982. Cisplatin in the treatment of metastatic breast carcinoma: A prospective randomized trial of two dosage schedules. *Am J Clin Oncol*, 5, 243-7.
- Frecha, C., Costa, C., Negre, D., Amirache, F., Trono, D., Rio, P., Bueren, J., Cosset, F. L. & Verhoeyen, E. 2012. A novel lentiviral vector targets gene transfer into human hematopoietic stem cells in marrow from patients with bone marrow failure syndrome and in vivo in humanized mice. *Blood*, 119, 1139-50.
- Frohnmayr, D., Frohnmayr, L., Eva Guinan, E., Kennedy, T. & Larsen, K. 2014. Fanconi Anemia: Guidelines for Diagnosis and Management. 4 ed. *Fanconi Anemia Research Fund, Inc. Eugene, OR*.
- Futaki, M., Igarashi, T., Watanabe, S., Kajigaya, S., Tatsuguchi, A., Wang, J. & Liu, J. M. 2002. The FANCG Fanconi anemia protein interacts with CYP2E1: possible role in protection against oxidative DNA damage. *Carcinogenesis*, 23, 67-72.
- Gallmeier, E. & Kern, S. E. 2007. Targeting Fanconi anemia/BRCA2 pathway defects in cancer: the significance of preclinical pharmacogenomic models. *Clin Cancer Res*, 13, 4-10.
- Garaycochea, J. I., Crossan, G. P., Langevin, F., Daly, M., Arends, M. J. & Patel, K. J. 2012. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature*, 489, 571-5.
- Garbati, M. R., Hays, L. E., Rathbun, R. K., Jillette, N., Chin, K., Al-Dhalimy, M., Agarwal, A., Newell, A. E., Olson, S. B. & Bagby, G. C., Jr. 2016. Cytokine overproduction and crosslinker hypersensitivity are unlinked in Fanconi anemia macrophages. *J Leukoc Biol*, 99, 455-65.

- Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M. S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M. & D'andrea, A. D. 2001. Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell*, 7, 249-62.
- Garner, E. & Smogorzewska, A. 2011. Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway. *FEBS Lett*, 585, 2853-60.
- Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J. P., De Biasi, S., Roat, E., Bertoncetti, L., Cooper, E. L. & Cossarizza, A. 2011. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 591356.
- Gille, J. J., Floor, K., Kerkhoven, L., Ameziane, N., Joenje, H. & De Winter, J. P. 2012. Diagnosis of Fanconi Anemia: Mutation Analysis by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and PCR-Based Sanger Sequencing. *Anemia*, 2012, 603253.
- Giri, N., Batista, D. L., Alter, B. P. & Stratakis, C. A. 2007. Endocrine abnormalities in patients with Fanconi anemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 2624-31.
- Gong, Z., Kim, J. E., Leung, C. C., Glover, J. N. & Chen, J. 2010. BACH1/FANCI acts with TopBP1 and participates early in DNA replication checkpoint control. *Mol Cell*, 37, 438-46.
- Gonzalez-Murillo, A., Lozano, M. L., Alvarez, L., Jacome, A., Almarza, E., Navarro, S., Segovia, J. C., Hanenberg, H., Guenechea, G., Bueren, J. A. & Rio, P. 2010. Development of lentiviral vectors with optimized transcriptional activity for the gene therapy of patients with Fanconi anemia. *Hum Gene Ther*, 21, 623-30.
- Greider, C. W. 1996. Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem*, 65, 337-65.
- Grillari, J., Katinger, H. & Voglauer, R. 2007. Contributions of DNA interstrand cross-links to aging of cells and organisms. *Nucleic Acids Res*, 35, 7566-76.
- Guardiola, P., Socie, G., Li, X., Ribaud, P., Devergie, A., Esperou, H., Richard, P., Traineau, R., Janin, A. & Gluckman, E. 2004. Acute graft-versus-host disease in patients with Fanconi anemia or acquired aplastic anemia undergoing bone marrow transplantation from HLA-identical sibling donors: risk factors and influence on outcome. *Blood*, 103, 73-7.
- Guenechea, G., Segovia, J. C. & Bueren, J. A. 2009. Immunomagnetic enrichment of human and mouse hematopoietic stem cells for gene therapy applications. *Methods Mol Biol*, 506, 1-11.
- Gurtan, A. M. & D'andrea, A. D. 2006. Dedicated to the core: understanding the Fanconi anemia complex. *DNA Repair (Amst)*, 5, 1119-25.
- Haber, J. E. 2000. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet*, 16, 259-64.
- Hadjur, S., Ung, K., Wadsworth, L., Dimmick, J., Rajcan-Separovic, E., Scott, R. W., Buchwald, M. & Jirik, F. R. 2001. Defective hematopoiesis and hepatic steatosis in mice with combined deficiencies of the genes encoding Fancc and Cu/Zn superoxide dismutase. *Blood*, 98, 1003-11.
- Han, D., Handelman, G., Marcocci, L., Sen, C. K., Roy, S., Kobuchi, H., Tritschler, H. J., Flohe, L. & Packer, L. 1997. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors*, 6, 321-38.
- Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. & Blasco, M. A. 1999. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J Cell Biol*, 144, 589-601.
- 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., Lobitz, S., Williams, D. A. & Auerbach, A. D. 2002. Phenotypic correction of primary Fanconi anemia T cells with retroviral vectors as a diagnostic tool. *Exp Hematol*, 30, 410-20.
- Hanson, H., Mathew, C. G., Docherty, Z. & Mackie Ogilvie, C. 2001. Telomere shortening in Fanconi anaemia demonstrated by a direct FISH approach. *Cytogenet Cell Genet*, 93, 203-6.
- Harper, P. 2002. Current clinical practices for ovarian cancers. *Semin Oncol*, 29, 3-6.

- Helleday, T., Bryant, H. E. & Schultz, N. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy. *Cell Cycle*, 4, 1176-8.
- Herrera, E., Samper, E., Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Lee, H. W. & Blasco, M. A. 1999. Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J*, 18, 2950-60.
- Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 195-201.
- Hira, A., Yoshida, K., Sato, K., Okuno, Y., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Shimamoto, A., Tahara, H., Ito, E., Kojima, S., Kurumizaka, H., Ogawa, S., Takata, M., Yabe, H. & Yabe, M. 2015. Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. *Am J Hum Genet*, 96, 1001-7.
- Ho, G. P., Margossian, S., Taniguchi, T. & D'andrea, A. D. 2006. Phosphorylation of FANCD2 on two novel sites is required for mitomycin C resistance. *Mol Cell Biol*, 26, 7005-15.
- Houghtaling, S., Timmers, C., Noll, M., Finegold, M. J., Jones, S. N., Meyn, M. S. & Grompe, M. 2003. Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes Dev*, 17, 2021-35.
- Howlett, N. G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., Ikeda, H., Fox, E. A. & D'andrea, A. D. 2002. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*, 297, 606-9.
- Huang, Y., Leung, J. W., Lowery, M., Matsushita, N., Wang, Y., Shen, X., Huong, D., Takata, M., Chen, J. & Li, L. 2014. Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. *Cell Rep*, 7, 1849-57.
- Huck, K., Hanenberg, H., Nurnberger, W., Dilloo, D., Burdach, S., Gobel, U. & Laws, H. J. 2008. Favourable long-term outcome after matched sibling transplantation for Fanconi anemia (FA) and in vivo T-cell depletion. *Klin Padiatr*, 220, 147-52.
- Ishiai, M., Kitao, H., Smogorzewska, A., Tomida, J., Kinomura, A., Uchida, E., Saberi, A., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Tashiro, S., Elledge, S. J. & Takata, M. 2008. FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 1138-46.
- Jacome, A., Navarro, S., Rio, P., Yanez, R. M., Gonzalez-Murillo, A., Lozano, M. L., Lamana, M. L., Sevilla, J., Olive, T., Diaz-Heredia, C., Badell, I., Estella, J., Madero, L., Guenechea, G., Casado, J., Segovia, J. C. & Bueren, J. A. 2009. Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients. *Mol Ther*, 17, 1083-92.
- Jacquemont, C., Simon, J. A., D'andrea, A. D. & Taniguchi, T. 2012. Non-specific chemical inhibition of the Fanconi anemia pathway sensitizes cancer cells to cisplatin. *Mol Cancer*, 11, 26.
- Jaime-Perez, J. C., Colunga-Pedraza, P. R., Gomez-Ramirez, C. D., Gutierrez-Aguirre, C. H., Cantu-Rodriguez, O. G., Tarin-Arzaga, L. C. & Gomez-Almaguer, D. 2011. Danazol as first-line therapy for aplastic anemia. *Ann Hematol*, 90, 523-7.
- Joenje, H., Arwert, F., Eriksson, A. W., De Koning, H. & Oostra, A. B. 1981. Oxygen-dependence of chromosomal aberrations in Fanconi's anaemia. *Nature*, 290, 142-3.
- Joenje, H. & Patel, K. J. 2001. The emerging genetic and molecular basis of Fanconi anaemia. *Nat Rev Genet*, 2, 446-57.
- Joksic, I., Vujic, D., Guc-Scekic, M., Leskovic, A., Petrovic, S., Ojani, M., Trujillo, J. P., Surralles, J., Zivkovic, M., Stankovic, A., Slijepcevic, P. & Joksic, G. 2012. Dysfunctional telomeres in primary cells from Fanconi anemia FANCD2 patients. *Genome Integr*, 3, 6.
- Jun, D. W., Hwang, M., Kim, H. J., Hwang, S. K., Kim, S. & Lee, C. H. 2013. Ouabain, a cardiac glycoside, inhibits the Fanconi anemia/BRCA pathway activated by DNA interstrand cross-linking agents. *PLoS One*, 8, e75905.
- Kee, Y., Kim, J. M. & D'andrea, A. D. 2009. Regulated degradation of FANCM in the Fanconi anemia pathway during mitosis. *Genes Dev*, 23, 555-60.

- Kennedy, R. D. & D'andrea, A. D. 2005. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev*, 19, 2925-40.
- Kim, H. & D'andrea, A. D. 2012. Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Genes Dev*, 26, 1393-408.
- Kim, J. M., Kee, Y., Gurtan, A. & D'andrea, A. D. 2008. Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. *Blood*, 111, 5215-22.
- Kim, Y., Lach, F. P., Desetty, R., Hanenberg, H., Auerbach, A. D. & Smogorzewska, A. 2011. Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat Genet*, 43, 142-6.
- King, G. & Holmes, R. 1998. Human ocular aldehyde dehydrogenase isozymes: distribution and properties as major soluble proteins in cornea and lens. *J Exp Zool*, 282, 12-7.
- Kitao, H. & Takata, M. 2011. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *Int J Hematol*, 93, 417-24.
- Knies, K., Inano, S., Ramirez, M. J., Ishiai, M., Surralles, J., Takata, M. & Schindler, D. 2017. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFW3 cause Fanconi anemia. *J Clin Invest*, 127, 3013-3027.
- Kobori, M., Masumoto, S., Akimoto, Y. & Takahashi, Y. 2009. Dietary quercetin alleviates diabetic symptoms and reduces streptozotocin-induced disturbance of hepatic gene expression in mice. *Mol Nutr Food Res*, 53, 859-68.
- Kruyt, F. A., Hoshino, T., Liu, J. M., Joseph, P., Jaiswal, A. K. & Youssoufian, H. 1998. Abnormal microsomal detoxification implicated in Fanconi anemia group C by interaction of the FAC protein with NADPH cytochrome P450 reductase. *Blood*, 92, 3050-6.
- Kunitoh, S., Imaoka, S., Hiroi, T., Yabusaki, Y., Monna, T. & Funae, Y. 1997. Acetaldehyde as well as ethanol is metabolized by human CYP2E1. *J Pharmacol Exp Ther*, 280, 527-32.
- Kutler, D. I., Singh, B., Satagopan, J., Batish, S. D., Berwick, M., Giampietro, P. F., Hanenberg, H. & Auerbach, A. D. 2003a. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood*, 101, 1249-56.
- Kutler, D. I., Auerbach, A. D., Satagopan, J., Giampietro, P. F., Batish, S. D., Huvos, A. G., Goberdhan, A., Shah, J. P. & Singh, B. 2003b. High incidence of head and neck squamous cell carcinoma in patients with Fanconi anemia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129, 106-12.
- Lam, T. K., Rotunno, M., Lubin, J. H., Wacholder, S., Consonni, D., Pesatori, A. C., Bertazzi, P. A., Chanock, S. J., Burdette, L., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Caporaso, N. E., Subar, A. F. & Landi, M. T. 2010. Dietary quercetin, quercetin-gene interaction, metabolic gene expression in lung tissue and lung cancer risk. *Carcinogenesis*, 31, 634-42.
- Langevin, F., Crossan, G. P., Rosado, I. V., Arends, M. J. & Patel, K. J. 2011. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature*, 475, 53-8.
- Lee, H. W., Blasco, M. A., Gottlieb, G. J., Horner, J. W., 2nd, Greider, C. W. & Depinho, R. A. 1998. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*, 392, 569-74.
- Lee, J., Shin, J. S., Park, J. Y., Kwon, D., Choi, S. J., Kim, S. J. & Choi, I. H. 2003. p38 mitogen-activated protein kinase modulates expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induced by interferon-gamma in fetal brain astrocytes. *J Neurosci Res*, 74, 884-90.
- Lensch, M. W., Rathbun, R. K., Olson, S. B., Jones, G. R. & Bagby, G. C., Jr. 1999. Selective pressure as an essential force in molecular evolution of myeloid leukemic clones: a view from the window of Fanconi anemia. *Leukemia*, 13, 1784-9.
- Leteurtre, F., Li, X., Guardiola, P., Le Roux, G., Sergere, J. C., Richard, P., Carosella, E. D. & Gluckman, E. 1999. Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia. *Br J Haematol*, 105, 883-93.
- Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B. C., De Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W. W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Rooimans, M. A., Pals, G., Arwert, F., Mathew, C. G., Zdzienicka, M. Z., Hiom, K., De Winter, J. P. & Joenje, H. 2005. The DNA

- helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet*, 37, 934-5.
- Levrn, O., Attwooll, C., Henry, R. T., Milton, K. L., Neveling, K., Rio, P., Batish, S. D., Kalb, R., Velleuer, E., Barral, S., Ott, J., Petrini, J., Schindler, D., Hanenberg, H. & Auerbach, A. D. 2005. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet*, 37, 931-3.
- Li, J., Sejas, D. P., Zhang, X., Qiu, Y., Nattamai, K. J., Rani, R., Rathbun, K. R., Geiger, H., Williams, D. A., Bagby, G. C. & Pang, Q. 2007. TNF-alpha induces leukemic clonal evolution ex vivo in Fanconi anemia group C murine stem cells. *J Clin Invest*, 117, 3283-95.
- Li, J., Sipple, J., Maynard, S., Mehta, P. A., Rose, S. R., Davies, S. M. & Pang, Q. 2012. Fanconi anemia links reactive oxygen species to insulin resistance and obesity. *Antioxid Redox Signal*, 17, 1083-98.
- Li, X., Le Beau, M. M., Ciccone, S., Yang, F. C., Freie, B., Chen, S., Yuan, J., Hong, P., Orazi, A., Haneline, L. S. & Clapp, D. W. 2005. Ex vivo culture of Fancc^{-/-} stem/progenitor cells predisposes cells to undergo apoptosis, and surviving stem/progenitor cells display cytogenetic abnormalities and an increased risk of malignancy. *Blood*, 105, 3465-71.
- Liang, C. C., Zhan, B., Yoshikawa, Y., Haas, W., Gygi, S. P. & Cohn, M. A. 2015. UHRF1 is a sensor for DNA interstrand crosslinks and recruits FANCD2 to initiate the Fanconi anemia pathway. *Cell Rep*, 10, 1947-56.
- Lieber, M. R. & Wilson, T. E. 2010. SnapShot: Nonhomologous DNA end joining (NHEJ). *Cell*, 142, 496-496 e1.
- Liu, G. H., Suzuki, K., Li, M., Qu, J., Montserrat, N., Tarantino, C., Gu, Y., Yi, F., Xu, X., Zhang, W., Ruiz, S., Plongthongkum, N., Zhang, K., Masuda, S., Nivet, E., Tsunekawa, Y., Soligalla, R. D., Goebel, A., Aizawa, E., Kim, N. Y., Kim, J., Dubova, I., Li, Y., Ren, R., Benner, C., Del Sol, A., Bueren, J., Trujillo, J. P., Surrallés, J., Cappelli, E., Dufour, C., Esteban, C. R. & Belmonte, J. C. I. 2014. Modelling Fanconi anemia pathogenesis and therapeutics using integration-free patient-derived iPSCs. *Nat Commun*, 5, 4330.
- Lo Ten Foe, J. R., Rooimans, M. A., Bosnoyan-Collins, L., Alon, N., Wijker, M., Parker, L., Lightfoot, J., Carreau, M., Callen, D. F., Savoia, A., Cheng, N. C., Van Berkel, C. G., Strunk, M. H., Gille, J. J., Pals, G., Kruyt, F. A., Pronk, J. C., Arwert, F., Buchwald, M. & Joenje, H. 1996. Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet*, 14, 320-3.
- Lo Ten Foe, J. R., Kwee, M. L., Rooimans, M. A., Oostra, A. B., Veerman, A. J., Van Weel, M., Pauli, R. M., Shahidi, N. T., Dokal, I., Roberts, I., Altay, C., Gluckman, E., Gibson, R. A., Mathew, C. G., Arwert, F. & Joenje, H. 1997. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. *Eur J Hum Genet*, 5, 137-48.
- Lobitz, S. & Velleuer, E. 2006. Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. *Nat Rev Cancer*, 6, 893-8.
- Lowenthal, R. M. & Eaton, K. 1996. Toxicity of chemotherapy. *Hematol Oncol Clin North Am*, 10, 967-90.
- Lukamowicz, M., Kirsch-Volders, M., Suter, W. & Elhajouji, A. 2011. In vitro primary human lymphocyte flow cytometry based micronucleus assay: simultaneous assessment of cell proliferation, apoptosis and MN frequency. *Mutagenesis*, 26, 763-70.
- Luo, J., Solimini, N. L. & Elledge, S. J. 2009. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*, 136, 823-37.
- Machida, Y. J., Machida, Y., Chen, Y., Gurtan, A. M., Kupfer, G. M., D'andrea, A. D. & Dutta, A. 2006. UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation. *Mol Cell*, 23, 589-96.
- Macmillan, M. L. & Wagner, J. E. 2010. Haematopoietic cell transplantation for Fanconi anaemia - when and how? *Br J Haematol*, 149, 14-21.

- Macmillan, M. L., Defor, T. E., Young, J. A., Dusenbery, K. E., Blazar, B. R., Slungaard, A., Zierhut, H., Weisdorf, D. J. & Wagner, J. E. 2015. Alternative donor hematopoietic cell transplantation for Fanconi anemia. *Blood*, 125, 3798-804.
- Marietta, C., Thompson, L. H., Lamerdin, J. E. & Brooks, P. J. 2009. Acetaldehyde stimulates FANCD2 monoubiquitination, H2AX phosphorylation, and BRCA1 phosphorylation in human cells in vitro: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Mutat Res*, 664, 77-83.
- Matta, A. & Ralhan, R. 2009. Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol*, 1, 6.
- Mazon, G., Mimitou, E. P. & Symington, L. S. 2010. SnapShot: Homologous recombination in DNA double-strand break repair. *Cell*, 142, 646, 646 e1.
- 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., Eddy, E. M., Davis, B. J. & Wiseman, R. W. 2002. Cancer susceptibility of mice with a homozygous deletion in the COOH-terminal domain of the Brca2 gene. *Cancer Res*, 62, 990-4.
- 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., Hoatlin, M. E., Joenje, H. & Wang, W. 2003. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet*, 35, 165-70.
- Meetei, A. R., Levitus, M., Xue, Y., Medhurst, A. L., Zwaan, M., Ling, C., Rooimans, M. A., Bier, P., Hoatlin, M., Pals, G., De Winter, J. P., Wang, W. & Joenje, H. 2004. X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet*, 36, 1219-24.
- Meetei, A. R., Medhurst, A. L., Ling, C., Xue, Y., Singh, T. R., Bier, P., Steltenpool, J., Stone, S., Dokal, I., Mathew, C. G., Hoatlin, M., Joenje, H., De Winter, J. P. & Wang, W. 2005. A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet*, 37, 958-63.
- Mehta, P. A. & Tolar, J. 1993. Fanconi Anemia. In: Pagon, R. A., Adam, M. P., Ardinger, H. H., Wallace, S. E., Amemiya, A., Bean, L. J. H., Bird, T. D., Ledbetter, N., Mefford, H. C., Smith, R. J. H. & Stephens, K. (eds.) *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
- Mendelsohn, J. & Baselga, J. 2000. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*, 19, 6550-65.
- Miles, S. L., Mcfarland, M. & Niles, R. M. 2014. Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease. *Nutr Rev*, 72, 720-34.
- Moldovan, G. L. & D'andrea, A. D. 2009. How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet*, 43, 223-49.
- Moldvay, J., Schaff, Z. & Lapis, K. 1991. Hepatocellular carcinoma in Fanconi's anemia treated with androgen and corticosteroid. *Zentralbl Pathol*, 137, 167-70.
- Montes De Oca, R., Andreassen, P. R., Margossian, S. P., Gregory, R. C., Taniguchi, T., Wang, X., Houghtaling, S., Grompe, M. & D'andrea, A. D. 2005. Regulated interaction of the Fanconi anemia protein, FANCD2, with chromatin. *Blood*, 105, 1003-9.
- Morabito, A., De Maio, E., Di Maio, M., Normanno, N. & Perrone, F. 2006. Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. *Oncologist*, 11, 753-64.
- Mukhopadhyay, S. S., Leung, K. S., Hicks, M. J., Hastings, P. J., Youssoufian, H. & Plon, S. E. 2006. Defective mitochondrial peroxiredoxin-3 results in sensitivity to oxidative stress in Fanconi anemia. *J Cell Biol*, 175, 225-35.
- Muller, L. U. & Williams, D. A. 2009. Finding the needle in the hay stack: hematopoietic stem cells in Fanconi anemia. *Mutat Res*, 668, 141-9.
- Mulvihill, J. J., Ridolfi, R. L., Schultz, F. R., Borzy, M. S. & Houghton, P. B. 1975. Hepatic adenoma in Fanconi anemia treated with oxymetholone. *J Pediatr*, 87, 122-4.
- Neubauer, R., Wolkart, G., Opelt, M., Schwarzenegger, C., Hofinger, M., Neubauer, A., Kollau, A., Schmidt, K., Schrammel, A. & Mayer, B. 2015. Aldehyde dehydrogenase-

- independent bioactivation of nitroglycerin in porcine and bovine blood vessels. *Biochem Pharmacol*, 93, 440-8.
- Neveling, K., Endt, D., Hoehn, H. & Schindler, D. 2009. Genotype-phenotype correlations in Fanconi anemia. *Mutat Res*, 668, 73-91.
- Niedernhofer, L. J., Odijk, H., Budzowska, M., Van Drunen, E., Maas, A., Theil, A. F., De Wit, J., Jaspers, N. G., Beverloo, H. B., Hoeijmakers, J. H. & Kanaar, R. 2004. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, 24, 5776-87.
- Niedernhofer, L. J., Lalai, A. S. & Hoeijmakers, J. H. 2005. Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. *Cell*, 123, 1191-8.
- Nijman, S. M., Huang, T. T., Dirac, A. M., Brummelkamp, T. R., Kerkhoven, R. M., D'andrea, A. D. & Bernards, R. 2005. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*, 17, 331-9.
- Nilubol, N., Zhang, L., Shen, M., Zhang, Y. Q., He, M., Austin, C. P. & Kebebew, E. 2012. Four clinically utilized drugs were identified and validated for treatment of adrenocortical cancer using quantitative high-throughput screening. *J Transl Med*, 10, 198.
- Nusse, M. & Kramer, J. 1984. Flow cytometric analysis of micronuclei found in cells after irradiation. *Cytometry*, 5, 20-5.
- Nusse, M., Kramer, M., Viaggi, S., Bartsch, A. & Bonatti, S. 1987. Antikinetochore antibodies and flow karyotyping: new techniques to detect aneuploidy in mammalian cells induced by ionizing radiation and chemicals. *Mol Toxicol*, 1, 393-405.
- Nusse, M., Beisker, W., Kramer, J., Miller, B. M., Schreiber, G. A., Viaggi, S., Weller, E. M. & Wessels, J. M. 1994. Measurement of micronuclei by flow cytometry. *Methods Cell Biol*, 42 Pt B, 149-58.
- Olsen, C. M., Green, A. C., Nagle, C. M., Jordan, S. J., Whiteman, D. C., Bain, C. J., Webb, P. M., Australian Cancer Study, G. & The Australian Ovarian Cancer Study, G. 2008. Epithelial ovarian cancer: testing the 'androgens hypothesis'. *Endocr Relat Cancer*, 15, 1061-8.
- Oostra, A. B., Nieuwint, A. W., Joenje, H. & De Winter, J. P. 2012. Diagnosis of fanconi anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia*, 2012, 238731.
- Ozenne, V., Paradis, V., Vullierme, M. P., Vilgrain, V., Leblanc, T., Belghiti, J., Imbert, A., Valla, D. C. & Degos, F. 2008. Liver tumours in patients with Fanconi anaemia: a report of three cases. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 20, 1036-9.
- Pace, P., Johnson, M., Tan, W. M., Mosedale, G., Sng, C., Hoatlin, M., De Winter, J., Joenje, H., Gergely, F. & Patel, K. J. 2002. FANCE: the link between Fanconi anaemia complex assembly and activity. *EMBO J*, 21, 3414-23.
- Pace, P., Mosedale, G., Hodson, M. R., Rosado, I. V., Sivasubramaniam, M. & Patel, K. J. 2010. Ku70 corrupts DNA repair in the absence of the Fanconi anemia pathway. *Science*, 329, 219-23.
- Pagano, G., Degan, P., D'ischia, M., Kelly, F. J., Nobili, B., Pallardo, F. V., Youssoufian, H. & Zatterale, A. 2005. Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *Eur J Haematol*, 75, 93-100.
- Pang, Q. & Andreassen, P. R. 2009. Fanconi anemia proteins and endogenous stresses. *Mutat Res*, 668, 42-53.
- Pappa, A., Estey, T., Manzer, R., Brown, D. & Vasiliou, V. 2003. Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *Biochem J*, 376, 615-23.
- Park, J. Y., Zhang, F. & Andreassen, P. R. 2014. PALB2: the hub of a network of tumor suppressors involved in DNA damage responses. *Biochim Biophys Acta*, 1846, 263-75.
- Park, J. Y., Virts, E. L., Jankowska, A., Wiek, C., Othman, M., Chakraborty, S. C., Vance, G. H., Alkuraya, F. S., Hanenberg, H. & Andreassen, P. R. 2016. Complementation of hypersensitivity to DNA interstrand crosslinking agents demonstrates that XRCC2 is a Fanconi anaemia gene. *J Med Genet*, 53, 672-680.

- Park, S. J., Ciccone, S. L., Beck, B. D., Hwang, B., Freie, B., Clapp, D. W. & Lee, S. H. 2004. Oxidative stress/damage induces multimerization and interaction of Fanconi anemia proteins. *J Biol Chem*, 279, 30053-9.
- Parmar, K., D'andrea, A. & Niedernhofer, L. J. 2009. Mouse models of Fanconi anemia. *Mutat Res*, 668, 133-40.
- Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R. & Schacht, A. L. 2010. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov*, 9, 203-14.
- Perez-Miller, S., Younus, H., Vanam, R., Chen, C. H., Mochly-Rosen, D. & Hurley, T. D. 2010. Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 159-64.
- Pichierri, P. & Rosselli, F. 2004. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR-CHK1 and ATR-NBS1-FANCD2 pathways. *EMBO J*, 23, 1178-87.
- Plavetic, N. D., Baric, M., Solaric, M. & Vrbanec, D. 2013. [New primary malignancies after breast cancer diagnosis: interplay of genetics, risk factors and treatment modalities]. *Lijec Vjesn*, 135, 27-33.
- Ponte, F., Carvalho, F. & Porto, B. 2011. Protective effect of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against the acute toxicity of diepoxybutane to human lymphocytes. *Toxicology*, 289, 52-8.
- Ponte, F., Sousa, R., Fernandes, A. P., Goncalves, C., Barbot, J., Carvalho, F. & Porto, B. 2012. Improvement of genetic stability in lymphocytes from Fanconi anemia patients through the combined effect of alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine. *Orphanet J Rare Dis*, 7, 28.
- Prahalathan, C., Selvakumar, E., Varalakshmi, P., Kumarasamy, P. & Saravanan, R. 2006. Salubrious effects of lipoic acid against adriamycin-induced clastogenesis and apoptosis in Wistar rat bone marrow cells. *Toxicology*, 222, 225-32.
- Psyrrri, A., Boutati, E. & Karageorgopoulou, S. 2011. Human papillomavirus in head and neck cancers: biology, prognosis, hope of treatment, and vaccines. *Anticancer Drugs*, 22, 586-90.
- Puiu, M. & Dan, D. 2010. Rare diseases, from European resolutions and recommendations to actual measures and strategies. *Maedica (Buchar)*, 5, 128-31.
- Qiao, F., Mi, J., Wilson, J. B., Zhi, G., Bucheimer, N. R., Jones, N. J. & Kupfer, G. M. 2004. Phosphorylation of fanconi anemia (FA) complementation group G protein, FANCG, at serine 7 is important for function of the FA pathway. *J Biol Chem*, 279, 46035-45.
- Rackoff, W. R., Orazi, A., Robinson, C. A., Cooper, R. J., Alter, B. P., Freedman, M. H., Harris, R. E. & Williams, D. A. 1996. Prolonged administration of granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) to patients with Fanconi anemia: a pilot study. *Blood*, 88, 1588-93.
- Rajendra, E., Oestergaard, V. H., Langevin, F., Wang, M., Dornan, G. L., Patel, K. J. & Passmore, L. A. 2014. The genetic and biochemical basis of FANCD2 monoubiquitination. *Mol Cell*, 54, 858-69.
- Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, M., Wurm, M., Batish, S. D., Lach, F. P., Yetgin, S., Neitzel, H., Ariffin, H., Tischkowitz, M., Mathew, C. G., Auerbach, A. D. & Rahman, N. 2007. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet*, 39, 162-4.
- Reliene, R. & Schiestl, R. H. 2006. Antioxidant N-acetyl cysteine reduces incidence and multiplicity of lymphoma in Atm deficient mice. *DNA Repair (Amst)*, 5, 852-9.
- Rio, P., Navarro, S., Guenechea, G., Sanchez-Dominguez, R., Lamana, M. L., Yanez, R., Casado, J. A., Mehta, P. A., Pujol, M. R., Surralles, J., Charrier, S., Galy, A., Segovia, J. C., Diaz De Heredia, C., Sevilla, J. & Bueren, J. 2017. Engraftment and in vivo proliferation advantage of gene corrected mobilized CD34+ cells from Fanconi anemia patients. *Blood*.

- Riveros-Rosas, H., Julian-Sanchez, A. & Pina, E. 1997. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch Med Res*, 28, 453-71.
- Rodriguez, A., Torres, L., Juarez, U., Sosa, D., Azpeitia, E., Garcia-De Teresa, B., Cortes, E., Ortiz, R., Salazar, A. M., Ostrosky-Wegman, P., Mendoza, L. & Frias, S. 2015. Fanconi anemia cells with unrepaired DNA damage activate components of the checkpoint recovery process. *Theor Biol Med Model*, 12, 19.
- Roman, D., Locher, F., Suter, W., Cordier, A. & Bobadilla, M. 1998. Evaluation of a new procedure for the flow cytometric analysis of in vitro, chemically induced micronuclei in V79 cells. *Environ Mol Mutagen*, 32, 387-96.
- Rosado, I. V., Langevin, F., Crossan, G. P., Takata, M. & Patel, K. J. 2011. Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. *Nat Struct Mol Biol*, 18, 1432-4.
- Rose, S. R., Kim, M. O., Korbee, L., Wilson, K. A., Ris, M. D., Eyal, O., Sherafat-Kazemzadeh, R., Bollepalli, S., Harris, R., Jeng, M. R., Williams, D. A. & Smith, F. O. 2014. Oxandrolone for the treatment of bone marrow failure in Fanconi anemia. *Pediatr Blood Cancer*, 61, 11-9.
- Rosenberg, P. S., Greene, M. H. & Alter, B. P. 2003. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. *Blood*, 101, 822-6.
- Rosenberg, P. S., Socie, G., Alter, B. P. & Gluckman, E. 2005. Risk of head and neck squamous cell cancer and death in patients with Fanconi anemia who did and did not receive transplants. *Blood*, 105, 67-73.
- Rosenberg, P. S., Tamary, H. & Alter, B. P. 2011. How high are carrier frequencies of rare recessive syndromes? Contemporary estimates for Fanconi Anemia in the United States and Israel. *Am J Med Genet A*, 155A, 1877-83.
- Saadatzadeh, M. R., Bijangi-Vishehsaraei, K., Hong, P., Bergmann, H. & Haneline, L. S. 2004. Oxidant hypersensitivity of Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on a redox-regulated apoptotic pathway. *J Biol Chem*, 279, 16805-12.
- Saadatzadeh, M. R., Bijangi-Vishehsaraei, K., Kapur, R. & Haneline, L. S. 2009. Distinct roles of stress-activated protein kinases in Fanconi anemia-type C-deficient hematopoiesis. *Blood*, 113, 2655-60.
- Sareen, A., Chaudhury, I., Adams, N. & Soback, A. 2012. Fanconi anemia proteins FANCD2 and FANCI exhibit different DNA damage responses during S-phase. *Nucleic Acids Res*, 40, 8425-39.
- Sawyer, S. L., Tian, L., Kahkonen, M., Schwartzentruber, J., Kircher, M., University of Washington Centre for Mendelian, G., Consortium, F. C., Majewski, J., Dymont, D. A., Innes, A. M., Boycott, K. M., Moreau, L. A., Moilanen, J. S. & Greenberg, R. A. 2015. Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. *Cancer Discov*, 5, 135-42.
- Scharer, O. D. 2005. DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. *Chembiochem*, 6, 27-32.
- Scheckenbach, K., Morgan, M., Filger-Brillinger, J., Sandmann, M., Strimling, B., Scheurlen, W., Schindler, D., Gobel, U. & Hanenberg, H. 2012a. Treatment of the bone marrow failure in Fanconi anemia patients with danazol. *Blood Cells Mol Dis*, 48, 128-31.
- Scheckenbach, K., Wagenmann, M., Freund, M., Schipper, J. & Hanenberg, H. 2012b. Squamous cell carcinomas of the head and neck in Fanconi anemia: risk, prevention, therapy, and the need for guidelines. *Klin Padiatr*, 224, 132-8.
- Schindler, D. & Hoehn, H. 1988. Fanconi anemia mutation causes cellular susceptibility to ambient oxygen. *Am J Hum Genet*, 43, 429-35.
- Schroeder, T. M. 1966. [Cytogenetic and cytologic findings in enzymopenic panmyelopathies and pancytopenias. Familial myelopathy of Fanconi, glutathione-reductase deficiency anemia and megaloblastic B12 deficiency anemia]. *Humangenetik*, 2, 287-316.

- Schuler, D., Kiss, A. & Fabian, F. 1969. [Chromosome studies in Fanconi's anemia]. *Orv Hetil*, 110, 713-20 passim.
- Schwab, R. A., Blackford, A. N. & Niedzwiedz, W. 2010. ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells. *EMBO J*, 29, 806-18.
- Shen, M., Zhang, Y., Saba, N., Austin, C. P., Wiestner, A. & Auld, D. S. 2013. Identification of therapeutic candidates for chronic lymphocytic leukemia from a library of approved drugs. *PLoS One*, 8, e75252.
- Sims, A. E., Spiteri, E., Sims, R. J., 3rd, Arita, A. G., Lach, F. P., Landers, T., Wurm, M., Freund, M., Neveling, K., Hanenberg, H., Auerbach, A. D. & Huang, T. T. 2007. FANCI is a second monoubiquitinated member of the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 564-7.
- Singh, T. R., Saro, D., Ali, A. M., Zheng, X. F., Du, C. H., Killen, M. W., Sachpatzidis, A., Wahengbam, K., Pierce, A. J., Xiong, Y., Sung, P. & Meetei, A. R. 2010. MHF1-MHF2, a histone-fold-containing protein complex, participates in the Fanconi anemia pathway via FANCM. *Mol Cell*, 37, 879-86.
- Skaper, S. D., Fabris, M., Ferrari, V., Dalle Carbonare, M. & Leon, A. 1997. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Radic Biol Med*, 22, 669-78.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. & Boyd, M. R. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, 82, 1107-12.
- 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. & Elledge, S. J. 2007. Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. *Cell*, 129, 289-301.
- Somyajit, K., Subramanya, S. & Nagaraju, G. 2012. Distinct roles of FANCO/RAD51C protein in DNA damage signaling and repair: implications for Fanconi anemia and breast cancer susceptibility. *J Biol Chem*, 287, 3366-80.
- Soria, J. C., Fayette, J. & Armand, J. P. 2004. Molecular targeting: targeting angiogenesis in solid tumors. *Ann Oncol*, 15 Suppl 4, iv223-7.
- Soulier, J. 2011. Fanconi anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, 492-7.
- Soulieres, D., Senzer, N. N., Vokes, E. E., Hidalgo, M., Agarwala, S. S. & Siu, L. L. 2004. Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck. *J Clin Oncol*, 22, 77-85.
- Spanier, G., Pohl, F., Giese, T., Meier, J. K., Koelbl, O. & Reichert, T. E. 2012. Fatal course of tonsillar squamous cell carcinoma associated with Fanconi anaemia: a mini review. *J Craniomaxillofac Surg*, 40, 510-5.
- Speit, G., Schutz, P. & Merk, O. 2000. Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines. *Mutagenesis*, 15, 85-90.
- Strathdee, C. A., Gavish, H., Shannon, W. R. & Buchwald, M. 1992. Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature*, 356, 763-7.
- Sun, S. Y. 2010. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. *Cancer Biol Ther*, 9, 109-10.
- Sun, W., Zheng, W. & Simeonov, A. 2017. Drug discovery and development for rare genetic disorders. *Am J Med Genet A*, 173, 2307-2322.
- Suwaki, N., Klare, K. & Tarsounas, M. 2011. RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 22, 898-905.
- Tan, I. B., Cutcutache, I., Zang, Z. J., Iqbal, J., Yap, S. F., Hwang, W., Lim, W. T., Teh, B. T., Rozen, S., Tan, E. H. & Tan, P. 2011. Fanconi's anemia in adulthood: chemoradiation-induced

- bone marrow failure and a novel FANCA mutation identified by targeted deep sequencing. *J Clin Oncol*, 29, e591-4.
- Tian, Y., Paramasivam, M., Ghosal, G., Chen, D., Shen, X., Huang, Y., Akhter, S., Legerski, R., Chen, J., Seidman, M. M., Qin, J. & Li, L. 2015. UHRF1 contributes to DNA damage repair as a lesion recognition factor and nuclease scaffold. *Cell Rep*, 10, 1957-66.
- Timmers, C., Taniguchi, T., Hejna, J., Reifsteck, C., Lucas, L., Bruun, D., Thayer, M., Cox, B., Olson, S., D'andrea, A. D., Moses, R. & Grompe, M. 2001. Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell*, 7, 241-8.
- Tipping, A. J., Pearson, T., Morgan, N. V., Gibson, R. A., Kuyt, L. P., Havenga, C., Gluckman, E., Joenje, H., De Ravel, T., Jansen, S. & Mathew, C. G. 2001. Molecular and genealogical evidence for a founder effect in Fanconi anemia families of the Afrikaner population of South Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 5734-9.
- Tolar, J., Adair, J. E., Antoniou, M., Bartholomae, C. C., Becker, P. S., Blazar, B. R., Bueren, J., Carroll, T., Cavazzana-Calvo, M., Clapp, D. W., Dalgleish, R., Galy, A., Gaspar, H. B., Hanenberg, H., Von Kalle, C., Kiem, H. P., Lindeman, D., Naldini, L., Navarro, S., Renella, R., Rio, P., Sevilla, J., Schmidt, M., Verhoeven, E., Wagner, J. E., Williams, D. A. & Thrasher, A. J. 2011. Stem cell gene therapy for fanconi anemia: report from the 1st international Fanconi anemia gene therapy working group meeting. *Mol Ther*, 19, 1193-8.
- Tolar, J., Becker, P. S., Clapp, D. W., Hanenberg, H., De Heredia, C. D., Kiem, H. P., Navarro, S., Qasba, P., Rio, P., Schmidt, M., Sevilla, J., Verhoeven, E., Thrasher, A. J. & Bueren, J. 2012. Gene therapy for Fanconi anemia: one step closer to the clinic. *Hum Gene Ther*, 23, 141-4.
- Tome-Carneiro, J., Larrosa, M., Gonzalez-Sarrias, A., Tomas-Barberan, F. A., Garcia-Conesa, M. T. & Espin, J. C. 2013. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr Pharm Des*, 19, 6064-93.
- Touraine, R. L., Bertrand, Y., Foray, P., Gilly, J. & Philippe, N. 1993. Hepatic tumours during androgen therapy in Fanconi anaemia. *Eur J Pediatr*, 152, 691-3.
- Townsley, D. M., Dumitriu, B., Liu, D., Biancotto, A., Weinstein, B., Chen, C., Hardy, N., Mihalek, A. D., Lingala, S., Kim, Y. J., Yao, J., Jones, E., Gochuico, B. R., Heller, T., Wu, C. O., Calado, R. T., Scheinberg, P. & Young, N. S. 2016. Danazol Treatment for Telomere Diseases. *N Engl J Med*, 374, 1922-31.
- Traxler, P., Allegrini, P. R., Brandt, R., Brueggen, J., Cozens, R., Fabbro, D., Grosios, K., Lane, H. A., Mcsheehy, P., Mestan, J., Meyer, T., Tang, C., Wartmann, M., Wood, J. & Caravatti, G. 2004. AEE788: a dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res*, 64, 4931-41.
- Trujillo, J. P. & Surrallés, J. 2015. Savior siblings and Fanconi anemia: analysis of success rates from the family's perspective. *Genet Med*, 17, 935-8.
- Valastyan, S. & Weinberg, R. A. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275-92.
- Van Wassenhove, L. D., Mochly-Rosen, D. & Weinberg, K. I. 2016. Aldehyde dehydrogenase 2 in aplastic anemia, Fanconi anemia and hematopoietic stem cells. *Mol Genet Metab*, 119, 28-36.
- Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., Neveling, K., Endt, D., Kesterton, I., Autore, F., Fraternali, F., Freund, M., Hartmann, L., Grimwade, D., Roberts, R. G., Schaal, H., Mohammed, S., Rahman, N., Schindler, D. & Mathew, C. G. 2010. Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet*, 42, 406-9.
- Velazquez, I. & Alter, B. P. 2004. Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. *Am J Hematol*, 77, 257-67.

- Velleuer, E., Dietrich, R., Frohnmayer, A., Pomjanski, N., Hays, L. E. & Biesterfeld, S. 2017. Prevalence and clinical significance of visible oral lesions in patients with Fanconi Anemia at risk for head and neck cancer. *Curr Drug Targets*.
- Vercellini, P., Somigliana, E., Vigano, P., Abbiati, A., Barbara, G. & Crosignani, P. G. 2009. Endometriosis: current therapies and new pharmacological developments. *Drugs*, 69, 649-75.
- Wajnrajch, M. P., Gertner, J. M., Huma, Z., Popovic, J., Lin, K., Verlander, P. C., Batish, S. D., Giampietro, P. F., Davis, J. G., New, M. I. & Auerbach, A. D. 2001. Evaluation of growth and hormonal status in patients referred to the International Fanconi Anemia Registry. *Pediatrics*, 107, 744-54.
- Walter, D., Lier, A., Geiselhart, A., Thalheimer, F. B., Huntscha, S., Sobotta, M. C., Moehrl, B., Brocks, D., Bayindir, I., Kaschutnig, P., Muedder, K., Klein, C., Jauch, A., Schroeder, T., Geiger, H., Dick, T. P., Holland-Letz, T., Schmezer, P., Lane, S. W., Rieger, M. A., Essers, M. A., Williams, D. A., Trumpp, A. & Milsom, M. D. 2015. Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature*, 520, 549-52.
- Wang, A. T., Kim, T., Wagner, J. E., Conti, B. A., Lach, F. P., Huang, A. L., Molina, H., Sanborn, E. M., Zierhut, H., Cornes, B. K., Abhyankar, A., Sougnez, C., Gabriel, S. B., Auerbach, A. D., Kowalczykowski, S. C. & Smogorzewska, A. 2015. A Dominant Mutation in Human RAD51 Reveals Its Function in DNA Interstrand Crosslink Repair Independent of Homologous Recombination. *Mol Cell*, 59, 478-90.
- Wang, M., Xu, M., Long, Y., Fargue, S., Southall, N., Hu, X., Mckew, J. C., Danpure, C. J. & Zheng, W. 2016. High throughput cell-based assay for identification of glycolate oxidase inhibitors as a potential treatment for Primary Hyperoxaluria Type 1. *Sci Rep*, 6, 34060.
- Wang, W. 2007. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. *Nat Rev Genet*, 8, 735-48.
- Wang, X., Kennedy, R. D., Ray, K., Stuckert, P., Ellenberger, T. & D'andrea, A. D. 2007. Chk1-mediated phosphorylation of FANCE is required for the Fanconi anemia/BRCA pathway. *Mol Cell Biol*, 27, 3098-108.
- Wessels, J. M. & Nusse, M. 1995. Flow cytometric detection of micronuclei by combined staining of DNA and membranes. *Cytometry*, 19, 201-8.
- Whitney, M. A., Saito, H., Jakobs, P. M., Gibson, R. A., Moses, R. E. & Grompe, M. 1993. A common mutation in the FACC gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. *Nat Genet*, 4, 202-5.
- Whitney, M. A., Royle, G., Low, M. J., Kelly, M. A., Axthelm, M. K., Reifsteck, C., Olson, S., Braun, R. E., Heinrich, M. C., Rathbun, R. K., Bagby, G. C. & Grompe, M. 1996. Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene. *Blood*, 88, 49-58.
- Wu, Z. H. 2013. The concept and practice of Fanconi Anemia: from the clinical bedside to the laboratory bench. *Transl Pediatr*, 2, 112-9.
- Xia, B., Dorsman, J. C., Ameziane, N., De Vries, Y., Rooimans, M. A., Sheng, Q., Pals, G., Errami, A., Gluckman, E., Llera, J., Wang, W., Livingston, D. M., Joenje, H. & De Winter, J. P. 2007. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet*, 39, 159-61.
- Yan, Z., Delannoy, M., Ling, C., Dae, D., Osman, F., Muniandy, P. A., Shen, X., Oostra, A. B., Du, H., Steltenpool, J., Lin, T., Schuster, B., Decaillet, C., Stasiak, A., Stasiak, A. Z., Stone, S., Hoatlin, M. E., Schindler, D., Woodcock, C. L., Joenje, H., Sen, R., De Winter, J. P., Li, L., Seidman, M. M., Whitby, M. C., Myung, K., Constantinou, A. & Wang, W. 2010. A histone-fold complex and FANCM form a conserved DNA-remodeling complex to maintain genome stability. *Mol Cell*, 37, 865-78.
- Yang, Y., Kuang, Y., Montes De Oca, R., Hays, T., Moreau, L., Lu, N., Seed, B. & D'andrea, A. D. 2001. Targeted disruption of the murine Fanconi anemia gene, *Fancg/Xrcc9*. *Blood*, 98, 3435-40.

- Zhang, L., He, M., Zhang, Y., Nilubol, N., Shen, M. & Kebebew, E. 2012. Quantitative high-throughput drug screening identifies novel classes of drugs with anticancer activity in thyroid cancer cells: opportunities for repurposing. *J Clin Endocrinol Metab*, 97, E319-28.
- Zhang, Q. S., Eaton, L., Snyder, E. R., Houghtaling, S., Mitchell, J. B., Finegold, M., Van Waes, C. & Grompe, M. 2008. Tempol protects against oxidative damage and delays epithelial tumor onset in Fanconi anemia mice. *Cancer Res*, 68, 1601-8.
- Zhang, Q. S., Marquez-Loza, L., Sheehan, A. M., Watanabe-Smith, K., Eaton, L., Benedetti, E., Major, A., Schubert, K., Deater, M., Joseph, E. & Grompe, M. 2014. Evaluation of resveratrol and N-acetylcysteine for cancer chemoprevention in a Fanconi anemia murine model. *Pediatr Blood Cancer*, 61, 740-2.
- Zhang, Q. S., Tang, W., Deater, M., Phan, N., Marcogliese, A. N., Li, H., Al-Dhalimy, M., Major, A., Olson, S., Monnat, R. J., Jr. & Grompe, M. 2016. Metformin improves defective hematopoiesis and delays tumor formation in Fanconi anemia mice. *Blood*, 128, 2774-2784.
- Zhang, X. D. 2011. Illustration of SSMD, z score, SSMD*, z* score, and t statistic for hit selection in RNAi high-throughput screens. *J Biomol Screen*, 16, 775-85.
- Zheng, W., Thorne, N. & Mckew, J. C. 2013. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov Today*, 18, 1067-73.
- Zou, L. & Elledge, S. J. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300, 1542-8.

Annexos

8. Annexos

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
A																						
B		5-Iodo-A-85380 dihydrochloride		AG 555		Bacitracin		Benserazide hydrochloride		Bretylum tosylate		Butalbital										
C		Chlormezanone		Cidofovir (Vistide)		Cinchonidine		Dimaprit dihydrochloride		Dioxybenzone		DMNB										(DMSO 1 µM) U2OS KO
D		Estradiol		Ezetimibe (Zetia)		Forskolin		Glipizide		Helleday extra		Ibutilide fumarate										
E		Ifosfamide		JNJ 26854165 (Serdemetan)		Kynurenic acid		LY 320135		Monastrol		Palomid 529										
F		Phenylbutazone		PI 828		PIK-93		PNU 22394 hydrochloride		Procaine hydrochloride		Roflumilast (Daxas)										(DMSO 1µM) U2OS corrected
G		Salmeterol		SANT-1		SB-505124		Sulmazole		Thalidomide		Vemurafenib (PLX4032)										
H		Zatebradine hydrochloride																				
I		5-Iodo-A-85380 dihydrochloride		AG 555		Bacitracin		Benserazide hydrochloride		Bretylum tosylate		Butalbital										
J		Chlormezanone		Cidofovir (Vistide)		Cinchonidine		Dimaprit dihydrochloride		Dioxybenzone		DMNB										(DMSO 10 µM) U2OS KO
K		Estradiol		Ezetimibe (Zetia)		Forskolin		Glipizide		Helleday extra		Ibutilide fumarate										
L		Ifosfamide		JNJ 26854165 (Serdemetan)		Kynurenic acid		LY 320135		Monastrol		Palomid 529										
M		Phenylbutazone		PI 828		PIK-93		PNU 22394 hydrochloride		Procaine hydrochloride		Roflumilast (Daxas)										(DMSO 10 µM) U2OS corrected
N		Salmeterol		SANT-1		SB-505124		Sulmazole		Thalidomide		Vemurafenib (PLX4032)										
O		Zatebradine hydrochloride																				
P																						

1 µM
 10µM

Figura A1. Distribució dels compostos en la placa de validació dels compostos reactivadors de la ruta FA/BRCA. Les columnes 1, 23 i 24 i les files A i P no es van utilitzar pel plaueig cel·lular per evitar l'evaporació del medi. Es va utilitzar 1 placa amb 37 compostos diferents. Les files B-H contienien els fàrmacs a dosi 1 µM (5 nl/pou) i les files I-O els mateixos fàrmacs a dosi 10 µM (50 nl/pou). En les columnes 20, 21 i 22 es van es van plauejar únicament les cèl·lules U2OS FANCAcorrected-YFP-FANCD2 pel control positiu i les cèl·lules U2OS FANCA^{-/-}-YFP-FANCD2 pel control negatiu, sense cap fàrmac. Els triplicats es van realitzar en la mateixa placa.

	2	3	4	5	6	7	8	9
A								
B	API-2	Vatalanib			API-2	Vatalanib		
C	AZD2014	Vorinostat			AZD2014	Vorinostat		
D	Beta-Escin	(DMSO 1uM) MMC 0			Beta-Escin	(DMSO 1uM) MMC 0		
E	Embelin	(DMSO 1uM) MMC 1 nM			Embelin	(DMSO 1uM) MMC 1 nM		
F	Erlotinib	(DMSO 1uM) MMC 3 nM			Erlotinib	(DMSO 1uM) MMC 3 nM		
G	Gefitinib	(DMSO 1uM) MMC 10 nM			Gefitinib	(DMSO 1uM) MMC 10 nM		
H	SKI II	(DMSO 1uM) MMC 33 nM			SKI II	(DMSO 1uM) MMC 33 nM		
I	API-2	Vatalanib			API-2	Vatalanib		
J	AZD2014	Vorinostat			AZD2014	Vorinostat		
K	Beta-Escin	(DMSO 10uM) MMC 0			Beta-Escin	(DMSO 10uM) MMC 0		
L	Embelin	(DMSO 10uM) MMC 1 nM			Embelin	(DMSO 10uM) MMC 1 nM		
M	Erlotinib	(DMSO 10uM) MMC 3 nM			Erlotinib	(DMSO 10uM) MMC 3 nM		
N	Gefitinib	(DMSO 10uM) MMC 10 nM			Gefitinib	(DMSO 10uM) MMC 10 nM		
O	SKI II	(DMSO 10uM) MMC 33 nM			SKI II	(DMSO 10uM) MMC 33 nM		
P								

1 μ M 10 μ M

Cell lir FA551
 Cell lir U2OS FANCA KO

Figura A2. Distribució dels compostos en la placa de validació 1 dels compostos antitumorals. Les columnes 1 i 10-24 i les files A i P no es van utilitzar pel plaueig cel·lular per evitar l'evaporació del medi. Es va utilitzar 1 placa amb 9 compostos diferents amb 6 rèpliques cadascun. Les files B-H contenien els fàrmacs a dosi 1 μ M (3 nl/pou) i les files I-O els mateixos fàrmacs a dosi 10 μ M (30 nl/pou). En les columnes 2-5 es va plauejar la línia de fibroblast primari FA551 i en les columnes 6-9 la línia U2OS FANCA^{-/-}. Per cada línia cel·lular es va afegir una corba de dosis de MMC d'1 a 33 nM com a control positiu de dany.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
A	DMSO	DMSO	(R)-(+)-Niguldipine hydrochloride	(R)-CR8	17-DMAG HCl (Alvespimycin)	3'-Fluorobenzylpiperone maleate	A-674563	ALL788 (NVP-AE1/88)	Afatinib (BIBW2992)	DMSO	DMSO											
B	Aminopurvalanol A	AP26113	Apicidin	AR-42 (HDAC-42)	AST-1306	AT13387	AT7519	AT9283	Auranofin	Aurora A inhibitor I	AUY922 (NVP-AUY922)											
C	AVL-292	AZ-23	AZ03463	AZ08055	AZ09291	Bardoxolone Methyl	Bax channel blocker	Bay 11-7085	Bay 11-7821	Belinostat (PKD101)	BI 2536											
D	BI 7803	BI6727 (Volasertib)	RIBU 1361 dihydrochloride	BIIB021	BIO	bms-345541	BMS-536924	BNTX maleate	Brefeldin A	CAVI0581	Celastrol											
E	Ceritinib (LDK378)	CgP 71683 hydrochloride	CNX-2006	CO-1686	Crenolanib (CP-868596)	CUDC-101	CUDC-907	CX-6258 HCl	DCC-2036 (Rebastinib)	Dovitinib (TKI-258)	Dronedarone HCl (Multaq)											
F	EHop-016	ENMD-2076	Entinostat (MS-275, SNDX-275)	ER 27319 maleate	Fingolimod (FTY720)	Flavopindol (Álvocidib) HCl	Foretinib (GSK1363089, XL880)	Ganetespib (STA-9090)	Geldanamycin	GR 127935 hydrochloride	GSK1070916											
G	GSK1838705A	GSK2126458	GSK461864	GZD824 Dimethylate	Hesperadin	Homoharringtonine	IKK 16	IMD0354	IPAG	ITF2357 (givinostat)	JK 184											
H	JNJ-26481585	JNK-IN-8	LAQ824 (NVP-LAQ824, Dacinostat)	LY2608204	LY2835219	Lylamine hydrochloride	Mefloquine hydrochloride	Milcicicb (PHA-848125)	MK-1775	Mocetinostat (MGCC0103)	Mometolotinib (CYT387)											
I	NH-325	NNC 55-0396 dihydrochloride	NSC 3852	NSC 632839 hydrochloride	NSC 663284	NVP-861226	OSU-03012 (AR-12)	P276-00	Panobinostat	PCI-24781	PD 161570											
J	PD 166285	Pelitinib (EKB-569)	Perhexiline maleate	PF 477736	PF-00562271	PF-03814735	PF-04691502	PF-04929113 (SNX-5422)	PF-3758309	PF-562271	PFK15											
K	PHA-665752	PHA-793887	PI3K/HDAC inhibitor I	PIK-75	Pitavastatin calcium (Livalo)	Ponatinib (AP24534)	PP-121	racrine dihydrochloride dihy	RS47	Ro 106-9920	Ro 31-8220 Mesylate											
L	Ro3280	Romidepsin (FK228 ,depsipeptide)	RS 17053 hydrochloride	SB 216641 hydrochloride	SB590885	S8939 (Pracinostat)	SCH 79797	SGI-1776 free base	SMER 3	SNS-032 (BMS-387032)	SNX-2112											
M	SR 33805 oxalate	SRT1720	Stattic	SU 3327	Sumitinib Malate (Sutent)	TAK-901	Terfenadine	Tetrandole mesylate	TG101209	TG101348 (SAR307503)	Torikinib (PP242)											
N	Triptolide	TWS119	Tyrphostin 9 (SF 6847)	Vandetanib (Zactima)	WAY-600	WH-4-023	WP1066	WP1130	WZ3146	WZ4002	WZ8040											
O																						
P																						

1 μ M

Figura A3. Distribució dels compostos en la placa de validació 2 dels compostos antitumorals. Les columnes 1 i 24 i les files A i P no es van utilitzar pel plaqueig cel·lular per evitar l'evaporació del medi. Es van utilitzar 4 plaques idèntiques que contenen 150 compostos diferents amb 2 rèpliques cadascun. Tots els fàrmacs es van plaquejar a concentració d'1 μ M (3 nl/pou). En les diferents plaques es van plaquejar la HNSCC Fanconi VU1131-T2.8, VU1604-T i VU1365-T i els fibroblasts primaris FA551. Per cada línia cel·lular es van afegir l'agent inductor d'ICLs MMC com a control de dany a una dosi de 10 i 33 nM.

Drug	Cell Line	N	MN								G2							
			Mean	SD	Normalized data	SEM of normalized data	Normalized data to 0-100 scale	SEM of normalized data to 0-100 scale	p-value	Adjusted p-value	Mean	SD	Normalized data	SEM of normalized data	Normalized data to 0-100 scale	SEM of normalized data to 0-100 scale	p-value	Adjusted p-value
Solvent H2O / Spontaneous damage																		
Control	LFA55	35,0	22,7	8,6	24,0	2,0	100,0	8,2			30,6	4,1	30,5	0,8	100,0	2,8		
CRD1.1	LFA55	4,0	19,6	4,2	26,3	2,7	109,4	11,4	0,2804	0,9806	26,3	0,8	28,3	1,4	92,7	4,5	0,0617	0,5307
CRD1.2	LFA55	4,0	19,5	4,0	26,2	2,7	109,1	11,4	0,2993	0,9862	26,3	2,2	28,2	1,4	92,6	4,5	0,0561	0,4974
CRD1.3	LFA55	4,0	14,6	1,3	21,3	2,7	88,8	11,4	0,1981	0,9266	28,3	2,1	30,3	1,4	99,3	4,5	0,8534	1,0000
CRD1.4	LFA55	7,0	23,8	9,7	24,2	2,4	100,8	10,0	0,9022	1,0000	27,6	2,4	30,7	1,2	100,6	3,8	0,8468	1,0000
CRD2.1	LFA55	3,0	22,8	0,8	26,0	2,9	108,3	12,2	0,3933	0,9978	26,3	1,9	27,7	1,5	90,8	4,9	0,0334	0,3372
CRD2.2	LFA55	3,0	25,1	0,4	28,3	2,9	117,9	12,2	0,0669	0,5594	27,9	1,6	29,2	1,5	95,8	4,9	0,3290	0,9921
CRD2.3	LFA55	3,0	24,1	3,4	27,3	2,9	113,7	12,2	0,1589	0,8698	26,0	1,3	27,3	1,5	89,7	4,9	0,0176	0,1977
CRD2.4	LFA55	6,0	18,1	2,9	22,9	2,5	95,1	10,4	0,5043	0,9998	25,1	0,7	27,1	1,2	88,8	4,0	0,0007	0,0098
CRD3.5	LFA55	3,0	20,9	0,6	24,1	2,9	100,4	12,2	0,9689	1,0000	26,0	0,5	27,3	1,5	89,7	4,9	0,0176	0,1977
CRD3.6	LFA55	7,0	17,9	4,5	23,2	2,4	96,3	10,1	0,5959	1,0000	24,5	1,6	26,2	1,2	86,0	3,8	0,0001	0,0002
CRD3.7	LFA55	7,0	13,7	3,8	18,9	2,4	78,7	10,1	0,0025	0,0325	22,8	1,7	24,5	1,2	80,5	3,8	0,0001	0,0001
CRD3.8	LFA55	17,0	14,3	5,4	18,7	2,1	78,0	8,9	0,0001	0,0002	18,3	3,3	19,2	1,0	63,1	3,2	0,0001	0,0001
CRD4.4	LFA55	3,0	22,5	3,5	28,8	3,0	119,7	12,5	0,0507	0,4625	26,5	2,3	29,2	1,5	95,8	5,0	0,3428	0,9939
CRD5.4	LFA55	3,0	13,4	5,5	19,6	3,0	81,7	12,5	0,0689	0,5703	22,8	1,6	25,5	1,5	83,5	5,0	0,0003	0,0041
Solvent H2O / Diepoxybutane induced damage																		
Control	LFA55	16,0	57,9	14,9	58,8	6,6	100,0	11,3			64,6	7,5	64,4	1,7	100,0	2,7		
CRD1.1	LFA55	3,0	77,3	29,5	79,9	8,9	136,0	15,1	0,0030	0,0283	66,3	1,0	65,7	3,6	102,1	5,6	0,7262	1,0000
CRD1.2	LFA55	4,0	72,0	19,3	74,6	8,4	126,9	14,3	0,0143	0,1223	56,1	0,9	55,5	3,3	86,1	5,1	0,0098	0,0871
CRD1.3	LFA55	4,0	68,6	8,3	71,2	8,4	121,1	14,3	0,0526	0,3753	61,4	2,8	60,8	3,3	94,4	5,1	0,2907	0,9503
CRD1.4	LFA55	11,0	48,3	16,8	49,1	7,0	83,6	11,9	0,0238	0,1935	60,7	5,7	61,3	2,0	95,1	3,2	0,1713	0,8021
CRD2.4	LFA55	3,0	65,6	8,6	52,1	9,1	88,6	15,5	0,3558	0,9790	57,5	3,1	55,7	3,7	86,4	5,7	0,0245	0,1992
CRD3.6	LFA55	4,0	40,0	4,5	42,6	8,4	72,5	14,3	0,0123	0,1065	60,4	3,2	59,8	3,3	92,8	5,1	0,1781	0,8159
CRD3.7	LFA55	3,0	39,2	15,7	41,8	8,9	71,2	15,1	0,0167	0,1413	55,7	1,3	55,1	3,6	85,6	5,6	0,0156	0,1328
CRD3.8	LFA55	17,0	22,8	15,4	24,2	6,6	41,1	11,2	0,0001	0,0001	37,5	10,0	37,5	1,7	58,2	2,6	0,0001	0,0001
CRD4.4	LFA55	3,0	21,5	1,9	8,0	9,1	13,6	15,5	0,0001	0,0001	47,9	3,4	46,1	3,7	71,5	5,7	0,0001	0,0001
CRD5.4	LFA55	3,0	68,8	6,7	55,3	9,1	94,1	15,5	0,6291	0,9999	57,1	2,9	55,3	3,7	85,9	5,7	0,0197	0,1641
Solvent H2O / Acetaldehyde induced damage																		
Control	LFA55	12,0	61,2	18,4	57,9	9,5	100,0	16,4			54,2	7,6	54,2	4,3	100,0	7,9		
CRD1.2	LFA55	3,0	91,9	5,5	51,4	11,6	88,7	20,1	0,4180	0,9871	49,9	1,1	55,3	4,9	102,0	9,0	0,7007	1,0000
CRD1.3	LFA55	3,0	74,4	7,0	33,9	11,6	58,6	20,1	0,0038	0,0322	46,9	1,6	52,2	4,9	96,3	9,0	0,4809	0,9951
CRD1.4	LFA55	9,0	74,5	37,2	67,6	9,7	116,8	16,8	0,0637	0,4045	51,2	11,3	54,2	4,4	100,0	8,1	0,9931	1,0000
CRD2.4	LFA55	3,0	15,2	7,6	22,7	11,9	39,3	20,5	0,0001	0,0006	47,6	2,6	38,7	4,9	71,5	9,1	0,0001	0,0001
CRD3.6	LFA55	3,0	84,3	6,5	43,8	11,6	75,6	20,1	0,0832	0,4932	52,3	2,8	57,7	4,9	106,4	9,0	0,2181	0,8541
CRD3.7	LFA55	3,0	90,0	5,7	49,5	11,6	85,5	20,1	0,2980	0,9389	38,1	3,7	43,5	4,9	80,2	9,0	0,0003	0,0024
CRD3.8	LFA55	12,0	42,1	29,3	38,8	9,5	67,0	16,4	0,0001	0,0008	36,8	10,5	36,8	4,3	67,9	7,9	0,0001	0,0001
CRD4.4	LFA55	3,0	10,4	1,2	18,0	11,9	31,1	20,5	0,0001	0,0001	48,0	2,1	39,1	4,9	72,2	9,1	0,0001	0,0001
CRD5.4	LFA55	3,0	46,2	10,2	53,8	11,9	92,9	20,5	0,6232	0,9997	39,0	2,6	30,1	4,9	55,6	9,1	0,0001	0,0001
Solvent H2O / Formaldehyde induced damage																		
Control	LFA55	12,0	91,1	25,4	95,0	10,9	100,0	11,5			42,2	5,8	42,0	1,5	100,0	3,5		
CRD1.2	LFA55	3,0	128,0	10,2	92,6	13,0	97,5	13,7	0,7835	1,0000	43,9	1,7	42,0	2,1	100,0	4,9	0,9983	1,0000
CRD1.3	LFA55	3,0	115,6	11,8	80,3	13,0	84,5	13,7	0,0882	0,5141	35,1	1,7	33,2	2,1	79,0	4,9	0,0001	0,0001
CRD1.4	LFA55	9,0	74,9	42,0	81,2	11,2	85,4	11,7	0,0139	0,1086	37,8	3,7	36,1	1,5	86,0	3,7	0,0001	0,0001
CRD2.4	LFA55	3,0	90,2	3,6	87,0	13,3	91,5	14,0	0,3650	0,9732	28,3	1,3	32,7	2,1	77,9	5,0	0,0001	0,0001
CRD3.6	LFA55	3,0	86,9	12,1	51,5	13,0	54,2	13,7	0,0001	0,0001	36,3	0,8	34,4	2,1	81,9	4,9	0,0001	0,0003
CRD3.7	LFA55	3,0	81,4	9,8	46,0	13,0	48,5	13,7	0,0001	0,0001	38,1	2,9	36,2	2,1	86,2	4,9	0,0012	0,0106

CRD3.8	LFA55	12,0	48,4	31,8	52,3	10,9	55,1	11,5	0,0001	0,0001	27,8	3,0	27,6	1,5	65,8	3,5	0,0001	0,0001
CRD4.4	LFA55	3,0	8,9	1,5	5,6	13,3	5,9	14,0	0,0001	0,0001	37,8	1,8	42,2	2,1	100,5	5,0	0,9145	1,0000
CRD5.4	LFA55	3,0	88,5	5,5	85,2	13,3	89,7	14,0	0,2718	0,9175	38,1	2,4	42,4	2,1	101,1	5,0	0,7971	1,0000
Solvent DMSO / Spontaneous damage																		
Control	LFA55	82,0	20,1	10,2	18,5	1,3	100,0	7,1			25,4	5,2	25,2	0,8	100,0	3,4		
CRD6.4	LFA55	3,0	17,4	1,5	14,2	2,3	76,7	12,6	0,0807	0,9255	20,7	3,0	20,8	1,5	82,3	5,8	0,0003	0,0117
CRD7.1	LFA55	4,0	11,1	2,2	14,9	2,4	80,2	12,9	0,1361	0,9890	29,2	2,3	25,6	1,4	101,3	5,7	0,7925	1,0000
CRD7.2	LFA55	4,0	14,9	4,3	19,6	3,2	106,0	17,0	0,6923	1,0000	28,5	1,0	24,9	1,4	98,5	5,7	0,7498	1,0000
CRD7.4	LFA55	7,0	11,5	2,1	12,4	1,6	67,2	8,5	0,0004	0,0123	26,5	4,0	24,5	1,2	96,9	4,8	0,3797	1,0000
CRD8.1	LFA55	3,0	14,1	7,9	10,0	1,7	53,8	9,0	0,0001	0,0031	22,8	2,4	24,8	1,5	98,2	5,9	0,7250	1,0000
CRD8.1	LFA55	3,0	24,3	2,9	19,0	3,2	102,7	17,3	0,8661	1,0000	22,2	2,0	24,2	1,5	95,9	5,9	0,4099	1,0000
CRD8.2	LFA55	3,0	16,5	4,7	12,6	2,1	68,0	11,4	0,0139	0,3641	23,3	1,8	25,3	1,5	100,1	5,9	0,9872	1,0000
CRD8.2	LFA55	3,0	24,1	2,9	18,9	3,2	101,8	17,1	0,9109	1,0000	22,4	1,6	24,4	1,5	96,6	5,9	0,5050	1,0000
CRD8.3	LFA55	3,0	9,6	4,5	7,0	1,2	38,0	6,4	0,0001	0,0001	21,6	2,0	23,6	1,5	93,6	5,9	0,2025	0,9991
CRD8.3	LFA55	3,0	24,0	1,5	18,9	3,2	101,9	17,1	0,9065	1,0000	22,5	1,9	24,5	1,5	97,2	5,9	0,5743	1,0000
CRD8.4	LFA55	15,0	21,7	6,2	17,4	1,7	93,9	9,4	0,4348	1,0000	20,3	2,8	18,6	1,0	73,7	4,1	0,0001	0,0001
CRD9.4	LFA55	3,0	20,0	5,1	23,5	3,9	126,7	21,3	0,1306	0,9867	30,3	0,5	29,0	1,5	114,9	5,9	0,0033	0,1055
CRD10.1	LFA55	4,0	14,5	2,7	18,0	2,9	97,0	15,6	0,8358	1,0000	23,9	1,3	27,2	1,4	107,9	5,7	0,0987	0,9586
CRD10.2	LFA55	4,0	9,4	1,5	11,6	1,9	62,7	10,1	0,0017	0,0567	26,7	2,2	30,0	1,4	119,0	5,7	0,0001	0,0030
CRD10.4	LFA55	7,0	14,6	6,6	13,9	1,8	75,0	9,5	0,0095	0,2680	18,4	3,2	20,3	1,2	80,5	4,8	0,0001	0,0001
CRD11.1	LFA55	4,0	7,9	1,1	13,3	2,1	71,9	11,3	0,0222	0,5104	20,0	1,1	9,5	1,4	37,6	5,6	0,0001	0,0001
CRD11.3	LFA55	7,0	30,2	10,2	35,3	4,5	190,6	24,1	0,0001	0,0001	15,9	4,9	9,9	1,2	39,3	4,8	0,0001	0,0001
CRD12.4	LFA55	3,0	14,1	2,0	11,5	1,9	61,9	10,2	0,0017	0,0564	22,0	0,6	22,0	1,5	87,3	5,8	0,0098	0,2744
CRD13.1	LFA55	3,0	25,8	1,6	20,2	3,4	109,2	18,3	0,5736	1,0000	20,9	3,1	22,9	1,5	90,8	5,9	0,0676	0,8838
CRD13.2	LFA55	3,0	22,9	1,7	17,9	3,0	96,8	16,3	0,8369	1,0000	28,2	1,4	30,2	1,5	119,6	5,9	0,0001	0,0041
CRD13.3	LFA55	3,0	22,2	1,6	17,4	2,9	94,0	15,8	0,6925	1,0000	26,2	1,5	28,2	1,5	111,7	5,9	0,0205	0,4828
CRD13.4	LFA55	6,0	16,1	5,8	14,7	2,0	79,6	10,6	0,0552	0,8287	19,6	2,5	19,9	1,3	78,9	5,0	0,0001	0,0001
CRD13.5	LFA55	3,0	13,1	2,9	10,2	1,7	54,9	9,2	0,0001	0,0051	18,6	0,2	20,6	1,5	81,6	5,9	0,0003	0,0103
CRD14.4	LFA55	6,0	18,0	3,2	17,2	2,3	93,1	12,4	0,5451	1,0000	17,7	1,0	18,1	1,3	71,5	5,0	0,0001	0,0001
CRD15.4	LFA55	3,0	29,8	1,8	35,7	6,0	192,9	32,4	0,0001	0,0012	17,3	1,1	16,0	1,5	63,3	5,9	0,0001	0,0001
CRD16.1	LFA55	3,0	23,1	7,5	17,5	2,9	94,6	15,9	0,7198	1,0000	21,0	3,9	23,0	1,5	91,3	5,9	0,0829	0,9297
CRD16.2	LFA55	3,0	25,8	2,7	20,2	3,4	108,9	18,3	0,5854	1,0000	24,2	1,0	26,2	1,5	103,8	5,9	0,4526	1,0000
CRD16.3	LFA55	3,0	24,5	1,6	19,3	3,2	104,0	17,5	0,8023	1,0000	24,3	1,7	26,3	1,5	104,3	5,9	0,3920	1,0000
CRD16.4	LFA55	6,0	15,2	5,2	13,9	1,9	75,3	10,0	0,0172	0,4270	20,8	3,0	21,1	1,3	83,7	5,0	0,0001	0,0010
CRD17.1	LFA55	3,0	8,9	3,2	15,6	2,8	84,1	15,0	0,3009	1,0000	25,7	2,1	27,0	1,6	106,9	6,3	0,2037	0,9991
CRD17.3	LFA55	3,0	19,2	2,3	35,3	6,3	190,7	34,1	0,0001	0,0048	21,5	4,4	22,8	1,6	90,4	6,3	0,0754	0,9102
CRD17.4	LFA55	7,0	15,4	4,2	19,5	2,5	105,2	13,6	0,6541	1,0000	13,2	1,4	13,9	1,2	55,3	4,9	0,0001	0,0001
CRD18.1	LFA55	4,0	18,5	3,9	31,1	4,9	167,8	26,3	0,0004	0,0126	33,2	1,6	22,7	1,4	90,0	5,6	0,0309	0,6258
CRD18.2	LFA55	4,0	20,8	5,0	34,8	5,5	187,6	29,4	0,0001	0,0006	33,8	1,3	23,4	1,4	92,5	5,6	0,1079	0,9697
CRD18.4	LFA55	7,0	17,7	11,7	17,9	2,3	96,7	12,2	0,7618	1,0000	17,8	4,8	11,9	1,2	47,0	4,8	0,0001	0,0001
CRD19.4	LFA55	3,0	18,2	2,3	14,8	2,4	79,7	13,1	0,1352	0,9887	19,1	2,6	19,1	1,5	75,7	5,8	0,0001	0,0001
Solvent DMSO / Diepoxybutane induced damage																		
Control	LFA55	64,0	53,3	22,0	49,5	4,6	100,0	9,3			69,7	7,4	69,7	1,4	100,0	2,0		
CRD20.4	LFA55	3,0	45,0	10,8	70,1	14,6	141,7	29,5	0,0675	0,9918	66,9	2,9	61,3	4,0	88,0	5,8	0,0331	0,9058
CRD21.4	LFA55	3,0	8,7	1,2	8,6	1,7	17,5	3,5	0,0001	0,0001	39,9	5,7	26,9	3,9	38,7	5,6	0,0001	0,0001
CRD22.4	LFA55	3,0	79,8	16,5	79,2	15,8	160,0	32,0	0,0101	0,5220	75,5	0,2	62,6	3,9	89,9	5,6	0,0609	0,9872
CRD23.4	LFA55	3,0	43,5	6,4	44,7	9,2	90,3	18,6	0,5866	1,0000	66,8	1,8	66,5	4,0	95,4	5,7	0,4090	1,0000
CRD24.4	LFA55	3,0	44,7	13,9	68,6	14,3	138,6	28,8	0,0867	0,9980	65,3	0,2	59,6	4,0	85,6	5,8	0,0107	0,5438
CRD25.4	LFA55	3,0	54,6	3,7	56,3	11,6	113,8	23,5	0,4920	1,0000	65,7	0,8	65,3	4,0	93,8	5,7	0,2639	1,0000
CRD26.4	LFA55	3,0	32,6	7,3	51,0	10,6	103,2	21,5	0,8702	1,0000	70,5	3,9	64,9	4,0	93,1	5,8	0,2235	1,0000
CRD27.4	LFA55	3,0	51,1	4,7	51,3	10,3	103,6	20,7	0,8465	1,0000	75,0	3,5	62,1	3,9	89,1	5,6	0,0439	0,9564
CRD6.4	LFA55	10,0	68,3	18,6	56,5	7,5	114,1	15,2	0,2205	1,0000	67,2	6,9	65,7	2,4	94,2	3,5	0,0709	0,9939
CRD7.1	LFA55	3,0	28,8	1,9	52,1	11,3	105,2	22,8	0,7983	1,0000	73,2	2,4	73,4	4,2	105,4	6,0	0,3558	1,0000

CRD7.2	LFA55	4,0	27,9	5,0	49,8	9,9	100,7	20,1	0,9712	1,0000	73,0	3,1	73,2	3,8	105,0	5,5	0,3433	1,0000
CRD7.4	LFA55	9,0	30,6	13,3	37,4	5,3	75,5	10,6	0,0164	0,6920	66,7	7,9	67,3	2,6	96,6	3,7	0,3185	1,0000
CRD8.4	LFA55	12,0	43,8	10,0	34,9	4,5	70,4	9,1	0,0008	0,0623	49,9	10,3	47,4	2,3	68,0	3,3	0,0001	0,0001
CRD28.4	LFA55	3,0	37,3	10,9	36,5	7,3	73,9	14,8	0,0964	0,9991	69,4	5,8	56,5	3,9	81,1	5,6	0,0005	0,0385
CRD9.4	LFA55	6,0	16,3	7,0	11,6	1,8	23,4	3,7	0,0001	0,0001	34,7	4,3	33,9	3,0	48,7	4,3	0,0001	0,0001
CRD29.4	LFA55	3,0	30,0	2,2	30,9	6,4	62,5	12,9	0,0129	0,6064	68,0	1,7	67,7	4,0	97,1	5,7	0,6054	1,0000
CRD30.4	LFA55	3,0	48,1	21,7	70,7	14,7	142,8	29,7	0,0619	0,9877	72,1	11,1	66,5	4,0	95,4	5,8	0,4182	1,0000
CRD31.4	LFA55	3,0	24,1	18,1	31,4	6,5	63,5	13,2	0,0174	0,7134	75,7	2,0	70,0	4,0	100,5	5,8	0,9267	1,0000
CRD32.4	LFA55	3,0	61,0	6,2	62,8	12,9	126,9	26,1	0,2069	1,0000	68,0	1,6	67,7	4,0	97,1	5,7	0,6054	1,0000
CRD33.4	LFA55	3,0	57,2	19,8	56,9	11,7	115,0	23,7	0,4577	1,0000	64,8	3,5	64,5	4,0	92,5	5,7	0,1802	1,0000
CRD34.4	LFA55	3,0	7,7	0,9	7,7	1,5	15,6	3,1	0,0001	0,0001	32,5	4,1	19,6	3,9	28,1	5,6	0,0001	0,0001
CRD35.4	LFA55	3,0	37,0	10,6	56,9	11,8	115,0	23,9	0,4624	1,0000	69,4	5,3	63,8	4,0	91,5	5,8	0,1322	0,9999
CRD36.4	LFA55	3,0	56,4	4,7	56,6	11,3	114,4	22,9	0,4597	1,0000	78,1	4,3	65,2	3,9	93,6	5,6	0,2358	1,0000
CRD37.4	LFA55	3,0	9,5	3,6	9,2	1,8	18,6	3,7	0,0001	0,0001	36,8	3,1	23,9	3,9	34,3	5,6	0,0001	0,0001
CRD38.4	LFA55	3,0	23,8	2,3	37,8	7,9	76,4	15,9	0,1570	1,0000	17,5	0,6	11,9	4,0	17,0	5,8	0,0001	0,0001
CRD39.4	LFA55	3,0	60,7	5,4	60,9	12,2	123,0	24,6	0,2563	1,0000	76,3	3,8	63,3	3,9	90,9	5,6	0,0929	0,9988
CRD10.1	LFA55	4,0	32,4	6,4	37,8	7,5	76,4	15,1	0,1319	0,9999	74,2	5,5	79,6	3,8	114,2	5,4	0,0069	0,4006
CRD10.2	LFA55	4,0	26,0	3,3	30,7	6,1	62,0	12,3	0,0078	0,4352	77,0	4,3	82,3	3,8	118,2	5,4	0,0006	0,0446
CRD10.4	LFA55	11,0	13,1	6,2	12,5	1,7	25,3	3,5	0,0001	0,0001	25,6	15,3	31,1	2,5	44,6	3,5	0,0001	0,0001
CRD11.1	LFA55	4,0	32,2	10,9	35,3	6,7	71,4	13,5	0,0487	0,9683	51,3	2,7	48,9	3,6	70,2	5,2	0,0001	0,0001
CRD11.3	LFA55	11,0	24,2	10,4	22,8	3,0	46,1	6,1	0,0001	0,0001	21,8	6,8	21,5	2,4	30,8	3,5	0,0001	0,0001
CRD40.4	LFA55	3,0	48,5	9,3	49,5	10,2	100,1	20,6	0,9970	1,0000	72,1	1,4	71,8	4,0	103,1	5,7	0,5834	1,0000
CRD12.4	LFA55	7,0	20,5	5,3	14,2	2,2	28,7	4,5	0,0001	0,0001	65,0	5,4	68,6	2,9	98,5	4,2	0,7020	1,0000
CRD41.4	LFA55	3,0	35,5	4,1	36,5	7,5	73,8	15,2	0,1077	0,9996	67,4	1,2	67,1	4,0	96,3	5,7	0,5021	1,0000
CRD13.4	LFA55	6,0	30,3	22,3	21,4	3,4	43,3	6,8	0,0001	0,0001	55,7	2,4	52,3	3,0	75,1	4,3	0,0001	0,0001
CRD42.4	LFA55	3,0	70,9	26,6	67,2	13,4	135,8	27,2	0,0930	0,9988	75,1	1,5	62,1	3,9	89,2	5,6	0,0458	0,9619
CRD43.4	LFA55	3,0	34,6	8,8	34,0	6,8	68,7	13,7	0,0399	0,9406	79,3	2,4	66,3	3,9	95,2	5,6	0,3763	1,0000
CRD14.4	LFA55	6,0	28,6	9,4	20,5	3,2	41,5	6,5	0,0001	0,0001	15,3	2,1	8,2	2,9	11,8	4,2	0,0001	0,0001
CRD44.4	LFA55	3,0	38,5	3,8	39,7	8,2	80,2	16,5	0,2416	1,0000	65,2	2,8	64,9	4,0	93,1	5,7	0,2160	1,0000
CRD45.4	LFA55	3,0	27,2	2,9	27,2	5,4	55,1	11,0	0,0011	0,0838	75,9	4,5	63,0	3,9	90,4	5,6	0,0770	0,9961
CRD46.4	LFA55	3,0	52,9	3,8	54,6	11,2	110,3	22,7	0,6039	1,0000	62,9	2,8	62,5	4,0	89,8	5,7	0,0664	0,9914
CRD47.4	LFA55	3,0	32,4	13,9	47,8	9,9	96,6	20,1	0,8556	1,0000	70,7	2,4	65,1	4,0	93,4	5,8	0,2435	1,0000
CRD48.4	LFA55	3,0	54,4	15,1	84,3	17,5	170,3	35,4	0,0054	0,3305	38,6	1,0	33,0	4,0	47,3	5,8	0,0001	0,0001
CRD2.4	LFA55	3,0	47,6	8,8	48,6	10,0	98,2	20,2	0,9234	1,0000	69,3	2,3	69,0	4,0	99,0	5,7	0,8626	1,0000
CRD15.4	LFA55	6,0	28,5	5,9	21,6	3,4	43,6	6,9	0,0001	0,0001	23,4	16,3	22,6	3,0	32,4	4,3	0,0001	0,0001
CRD49.4	LFA55	3,0	47,7	19,1	45,0	9,0	91,0	18,2	0,6053	1,0000	75,9	1,0	63,0	3,9	90,4	5,6	0,0770	0,9961
CRD50.4	LFA55	3,0	11,2	0,8	11,2	2,2	22,7	4,5	0,0001	0,0001	34,1	2,3	21,2	3,9	30,4	5,6	0,0001	0,0001
CRD51.4	LFA55	3,0	18,8	15,2	15,4	3,1	31,1	6,2	0,0001	0,0001	16,9	0,9	3,9	3,9	5,6	5,6	0,0001	0,0001
CRD52.4	LFA55	3,0	32,0	7,3	50,0	10,4	101,1	21,0	0,9562	1,0000	45,3	1,3	39,6	4,0	56,9	5,8	0,0001	0,0001
CRD53.4	LFA55	3,0	39,7	14,0	39,1	8,1	79,1	16,3	0,2131	1,0000	31,7	3,3	31,4	4,0	45,1	5,7	0,0001	0,0001
CRD54.4	LFA55	3,0	67,6	11,9	67,2	13,4	135,8	27,2	0,0930	0,9988	72,3	2,1	59,3	3,9	85,2	5,6	0,0063	0,3727
CRD55.4	LFA55	3,0	19,8	8,1	29,9	6,2	60,4	12,6	0,0084	0,4610	70,6	2,6	65,0	4,0	93,2	5,8	0,2301	1,0000
CRD56.4	LFA55	3,0	29,6	4,8	30,3	6,2	61,2	12,6	0,0095	0,5006	73,7	0,8	73,4	4,0	105,4	5,7	0,3369	1,0000
CRD3.4	LFA55	3,0	64,8	6,9	64,9	13,0	131,2	26,2	0,1363	1,0000	72,6	3,7	59,7	3,9	85,7	5,6	0,0081	0,4518
CRD3.8	LFA55	9,0	29,5	10,1	33,2	4,6	67,0	9,3	0,0005	0,0386	55,8	9,9	49,5	2,5	71,1	3,6	0,0001	0,0001
CRD57.4	LFA55	3,0	15,2	3,4	23,7	4,9	48,0	10,0	0,0001	0,0104	50,2	9,5	44,6	4,0	64,0	5,8	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA55	6,0	23,6	10,4	16,6	2,6	33,6	5,3	0,0001	0,0001	51,3	4,4	44,2	2,9	63,5	4,2	0,0001	0,0001
CRD58.4	LFA55	3,0	58,6	4,6	93,0	19,3	187,9	39,1	0,0010	0,0752	66,9	3,1	61,2	4,0	87,9	5,8	0,0317	0,8963
CRD59.4	LFA55	3,0	35,3	9,3	54,8	11,4	110,8	23,0	0,5908	1,0000	76,0	2,0	70,4	4,0	101,0	5,8	0,8594	1,0000
CRD60.4	LFA55	3,0	29,9	4,5	30,6	6,3	61,9	12,8	0,0113	0,5594	58,3	3,1	57,9	4,0	83,2	5,7	0,0026	0,1821
CRD61.4	LFA55	3,0	11,9	4,4	11,4	2,3	23,1	4,6	0,0001	0,0001	62,4	5,2	49,5	3,9	71,0	5,6	0,0001	0,0001
CRD62.4	LFA55	3,0	64,2	0,5	64,6	12,9	130,5	26,1	0,1445	1,0000	80,9	2,6	68,0	3,9	97,6	5,6	0,6587	1,0000
CRD63.4	LFA55	3,0	74,7	22,1	72,7	14,5	146,8	29,4	0,0353	0,9181	76,7	6,0	63,7	3,9	91,5	5,6	0,1154	0,9998

CRD4.4	LFA55	3,0	12,2	3,0	12,0	2,4	24,3	4,9	0,0001	0,0001	45,6	2,1	32,7	3,9	46,9	5,6	0,0001	0,0001
CRD17.1	LFA55	3,0	36,2	5,6	35,2	7,6	71,2	15,4	0,0858	0,9979	55,3	4,6	65,4	4,2	93,8	6,0	0,2871	1,0000
CRD17.3	LFA55	4,0	25,0	5,3	24,0	4,8	48,6	9,7	0,0001	0,0057	39,2	4,0	49,2	3,8	70,7	5,5	0,0001	0,0001
CRD17.4	LFA55	10,0	14,7	6,7	11,1	1,5	22,4	3,1	0,0001	0,0001	17,3	10,9	22,4	2,5	32,1	3,6	0,0001	0,0001
CRD18.1	LFA55	4,0	26,9	7,0	29,9	5,7	60,4	11,5	0,0032	0,2168	75,6	4,7	73,3	3,6	105,2	5,2	0,3038	1,0000
CRD18.2	LFA55	4,0	18,2	2,3	20,6	3,9	41,7	7,9	0,0001	0,0001	69,4	2,1	67,1	3,6	96,3	5,2	0,4586	1,0000
CRD18.4	LFA55	14,0	14,6	7,7	13,3	1,6	26,9	3,3	0,0001	0,0001	27,2	17,7	24,2	2,2	34,7	3,1	0,0001	0,0001
CRD64.4	LFA55	3,0	36,4	2,5	57,8	12,0	116,9	24,3	0,4125	1,0000	29,3	3,3	23,6	4,0	33,9	5,8	0,0001	0,0001
CRD65.4	LFA55	3,0	39,3	22,7	56,3	11,7	113,8	23,7	0,4966	1,0000	73,3	3,5	67,7	4,0	97,2	5,8	0,6146	1,0000
CRD66.4	LFA55	3,0	9,1	1,4	9,1	1,8	18,4	3,7	0,0001	0,0001	58,8	1,6	45,9	3,9	65,8	5,6	0,0001	0,0001
CRD19.4	LFA55	13,0	75,7	18,2	72,8	9,0	147,0	18,2	0,0001	0,0056	69,3	7,4	63,9	2,2	91,7	3,2	0,0036	0,2408
CRD67.4	LFA55	3,0	38,1	7,6	38,8	8,0	78,5	16,2	0,1993	1,0000	78,1	2,7	77,8	4,0	111,7	5,7	0,0367	0,9271
CRD68.4	LFA55	3,0	19,4	1,4	20,0	4,1	40,4	8,3	0,0001	0,0002	61,7	4,1	61,4	4,0	88,1	5,7	0,0335	0,9087
CRD69.4	LFA55	3,0	48,7	13,3	75,7	15,7	152,9	31,8	0,0262	0,8450	77,1	2,9	71,4	4,0	102,5	5,8	0,6532	1,0000
CRD5.4	LFA55	3,0	63,7	2,8	65,8	13,6	133,0	27,4	0,1304	0,9999	67,0	0,7	66,7	4,0	95,7	5,7	0,4388	1,0000
CRD70.4	LFA55	3,0	61,7	0,1	98,1	20,4	198,3	41,3	0,0004	0,0281	73,5	3,5	67,8	4,0	97,4	5,8	0,6387	1,0000
CRD71.4	LFA55	3,0	31,5	7,6	49,1	10,2	99,3	20,7	0,9697	1,0000	72,7	1,3	67,1	4,0	96,3	5,8	0,5115	1,0000
CRD72.4	LFA55	3,0	20,2	4,3	20,5	4,2	41,5	8,5	0,0001	0,0003	69,0	1,1	68,7	4,0	98,6	5,7	0,7956	1,0000
Solvent DMSO / Acetaldehyde induced damage																		
Control	LFA55	37,0	49,4	21,2	46,0	4,1	100,0	8,9			51,0	7,2	51,0	2,0	100,0	3,9		
CRD22.4	LFA55	3,0	19,6	1,2	24,6	4,6	53,4	10,1	0,0004	0,0220	62,3	1,7	55,4	3,5	108,7	6,8	0,1372	0,9995
CRD23.4	LFA55	3,0	40,2	8,8	32,4	5,7	70,3	12,3	0,0287	0,7849	49,1	4,5	53,3	3,2	104,6	6,4	0,3910	1,0000
CRD24.4	LFA55	3,0	32,2	2,4	28,8	5,1	62,5	11,2	0,0043	0,2144	62,3	1,1	57,2	3,3	112,2	6,5	0,0268	0,7624
CRD25.4	LFA55	3,0	58,1	5,9	47,4	8,3	102,9	18,1	0,8589	1,0000	45,3	3,0	49,6	3,2	97,3	6,4	0,6127	1,0000
CRD26.4	LFA55	3,0	30,3	9,8	26,2	4,7	56,9	10,2	0,0006	0,0365	62,9	2,7	57,7	3,3	113,2	6,5	0,0163	0,5858
CRD27.4	LFA55	3,0	21,9	2,1	31,3	5,6	67,9	12,1	0,0185	0,6326	57,8	0,7	49,3	3,3	96,8	6,5	0,5591	1,0000
CRD6.4	LFA55	6,0	45,0	9,4	39,4	5,3	85,6	11,6	0,1840	1,0000	55,5	11,9	52,4	2,6	102,8	5,2	0,4668	1,0000
CRD7.2	LFA55	3,0	104,9	12,1	82,1	15,0	178,3	32,5	0,0007	0,0396	57,1	2,2	54,8	3,4	107,6	6,6	0,1831	1,0000
CRD7.3	LFA55	3,0	48,3	23,8	35,2	6,4	76,4	13,9	0,1115	0,9978	64,9	6,5	62,7	3,4	123,0	6,6	0,0001	0,0037
CRD7.4	LFA55	12,0	48,9	9,2	44,2	5,0	96,0	10,8	0,6504	1,0000	50,5	10,3	49,4	2,3	96,9	4,5	0,2945	1,0000
CRD8.4	LFA55	16,0	24,6	5,3	27,5	2,9	59,6	6,3	0,0001	0,0001	40,0	14,9	42,4	2,2	83,3	4,4	0,0001	0,0001
CRD28.4	LFA55	3,0	14,5	2,1	20,5	3,7	44,6	8,0	0,0001	0,0001	60,4	1,7	51,9	3,3	101,9	6,5	0,7291	1,0000
CRD9.4	LFA55	6,0	14,1	2,1	11,5	1,6	25,0	3,4	0,0001	0,0001	27,6	5,3	26,0	2,7	51,1	5,2	0,0001	0,0001
CRD29.4	LFA55	3,0	23,4	1,4	19,1	3,4	41,5	7,3	0,0001	0,0001	59,8	2,1	64,1	3,2	125,7	6,4	0,0001	0,0002
CRD32.4	LFA55	3,0	28,3	3,9	23,0	4,0	49,9	8,8	0,0001	0,0012	57,8	0,5	62,1	3,2	121,7	6,4	0,0001	0,0038
CRD33.4	LFA55	3,0	42,1	6,4	34,2	6,0	74,2	13,0	0,0644	0,9683	48,3	3,1	52,5	3,2	103,0	6,4	0,5716	1,0000
CRD36.4	LFA55	3,0	19,5	0,4	24,4	4,6	53,1	10,0	0,0003	0,0190	55,7	5,0	48,8	3,5	95,8	6,8	0,4737	1,0000
CRD73.4	LFA55	3,0	31,5	0,5	28,2	5,0	61,3	10,9	0,0030	0,1565	63,5	3,6	58,4	3,3	114,5	6,5	0,0083	0,3689
CRD39.4	LFA55	3,0	20,7	3,7	25,8	4,9	55,9	10,6	0,0010	0,0548	65,3	5,8	58,5	3,5	114,8	6,8	0,0124	0,4913
CRD10.4	LFA55	9,0	22,3	4,6	19,9	2,5	43,2	5,4	0,0001	0,0001	37,1	13,7	35,1	2,5	68,8	4,9	0,0001	0,0001
CRD11.3	LFA55	6,0	25,4	5,3	24,7	3,4	53,6	7,4	0,0001	0,0001	20,0	13,0	18,1	2,7	35,6	5,3	0,0001	0,0001
CRD74.4	LFA55	3,0	20,0	0,6	25,1	4,7	54,4	10,3	0,0006	0,0321	63,9	3,8	57,0	3,5	111,9	6,8	0,0437	0,9028
CRD40.4	LFA55	3,0	46,7	0,9	38,2	6,7	82,9	14,6	0,2432	1,0000	50,9	2,4	55,1	3,2	108,1	6,4	0,1302	0,9993
CRD12.2	LFA55	3,0	16,3	3,7	12,6	2,3	27,4	5,0	0,0001	0,0001	53,1	5,7	50,8	3,4	99,7	6,6	0,9586	1,0000
CRD12.3	LFA55	3,0	23,7	4,7	18,4	3,3	39,9	7,3	0,0001	0,0001	55,3	2,2	53,1	3,4	104,2	6,6	0,4638	1,0000
CRD12.4	LFA55	9,0	24,1	8,8	21,1	2,6	45,8	5,7	0,0001	0,0001	51,5	5,5	49,5	2,5	97,1	4,9	0,4099	1,0000
CRD41.4	LFA55	3,0	42,5	3,8	34,7	6,1	75,3	13,2	0,0777	0,9848	53,7	3,2	57,9	3,2	113,6	6,4	0,0115	0,4672
CRD13.4	LFA55	3,0	39,9	9,4	32,6	5,7	70,9	12,5	0,0329	0,8284	52,1	0,6	44,7	3,2	87,7	6,4	0,0226	0,7031
CRD42.4	LFA55	3,0	30,7	2,2	29,4	5,4	63,8	11,8	0,0084	0,3727	50,8	2,4	51,0	3,4	100,0	6,6	0,9946	1,0000
CRD42.4	LFA55	3,0	34,1	1,3	42,9	8,1	93,1	17,6	0,6801	1,0000	59,7	4,1	52,9	3,5	103,8	6,8	0,5209	1,0000
CRD75.4	LFA55	3,0	22,1	3,2	27,5	5,2	59,7	11,3	0,0034	0,1741	60,5	0,8	53,7	3,5	105,3	6,8	0,3634	1,0000
CRD43.4	LFA55	3,0	14,7	3,0	18,2	3,4	39,6	7,5	0,0001	0,0001	71,0	3,5	64,2	3,5	125,9	6,8	0,0001	0,0008
CRD14.4	LFA55	6,0	16,5	5,9	17,1	2,4	37,2	5,1	0,0001	0,0001	17,8	1,5	9,9	2,7	19,4	5,3	0,0001	0,0001

CRD44.4	LFA55	3,0	22,1	4,0	17,9	3,1	38,8	6,8	0,0001	0,0001	66,5	6,9	70,7	3,2	138,7	6,4	0,0001	0,0001
CRD45.4	LFA55	3,0	25,7	1,9	24,6	4,5	53,5	9,9	0,0003	0,0154	44,1	3,3	44,2	3,4	86,8	6,6	0,0204	0,6665
CRD46.4	LFA55	3,0	44,6	4,4	36,3	6,4	78,9	13,9	0,1413	0,9996	47,9	2,2	52,2	3,2	102,4	6,4	0,6571	1,0000
CRD47.4	LFA55	3,0	27,4	5,8	24,2	4,3	52,5	9,4	0,0001	0,0060	68,3	4,9	63,2	3,3	123,9	6,5	0,0001	0,0010
CRD2.4	LFA55	3,0	38,2	3,2	34,1	6,1	74,1	13,2	0,0679	0,9738	42,3	1,0	37,2	3,3	72,9	6,5	0,0001	0,0001
CRD15.4	LFA55	6,0	23,0	3,9	18,8	2,6	40,8	5,6	0,0001	0,0001	15,5	4,6	13,9	2,7	27,2	5,2	0,0001	0,0001
CRD54.4	LFA55	3,0	23,8	1,0	34,0	6,1	73,8	13,2	0,0647	0,9688	56,2	1,2	47,7	3,3	93,7	6,5	0,2478	1,0000
CRD56.4	LFA55	3,0	38,4	7,2	31,0	5,4	67,3	11,8	0,0143	0,5398	51,7	3,6	55,9	3,2	109,7	6,4	0,0712	0,9781
CRD3.4	LFA55	3,0	31,6	3,1	45,0	8,1	97,7	17,5	0,8861	1,0000	60,1	3,2	51,7	3,3	101,4	6,5	0,8019	1,0000
CRD3.8	LFA55	9,0	37,1	16,0	34,0	4,1	73,8	8,9	0,0024	0,1286	33,0	4,3	29,9	2,4	58,7	4,8	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA55	6,0	19,4	5,5	16,8	2,3	36,5	5,1	0,0001	0,0001	22,1	2,2	18,4	2,7	36,2	5,3	0,0001	0,0001
CRD58.4	LFA55	3,0	27,7	9,1	23,8	4,3	51,7	9,2	0,0001	0,0042	65,7	7,0	60,5	3,3	118,7	6,5	0,0007	0,0406
CRD62.4	LFA55	3,0	22,2	1,7	21,3	3,9	46,2	8,5	0,0001	0,0004	62,7	1,5	62,9	3,4	123,4	6,6	0,0001	0,0030
CRD63.4	LFA55	3,0	30,0	12,9	35,4	6,7	77,0	14,5	0,1344	0,9994	56,4	4,7	49,6	3,5	97,2	6,8	0,6372	1,0000
CRD4.4	LFA55	3,0	23,0	1,3	32,8	5,9	71,3	12,8	0,0392	0,8770	48,5	0,4	40,1	3,3	78,6	6,5	0,0001	0,0068
CRD17.4	LFA55	3,0	17,4	3,2	16,8	2,9	36,5	6,3	0,0001	0,0001	21,2	2,1	10,7	3,2	21,0	6,3	0,0001	0,0001
CRD18.2	LFA55	3,0	38,0	5,6	29,6	5,4	64,4	11,7	0,0095	0,4063	58,3	1,1	56,0	3,4	109,9	6,6	0,0811	0,9873
CRD18.4	LFA55	12,0	23,3	6,8	22,1	2,5	48,1	5,5	0,0001	0,0001	23,4	6,9	20,2	2,4	39,7	4,6	0,0001	0,0001
CRD65.4	LFA55	3,0	21,7	3,3	19,3	3,5	42,0	7,5	0,0001	0,0001	63,7	5,5	58,5	3,3	114,8	6,5	0,0072	0,3311
CRD19.4	LFA55	9,0	37,4	7,4	34,6	4,2	75,2	9,1	0,0048	0,2345	55,6	5,3	50,5	2,4	99,0	4,8	0,7650	1,0000
CRD69.4	LFA55	3,0	27,6	5,3	24,4	4,4	53,0	9,5	0,0001	0,0073	65,9	4,2	60,7	3,3	119,1	6,5	0,0005	0,0317
CRD76.4	LFA55	3,0	32,3	6,2	28,6	5,1	62,1	11,1	0,0038	0,1936	64,8	5,8	59,6	3,3	117,0	6,5	0,0020	0,1108
CRD5.4	LFA55	3,0	37,7	9,1	33,2	5,9	72,1	12,9	0,0465	0,9166	40,6	2,9	35,4	3,3	69,5	6,5	0,0001	0,0001
CRD70.4	LFA55	3,0	28,0	2,3	25,1	4,5	54,4	9,7	0,0002	0,0138	61,3	6,4	56,1	3,3	110,1	6,5	0,0664	0,9715
CRD71.4	LFA55	3,0	18,9	2,9	16,8	3,0	36,6	6,5	0,0001	0,0001	66,6	3,8	61,4	3,3	120,5	6,5	0,0002	0,0122
CRD77.4	LFA55	3,0	30,5	5,9	27,0	4,8	58,6	10,5	0,0012	0,0681	67,9	1,7	62,7	3,3	123,0	6,5	0,0001	0,0020
CRD72.4	LFA55	3,0	13,7	5,6	10,5	1,8	22,7	4,0	0,0001	0,0001	45,9	7,6	50,1	3,2	98,3	6,4	0,7556	1,0000
Solvent DMSO / Formaldehyde induced damage																		
Control	LFA55	33,0	60,9	26,5	57,6	5,3	100,0	9,2			41,0	6,4	41,4	1,7	100,0	4,1		
CRD20.4	LFA55	3,0	61,1	4,0	75,2	12,9	130,4	22,5	0,0875	0,9944	46,4	0,3	45,1	2,7	108,8	6,5	0,1001	0,9975
CRD21.4	LFA55	3,0	21,9	4,9	25,8	4,3	44,7	7,4	0,0001	0,0001	52,1	5,2	47,8	2,6	115,5	6,3	0,0026	0,1530
CRD22.4	LFA55	3,0	51,3	1,6	61,2	10,1	106,2	17,6	0,6868	1,0000	41,6	2,3	37,3	2,6	90,1	6,3	0,0533	0,9557
CRD23.4	LFA55	3,0	61,1	10,8	92,2	15,5	159,9	27,0	0,0017	0,1049	40,1	1,5	44,7	2,6	108,0	6,4	0,1181	0,9992
CRD24.4	LFA55	3,0	47,7	2,4	58,7	10,1	101,9	17,6	0,9051	1,0000	44,1	1,7	42,8	2,7	103,4	6,5	0,5302	1,0000
CRD25.4	LFA55	3,0	42,0	3,7	63,8	10,8	110,7	18,7	0,4930	1,0000	33,1	1,8	37,7	2,6	91,1	6,4	0,0847	0,9933
CRD26.4	LFA55	3,0	42,3	4,0	52,0	9,0	90,2	15,5	0,5047	1,0000	42,2	1,3	40,9	2,7	98,7	6,5	0,8088	1,0000
CRD27.4	LFA55	3,0	52,0	9,8	61,3	10,2	106,4	17,7	0,6761	1,0000	41,6	0,9	37,3	2,6	90,1	6,3	0,0533	0,9557
CRD6.4	LFA55	6,0	59,5	27,6	58,6	7,7	101,7	13,4	0,8776	1,0000	38,3	5,3	40,9	2,2	98,8	5,3	0,7557	1,0000
CRD7.4	LFA55	6,0	61,4	25,9	55,0	7,5	95,5	13,1	0,6897	1,0000	42,3	3,4	45,8	2,2	110,6	5,4	0,0088	0,4149
CRD8.4	LFA55	17,0	41,3	13,1	35,6	3,6	61,7	6,3	0,0001	0,0001	32,0	8,8	30,2	1,8	72,9	4,4	0,0001	0,0001
CRD28.4	LFA55	3,0	32,6	7,4	38,2	6,3	66,3	11,0	0,0060	0,3086	47,3	1,4	43,0	2,6	103,9	6,3	0,4432	1,0000
CRD9.4	LFA55	6,0	26,1	8,3	27,0	3,6	46,8	6,2	0,0001	0,0001	32,8	3,7	39,7	2,2	95,9	5,3	0,2733	1,0000
CRD29.4	LFA55	3,0	44,3	3,4	67,4	11,4	117,0	19,7	0,2902	1,0000	40,3	0,5	44,9	2,6	108,4	6,4	0,1042	0,9980
CRD78.4	LFA55	3,0	65,0	11,4	98,1	16,5	170,3	28,7	0,0004	0,0259	45,9	1,6	50,5	2,6	122,0	6,4	0,0001	0,0016
CRD30.4	LFA55	3,0	53,2	7,3	65,1	11,2	113,0	19,5	0,4300	1,0000	43,6	2,6	42,3	2,7	102,1	6,5	0,6981	1,0000
CRD31.4	LFA55	3,0	72,2	12,1	88,1	15,2	153,0	26,4	0,0065	0,3287	48,6	4,9	47,3	2,7	114,2	6,5	0,0087	0,4115
CRD32.4	LFA55	3,0	37,7	6,7	56,8	9,6	98,6	16,6	0,9270	1,0000	36,9	0,9	41,5	2,6	100,1	6,4	0,9771	1,0000
CRD33.4	LFA55	3,0	52,8	8,2	79,8	13,5	138,5	23,3	0,0289	0,8173	31,4	1,0	36,0	2,6	86,9	6,4	0,0114	0,4965
CRD34.4	LFA55	3,0	17,7	3,2	20,9	3,5	36,3	6,0	0,0001	0,0001	52,8	3,2	48,5	2,6	117,1	6,3	0,0009	0,0577
CRD35.4	LFA55	3,0	53,0	0,8	65,2	11,2	113,2	19,5	0,4230	1,0000	45,6	1,6	44,3	2,7	106,9	6,5	0,1984	1,0000
CRD36.4	LFA55	3,0	41,7	6,8	49,3	8,2	85,5	14,2	0,2915	1,0000	37,7	2,4	33,4	2,6	80,7	6,3	0,0002	0,0132
CRD37.4	LFA55	3,0	27,4	2,9	32,6	5,4	56,6	9,4	0,0001	0,0099	44,3	1,2	40,0	2,6	96,5	6,3	0,4968	1,0000
CRD39.4	LFA55	3,0	49,3	8,0	58,4	9,7	101,3	16,8	0,9310	1,0000	58,2	2,3	53,9	2,6	130,2	6,3	0,0001	0,0001

CRD10.4	LFA55	6,0	84,7	35,3	76,1	10,4	132,1	18,1	0,0169	0,6344	27,6	8,7	31,1	2,2	75,2	5,4	0,0001	0,0001
CRD11.3	LFA55	6,0	22,8	4,3	21,8	3,0	37,9	5,2	0,0001	0,0001	14,5	4,6	18,0	2,2	43,6	5,4	0,0001	0,0001
CRD40.4	LFA55	3,0	50,4	10,3	75,8	12,8	131,5	22,2	0,0659	0,9791	35,9	1,5	40,5	2,6	97,9	6,4	0,6815	1,0000
CRD12.4	LFA55	6,0	33,6	10,7	31,3	4,3	54,3	7,4	0,0001	0,0001	42,8	2,8	46,3	2,2	111,8	5,4	0,0036	0,2011
CRD41.4	LFA55	3,0	55,3	6,8	83,9	14,1	145,5	24,5	0,0120	0,5149	32,1	2,0	36,7	2,6	88,6	6,4	0,0263	0,7872
CRD13.4	LFA55	6,0	31,5	12,5	28,7	3,8	49,9	6,6	0,0001	0,0001	42,2	5,5	46,1	2,2	111,4	5,3	0,0033	0,1862
CRD42.4	LFA55	3,0	45,3	3,9	53,9	8,9	93,6	15,5	0,6541	1,0000	38,7	2,4	34,4	2,6	83,0	6,3	0,0010	0,0626
CRD42.4	LFA55	3,0	39,7	5,0	47,1	7,8	81,7	13,5	0,1728	1,0000	44,4	2,6	40,1	2,6	96,8	6,3	0,5375	1,0000
CRD79.4	LFA55	3,0	29,7	5,3	35,1	5,8	60,9	10,1	0,0009	0,0583	47,3	3,2	43,0	2,6	103,9	6,3	0,4432	1,0000
CRD43.4	LFA55	3,0	35,6	5,5	42,1	7,0	73,1	12,1	0,0350	0,8709	45,7	1,3	41,4	2,6	99,9	6,3	0,9847	1,0000
CRD14.4	LFA55	6,0	43,2	5,4	41,3	5,4	71,6	9,4	0,0025	0,1471	39,3	8,3	41,8	2,2	101,0	5,3	0,7960	1,0000
CRD44.4	LFA55	3,0	71,3	7,2	108,3	18,3	188,0	31,7	0,0001	0,0019	44,9	2,6	49,5	2,6	119,5	6,4	0,0002	0,0118
CRD45.4	LFA55	3,0	39,3	3,8	46,7	7,8	81,1	13,5	0,1585	0,9999	42,5	1,0	38,2	2,6	92,3	6,3	0,1349	0,9997
CRD46.4	LFA55	3,0	37,5	1,6	57,2	9,6	99,2	16,7	0,9566	1,0000	35,8	0,7	40,4	2,6	97,6	6,4	0,6361	1,0000
CRD47.4	LFA55	3,0	50,1	1,8	61,7	10,6	107,2	18,5	0,6557	1,0000	41,7	1,8	40,4	2,7	97,6	6,5	0,6513	1,0000
CRD48.4	LFA55	3,0	39,9	2,1	49,1	8,5	85,2	14,7	0,3015	1,0000	65,4	1,2	64,1	2,7	154,7	6,5	0,0001	0,0001
CRD2.4	LFA55	3,0	51,5	12,1	77,0	13,0	133,6	22,5	0,0518	0,9517	35,5	2,1	40,1	2,6	96,8	6,4	0,5288	1,0000
CRD15.4	LFA55	6,0	44,3	12,3	46,7	6,2	81,1	10,8	0,0552	0,9605	24,1	4,9	31,0	2,2	74,8	5,3	0,0001	0,0001
CRD49.4	LFA55	3,0	49,1	6,5	58,3	9,7	101,1	16,8	0,9401	1,0000	48,5	0,4	44,2	2,6	106,8	6,3	0,1831	1,0000
CRD52.4	LFA55	3,0	34,9	4,8	42,8	7,4	74,3	12,8	0,0557	0,9618	53,8	1,6	52,5	2,7	126,7	6,5	0,0001	0,0001
CRD53.4	LFA55	3,0	36,9	17,3	52,7	8,9	91,5	15,4	0,5487	1,0000	41,5	4,2	46,1	2,6	111,4	6,4	0,0267	0,7916
CRD54.4	LFA55	3,0	43,1	1,0	51,5	8,5	89,3	14,8	0,4458	1,0000	41,6	0,9	37,3	2,6	90,1	6,3	0,0533	0,9557
CRD56.4	LFA55	3,0	40,9	6,0	61,9	10,4	107,4	18,1	0,6291	1,0000	34,0	1,4	38,6	2,6	93,2	6,4	0,1874	1,0000
CRD3.4	LFA55	3,0	33,5	0,8	40,0	6,6	69,4	11,5	0,0141	0,5709	39,9	1,3	35,6	2,6	86,1	6,3	0,0068	0,3399
CRD3.8	LFA55	8,0	26,5	3,4	33,8	4,1	58,6	7,1	0,0001	0,0001	22,2	2,2	21,2	2,1	51,2	5,0	0,0001	0,0001
CRD57.4	LFA55	3,0	26,6	2,9	31,6	5,2	54,8	9,1	0,0001	0,0043	54,1	3,3	49,8	2,6	120,2	6,3	0,0001	0,0065
CRD16.4	LFA55	6,0	62,5	19,5	57,6	7,6	99,9	13,2	0,9961	1,0000	40,8	8,0	43,3	2,2	104,6	5,3	0,2247	1,0000
CRD58.4	LFA55	3,0	31,8	1,5	39,1	6,7	67,9	11,7	0,0131	0,5433	39,3	1,4	37,9	2,7	91,6	6,5	0,1190	0,9992
CRD59.4	LFA55	3,0	46,6	0,9	55,5	9,2	96,4	16,0	0,8053	1,0000	45,7	1,5	41,4	2,6	100,1	6,3	0,9902	1,0000
CRD60.4	LFA55	3,0	64,8	14,4	97,2	16,4	168,8	28,4	0,0005	0,0318	52,5	1,9	57,1	2,6	138,0	6,4	0,0001	0,0001
CRD62.4	LFA55	3,0	43,1	6,2	51,1	8,5	88,7	14,7	0,4182	1,0000	42,5	1,0	38,2	2,6	92,3	6,3	0,1349	0,9997
CRD63.4	LFA55	3,0	44,8	11,5	52,2	8,7	90,6	15,0	0,5049	1,0000	41,2	5,0	36,9	2,6	89,1	6,3	0,0341	0,8638
CRD17.4	LFA55	3,0	10,8	0,5	8,2	1,4	14,3	2,4	0,0001	0,0001	17,4	0,5	18,1	2,6	43,7	6,4	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA55	9,0	29,8	6,6	30,3	3,6	52,5	6,3	0,0001	0,0001	26,7	11,6	27,6	2,0	66,6	4,9	0,0001	0,0001
CRD64.4	LFA55	3,0	18,4	2,8	22,5	3,9	39,0	6,7	0,0001	0,0001	55,5	2,8	54,2	2,7	130,9	6,5	0,0001	0,0001
CRD65.4	LFA55	3,0	54,6	7,2	82,7	13,9	143,6	24,2	0,0154	0,6008	41,1	1,9	45,7	2,6	110,3	6,4	0,0457	0,9305
CRD19.4	LFA55	9,0	57,8	12,9	58,7	6,9	101,9	12,1	0,8399	1,0000	38,6	3,7	36,9	2,0	89,2	4,9	0,0009	0,0578
CRD67.4	LFA55	3,0	34,7	5,9	52,4	8,8	90,9	15,3	0,5228	1,0000	42,1	3,2	46,7	2,6	112,7	6,4	0,0138	0,5611
CRD68.4	LFA55	3,0	55,4	5,1	84,3	14,2	146,3	24,6	0,0109	0,4837	45,1	3,0	49,7	2,6	120,0	6,4	0,0001	0,0082
CRD69.4	LFA55	3,0	54,8	11,9	66,5	11,5	115,5	19,9	0,3547	1,0000	41,8	1,1	40,5	2,7	97,7	6,5	0,6731	1,0000
CRD5.4	LFA55	3,0	51,6	5,1	78,5	13,2	136,2	22,9	0,0384	0,8941	34,3	2,5	38,9	2,6	93,9	6,4	0,2327	1,0000
CRD70.4	LFA55	3,0	51,1	6,2	62,6	10,8	108,7	18,7	0,5922	1,0000	41,8	2,1	40,5	2,7	97,7	6,5	0,6731	1,0000
CRD71.4	LFA55	3,0	35,9	4,2	54,5	9,2	94,6	15,9	0,7111	1,0000	48,6	1,6	53,2	2,6	128,5	6,4	0,0001	0,0001
CRD72.4	LFA55	3,0	74,3	6,7	113,0	19,0	196,1	33,0	0,0001	0,0006	45,9	1,2	50,5	2,6	122,0	6,4	0,0001	0,0016

Drug	Cell Line	N	MN								G2							
			Mean	SD	Normalized data	SEM of normalized data	Normalized data to 0-100 scale	SEM of normalized data to 0-100 scale	p-value	Adjusted p-value	Mean	SD	Normalized data	SEM of normalized data	Normalized data to 0-100 scale	SEM of normalized data to 0-100 scale	p-value	Adjusted p-value
Solvent H2O / Spontaneous damage																		
Control	LFA88	9,0	21,1	2,4	13,4	2,5	100,0	18,5		22,6	2,5	22,6	1,6	100,0	7,2			
CRD1.4	LFA88	3,0	24,3	2,2	16,3	3,0	121,8	22,5	0,2396	0,7011	21,4	0,8	18,9	2,0	83,6	8,8	0,0120	0,0543
CRD2.4	LFA88	3,0	14,7	1,2	8,9	3,3	66,2	24,9	0,0812	0,3124	20,8	1,2	20,8	2,0	91,6	8,8	0,1944	0,6115

CRD3.8	LFA88	6,0	10,1	4,8	3,2	2,7	23,8	20,2	0,0001	0,0001	17,8	2,5	16,6	1,7	73,1	7,7	0,0001	0,0001
CRD4.4	LFA88	3,0	18,6	0,7	12,8	3,3	95,3	24,9	0,8086	0,9996	32,4	2,8	32,4	2,0	142,8	8,8	0,0001	0,0001
CRD5.4	LFA88	3,0	11,5	4,5	5,8	3,3	42,9	24,9	0,0035	0,0167	25,5	1,5	25,4	2,0	112,2	8,8	0,0589	0,2359
Solvent H2O / Diepoxybutane induced damage																		
Control	LFA88	6,0	56,8	16,2	56,8	10,5	100,0	18,5			49,1	5,1	49,2	2,7	100,0	5,4		
CRD1.4	LFA88	3,0	37,5	13,2	50,0	11,6	88,0	20,5	0,3723	0,8720	51,7	1,8	50,5	3,5	102,7	7,2	0,7459	0,9983
CRD2.4	LFA88	3,0	65,4	7,9	52,9	11,6	93,2	20,5	0,6141	0,9873	45,0	1,9	46,5	3,8	94,4	7,7	0,5068	0,9581
CRD3.8	LFA88	6,0	40,8	14,8	40,8	10,5	71,8	18,5	0,0068	0,0313	38,8	2,5	38,9	2,7	79,1	5,4	0,0020	0,0094
CRD4.4	LFA88	3,0	23,8	1,8	11,3	11,6	20,0	20,5	0,0001	0,0001	35,4	4,0	36,9	3,8	74,9	7,7	0,0034	0,0160
CRD5.4	LFA88	3,0	75,2	4,5	62,7	11,6	110,5	20,5	0,4354	0,9217	47,2	1,4	48,7	3,8	98,9	7,7	0,8969	1,0000
Solvent H2O / Acetaldehyde induced damage																		
Control	LFA88	6,0	62,0	19,3	67,6	10,4	100,0	15,3			40,3	3,8	40,3	6,1	100,0	15,1		
CRD1.4	LFA88	3,0	47,0	8,1	60,2	11,2	89,1	16,6	0,3941	0,8906	35,9	1,9	40,9	6,4	101,4	15,8	0,8523	0,9999
CRD2.4	LFA88	3,0	37,8	5,6	35,7	12,3	52,8	18,2	0,0004	0,0020	37,1	1,7	32,1	6,4	79,7	15,8	0,0084	0,0382
CRD3.8	LFA88	6,0	26,4	7,4	31,9	10,4	47,3	15,3	0,0001	0,0001	37,7	8,3	37,7	6,1	93,6	15,1	0,2645	0,7365
CRD4.4	LFA88	3,0	36,5	1,0	34,4	12,3	50,9	18,2	0,0002	0,0012	28,7	5,2	23,7	6,4	58,9	15,8	0,0001	0,0001
CRD5.4	LFA88	3,0	9,6	1,7	7,5	12,3	11,0	18,2	0,0001	0,0001	35,3	1,8	30,3	6,4	75,3	15,8	0,0015	0,0070
Solvent H2O / Formaldehyde induced damage																		
Control	LFA88	6,0	81,8	16,9	92,0	11,8	100,0	12,8			35,7	2,1	36,5	1,7	100,0	4,7		
CRD1.4	LFA88	3,0	37,4	7,7	59,9	12,7	65,1	13,7	0,0008	0,0030	28,9	2,9	29,9	2,0	81,9	5,4	0,0006	0,0024
CRD2.4	LFA88	3,0	74,4	8,7	72,5	13,8	78,7	14,9	0,0356	0,1246	35,9	1,4	36,5	2,2	100,0	6,1	0,9958	1,0000
CRD3.8	LFA88	6,0	33,8	14,5	44,1	11,8	47,9	12,8	0,0001	0,0001	24,8	2,1	25,5	1,7	70,0	4,7	0,0001	0,0001
CRD5.4	LFA88	3,0	95,9	5,2	94,0	13,8	102,1	14,9	0,8335	0,9990	37,1	2,8	37,7	2,2	103,3	6,1	0,5138	0,9299
Solvent DMSO / Spontaneous damage																		
Control	LFA88	24,0	18,8	6,3	16,2	2,0	100,0	12,6			24,0	2,5	23,6	1,5	100,0	6,5		
CRD6.4	LFA88	3,0	14,7	3,8	10,4	2,2	64,2	13,6	0,0139	0,1582	19,3	0,7	19,0	2,1	80,8	8,7	0,0024	0,0308
CRD7.4	LFA88	3,0	17,3	1,3	12,5	2,7	77,3	16,4	0,1523	0,8507	22,3	0,9	22,0	2,1	93,5	8,7	0,2991	0,9838
CRD8.4	LFA88	15,0	20,2	8,7	19,6	2,7	120,6	16,4	0,0226	0,2411	21,3	1,4	19,5	1,6	82,9	6,7	0,0001	0,0001
CRD9.4	LFA88	3,0	19,4	1,4	24,8	4,9	153,0	30,4	0,0099	0,1157	30,2	1,7	28,8	2,0	122,1	8,3	0,0001	0,0016
CRD10.4	LFA88	3,0	13,1	1,7	9,5	2,0	58,6	12,4	0,0031	0,0394	21,1	0,5	20,8	2,1	88,4	8,7	0,0649	0,5379
CRD11.3	LFA88	3,0	18,5	5,2	13,0	2,8	80,2	17,0	0,2188	0,9428	17,8	0,2	17,6	2,1	74,5	8,7	0,0001	0,0008
CRD12.4	LFA88	3,0	16,2	1,0	11,8	2,5	72,5	15,4	0,0746	0,5928	23,1	0,1	22,8	2,1	96,9	8,7	0,6185	1,0000
CRD13.4	LFA88	3,0	8,2	2,6	10,1	2,0	62,3	12,4	0,0041	0,0513	15,9	0,4	14,4	2,0	61,2	8,3	0,0001	0,0001
CRD14.4	LFA88	3,0	21,1	3,1	26,9	5,3	165,5	32,9	0,0023	0,0293	15,9	0,6	14,5	2,0	61,4	8,3	0,0001	0,0001
CRD15.4	LFA88	3,0	17,1	4,9	21,4	4,3	131,9	26,2	0,0919	0,6713	15,0	1,4	13,6	2,0	57,7	8,3	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA88	3,0	5,8	0,6	7,4	1,5	45,6	9,1	0,0001	0,0001	22,9	1,3	21,5	2,0	91,2	8,3	0,1215	0,7707
CRD17.4	LFA88	3,0	8,9	0,8	6,4	1,4	39,7	8,4	0,0001	0,0001	14,5	0,2	14,3	2,1	60,6	8,7	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA88	3,0	20,7	2,9	14,9	3,2	92,1	19,5	0,6455	1,0000	11,2	1,1	10,9	2,1	46,4	8,7	0,0001	0,0001
CRD19.4	LFA88	3,0	9,5	1,5	6,9	1,5	42,3	9,0	0,0001	0,0001	21,8	3,5	21,6	2,1	91,6	8,7	0,1789	0,8941
Solvent DMSO / Diepoxybutane induced damage																		
Control	LFA88	18,0	67,4	26,1	62,4	10,6	100,0	16,9			51,3	4,7	52,6	2,3	100,0	4,3		
CRD6.4	LFA88	3,0	59,2	6,7	59,5	16,1	95,2	25,7	0,8267	1,0000	54,9	1,1	59,1	4,4	112,3	8,3	0,1281	0,8110
CRD7.4	LFA88	3,0	62,5	7,3	62,7	16,9	100,5	27,2	0,9824	1,0000	50,8	2,6	54,9	4,4	104,5	8,3	0,5799	1,0000
CRD8.4	LFA88	15,0	44,3	21,3	36,6	6,4	58,6	10,2	0,0001	0,0001	41,8	6,3	42,6	2,4	80,9	4,6	0,0001	0,0001
CRD9.4	LFA88	3,0	23,0	6,2	14,0	3,5	22,4	5,7	0,0001	0,0001	40,3	3,6	43,1	4,4	82,0	8,3	0,0236	0,2598
CRD10.4	LFA88	3,0	29,1	8,4	28,6	7,7	45,8	12,4	0,0005	0,0066	41,0	1,7	45,1	4,4	85,8	8,3	0,0812	0,6438
CRD11.3	LFA88	3,0	12,5	1,2	12,5	3,4	20,1	5,4	0,0001	0,0001	17,7	2,2	21,9	4,4	41,6	8,3	0,0001	0,0001
CRD12.4	LFA88	3,0	16,5	1,6	16,6	4,5	26,5	7,2	0,0001	0,0001	49,1	3,3	53,3	4,4	101,3	8,3	0,8711	1,0000
CRD13.4	LFA88	3,0	78,1	2,1	48,7	12,3	78,0	19,7	0,2220	0,9462	41,7	1,5	44,5	4,4	84,7	8,3	0,0537	0,4926
CRD14.4	LFA88	3,0	37,6	0,9	23,4	5,9	37,5	9,5	0,0001	0,0001	16,4	0,4	19,2	4,4	36,4	8,3	0,0001	0,0001
CRD15.4	LFA88	3,0	31,4	2,8	19,6	4,9	31,3	7,9	0,0001	0,0001	14,5	0,1	17,3	4,4	32,9	8,3	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA88	3,0	31,6	10,2	18,9	4,8	30,3	7,7	0,0001	0,0001	41,8	2,5	44,6	4,4	84,8	8,3	0,0557	0,5054

CRD17.4	LFA88	3,0	9,9	2,6	9,8	2,6	15,6	4,2	0,0001	0,0001	19,7	1,2	23,8	4,4	45,3	8,3	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA88	3,0	52,6	0,7	53,1	14,3	85,0	23,0	0,4659	0,9995	24,5	2,6	28,6	4,4	54,4	8,3	0,0001	0,0001
CRD19.4	LFA88	3,0	62,5	7,3	62,7	16,9	100,5	27,2	0,9824	1,0000	50,8	2,6	54,9	4,4	104,5	8,3	0,5799	1,0000
Solvent DMSO / Acetaldehyde induced damage																		
Control	LFA88	18,0	44,9	22,8	40,5	5,3	100,0	13,0			37,9	3,8	38,2	2,9	100,0	7,6		
CRD6.4	LFA88	3,0	50,4	5,5	38,6	8,4	95,2	20,8	0,7942	1,0000	35,2	4,2	39,5	4,2	103,4	10,9	0,6903	1,0000
CRD7.4	LFA88	3,0	54,2	3,7	41,6	9,1	102,6	22,4	0,8944	1,0000	32,3	1,0	36,6	4,2	95,8	10,9	0,6217	1,0000
CRD8.4	LFA88	15,0	26,4	13,3	25,2	3,4	62,1	8,3	0,0001	0,0001	30,8	4,7	30,2	3,0	79,2	7,8	0,0001	0,0001
CRD10.4	LFA88	3,0	11,8	0,6	9,0	2,0	22,3	4,9	0,0001	0,0001	28,0	2,0	32,3	4,2	84,6	10,9	0,0740	0,5562
CRD11.3	LFA88	3,0	21,4	2,5	16,4	3,6	40,4	8,8	0,0001	0,0001	25,0	1,0	29,3	4,2	76,7	10,9	0,0071	0,0788
CRD12.4	LFA88	3,0	14,5	4,5	10,8	2,4	26,7	5,8	0,0001	0,0001	41,2	2,4	45,5	4,2	119,1	10,9	0,0268	0,2571
CRD13.4	LFA88	3,0	62,8	5,5	62,2	12,7	153,6	31,4	0,0145	0,1524	33,0	2,7	28,0	3,9	73,4	10,3	0,0007	0,0091
CRD14.4	LFA88	3,0	15,8	2,3	15,6	3,2	38,4	7,9	0,0001	0,0001	19,5	1,8	14,5	3,9	37,9	10,3	0,0001	0,0001
CRD15.4	LFA88	3,0	13,0	2,3	12,8	2,6	31,6	6,5	0,0001	0,0001	18,5	1,6	13,5	3,9	35,3	10,3	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA88	3,0	15,6	2,0	15,5	3,2	38,2	7,8	0,0001	0,0001	23,9	1,5	19,0	3,9	49,7	10,3	0,0001	0,0001
CRD17.4	LFA88	3,0	13,1	3,6	9,8	2,1	24,3	5,3	0,0001	0,0001	8,7	1,0	13,0	4,2	34,1	10,9	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA88	3,0	18,6	2,5	14,2	3,1	35,0	7,6	0,0001	0,0001	16,2	1,7	20,5	4,2	53,8	10,9	0,0001	0,0001
CRD19.4	LFA88	3,0	41,5	4,3	31,7	6,9	78,3	17,1	0,1983	0,9056	42,0	7,5	46,3	4,2	121,2	10,9	0,0141	0,1473
Solvent DMSO / Formaldehyde induced damage																		
Control	LFA88	17,0	66,3	34,6	59,9	7,3	100,0	12,1			36,5	4,4	36,0	2,2	100,0	6,1		
CRD6.4	LFA88	3,0	41,9	2,9	38,5	7,9	64,3	13,1	0,0137	0,1447	30,7	1,0	33,7	3,2	93,5	8,9	0,3631	0,9927
CRD7.4	LFA88	3,0	24,8	3,3	22,7	4,6	37,9	7,7	0,0001	0,0001	30,4	3,0	33,3	3,2	92,6	8,9	0,2991	0,9781
CRD8.4	LFA88	15,0	34,2	9,5	33,4	4,2	55,8	7,0	0,0001	0,0001	28,1	4,6	26,7	2,2	74,0	6,2	0,0001	0,0001
CRD9.4	LFA88	3,0	25,4	1,1	17,8	3,4	29,7	5,7	0,0001	0,0001	33,7	3,2	35,3	3,0	98,1	8,4	0,7730	1,0000
CRD10.4	LFA88	3,0	20,0	4,1	18,2	3,7	30,4	6,2	0,0001	0,0001	23,8	3,7	26,7	3,2	74,2	8,9	0,0004	0,0046
CRD11.3	LFA88	3,0	21,6	1,7	19,8	4,0	33,1	6,8	0,0001	0,0001	22,4	2,4	25,3	3,2	70,4	8,9	0,0001	0,0006
CRD12.4	LFA88	3,0	36,3	2,3	33,4	6,8	55,8	11,4	0,0012	0,0141	35,7	2,7	38,6	3,2	107,2	8,9	0,3167	0,9836
CRD13.4	LFA88	3,0	51,8	3,3	36,2	6,9	60,4	11,5	0,0023	0,0270	35,3	1,0	36,9	3,0	102,6	8,4	0,6959	1,0000
CRD14.4	LFA88	3,0	11,9	0,8	8,3	1,6	13,9	2,6	0,0001	0,0001	22,2	1,1	23,8	3,0	66,1	8,4	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA88	3,0	29,4	10,5	19,6	3,7	32,6	6,2	0,0001	0,0001	38,9	1,5	40,5	3,0	112,6	8,4	0,0556	0,4575
CRD17.4	LFA88	3,0	12,1	2,1	11,1	2,3	18,5	3,8	0,0001	0,0001	23,8	3,6	26,7	3,2	74,2	8,9	0,0004	0,0046
CRD18.4	LFA88	3,0	15,1	1,6	13,9	2,8	23,2	4,7	0,0001	0,0001	16,3	1,7	19,3	3,2	53,5	8,9	0,0001	0,0001
CRD19.4	LFA88	3,0	33,6	3,4	30,9	6,3	51,6	10,5	0,0002	0,0030	32,5	2,0	35,5	3,2	98,5	8,9	0,8318	1,0000

Drug	Cell Line	N	MN							G2								
			Mean	SD	Normalized data	SEM of normalized data	Normalized data to 0-100 scale	SEM of normalized data to 0-100 scale	p-value	Adjusted p-value	Mean	SD	Normalized data	SEM of normalized data	Normalized data to 0-100 scale	SEM of normalized data to 0-100 scale	p-value	Adjusted p-value
Solvent H2O / Spontaneous damage																		
Control	LFA145	9,0	17,5	2,5	10,6	2,5	100,0	23,4			15,1	0,5	15,1	1,6	100,0	10,8		
CRD1.4	LFA145	3,0	17,9	1,7	9,9	3,0	93,2	28,5	0,7718	0,9991	15,5	0,6	15,9	2,0	105,0	13,1	0,6064	0,9864
CRD2.4	LFA145	3,0	14,8	1,3	11,5	3,3	108,0	31,4	0,7428	0,9983	15,0	0,4	14,4	2,0	95,3	13,1	0,6266	0,9895
CRD3.8	LFA145	6,0	10,3	4,3	4,7	2,7	44,1	25,5	0,0022	0,0104	12,2	1,5	12,1	1,7	79,9	11,5	0,0067	0,0310
CRD4.4	LFA145	3,0	14,8	0,2	11,4	3,3	107,8	31,4	0,7474	0,9985	19,6	3,1	19,0	2,0	126,0	13,1	0,0078	0,0360
CRD5.4	LFA145	3,0	7,4	3,8	4,1	3,3	38,2	31,4	0,0122	0,0552	17,4	1,6	16,8	2,0	111,0	13,1	0,2561	0,7276
Solvent H2O / Diepoxybutane induced damage																		
Control	LFA145	6,0	49,6	8,3	49,6	10,5	100,0	21,2			50,5	2,9	49,6	2,7	100,0	5,4		
CRD1.4	LFA145	3,0	42,9	1,3	49,5	11,6	99,8	23,4	0,9879	1,0000	56,5	4,8	55,3	3,5	111,5	7,1	0,1684	0,5470
CRD2.4	LFA145	3,0	42,1	4,8	35,6	11,6	71,8	23,4	0,0692	0,2689	47,4	1,0	46,9	3,8	94,6	7,6	0,5131	0,9606
CRD3.8	LFA145	6,0	29,9	10,7	29,9	10,5	60,3	21,2	0,0010	0,0048	30,4	2,5	29,6	2,7	59,6	5,4	0,0001	0,0001
CRD4.4	LFA145	3,0	15,9	3,1	9,4	11,6	19,0	23,4	0,0001	0,0001	39,7	1,6	39,3	3,8	79,1	7,6	0,0133	0,0591
CRD5.4	LFA145	3,0	50,2	5,4	43,7	11,6	88,2	23,4	0,4423	0,9261	46,8	3,7	46,3	3,8	93,4	7,6	0,4241	0,9132

Solvent H2O / Acetaldehyde induced damage																		
Control	LFA145	6,0	42,6	5,2	56,9	10,4	100,0	18,2			42,9	1,9	42,9	6,1	100,0	14,2		
CRD1.4	LFA145	3,0	33,2	3,7	46,4	11,2	81,6	19,7	0,2276	0,6041	42,9	1,4	46,1	6,4	107,4	14,9	0,2945	0,7158
CRD2.4	LFA145	3,0	30,0	2,8	45,3	12,3	79,6	21,6	0,1824	0,5138	38,4	0,9	35,3	6,4	82,2	14,9	0,0132	0,0488
CRD3.8	LFA145	6,0	27,1	8,4	41,4	10,4	72,7	18,2	0,0203	0,0732	36,8	7,7	36,8	6,1	85,9	14,2	0,0097	0,0360
CRD5.4	LFA145	3,0	26,6	3,8	41,9	12,3	73,6	21,6	0,0853	0,2746	29,8	1,8	26,7	6,4	62,1	14,9	0,0001	0,0001
Solvent H2O / Formaldehyde induced damage																		
Control	LFA145	6,0	57,4	20,4	61,8	11,8	100,0	19,1			38,3	1,5	38,9	1,7	100,0	4,4		
CRD1.4	LFA145	3,0	32,4	2,6	55,0	12,7	89,0	20,5	0,4577	0,8939	34,3	1,7	35,3	2,0	90,6	5,1	0,0514	0,1745
CRD2.4	LFA145	3,0	67,4	1,8	53,7	13,8	86,9	22,3	0,3790	0,8230	32,3	1,2	32,6	2,2	83,7	5,7	0,0010	0,0038
CRD3.8	LFA145	6,0	28,9	23,8	33,3	11,8	53,9	19,1	0,0001	0,0004	22,9	1,9	23,5	1,7	60,5	4,4	0,0001	0,0001
CRD5.4	LFA145	3,0	77,8	16,2	64,1	13,8	103,8	22,3	0,7990	0,9978	39,5	3,1	39,8	2,2	102,2	5,7	0,6452	0,9794
Solvent DMSO / Spontaneous damage																		
Control	LFA145	24,0	21,3	6,5	18,6	2,3	100,0	12,6			20,6	4,4	20,2	1,5	100,0	7,5		
CRD6.4	LFA145	3,0	16,1	1,4	16,3	3,5	88,0	18,7	0,4751	0,9996	16,6	0,9	21,3	2,1	105,1	10,1	0,4849	0,9997
CRD7.4	LFA145	3,0	15,8	2,1	15,9	3,4	85,8	18,2	0,3941	0,9975	17,5	0,6	22,2	2,1	109,8	10,1	0,1812	0,8974
CRD8.4	LFA145	12,0	15,6	4,5	14,3	2,0	77,2	10,9	0,0049	0,0601	17,4	4,8	15,4	1,6	76,0	7,9	0,0001	0,0001
CRD9.4	LFA145	3,0	8,5	3,3	9,6	1,9	52,0	10,4	0,0001	0,0012	23,5	0,5	25,8	2,0	127,6	9,7	0,0001	0,0006
CRD10.4	LFA145	3,0	10,6	0,6	10,8	2,3	58,0	12,3	0,0026	0,0336	18,0	0,9	22,7	2,1	112,1	10,1	0,0978	0,6906
CRD11.3	LFA145	3,0	20,3	4,0	20,4	4,3	109,9	23,3	0,5997	1,0000	8,5	1,7	13,1	2,1	65,0	10,1	0,0001	0,0001
CRD12.4	LFA145	3,0	9,5	3,2	9,3	2,0	50,3	10,7	0,0002	0,0021	15,3	0,6	19,9	2,1	98,5	10,1	0,8422	1,0000
CRD13.4	LFA145	3,0	9,9	0,6	11,9	2,4	63,9	12,7	0,0069	0,0831	14,2	0,8	16,6	2,0	81,9	9,7	0,0068	0,0814
CRD14.4	LFA145	3,0	30,7	3,8	36,8	7,3	198,2	39,6	0,0001	0,0006	12,1	0,4	14,5	2,0	71,5	9,7	0,0001	0,0003
CRD15.4	LFA145	3,0	37,5	2,5	45,1	9,0	242,7	48,4	0,0001	0,0001	11,9	0,3	14,3	2,0	70,5	9,7	0,0001	0,0002
CRD16.4	LFA145	3,0	10,0	0,8	12,0	2,4	64,8	12,9	0,0089	0,1058	13,3	0,8	15,6	2,0	77,3	9,7	0,0007	0,0094
CRD17.4	LFA145	3,0	8,0	1,4	8,0	1,7	43,1	9,2	0,0001	0,0001	8,9	0,2	13,5	2,1	66,9	10,1	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA145	3,0	19,1	2,6	19,3	4,1	104,0	22,1	0,8268	1,0000	7,8	0,4	12,5	2,1	61,7	10,1	0,0001	0,0001
CRD19.4	LFA145	3,0	13,3	1,9	13,5	2,9	72,6	15,4	0,0751	0,5957	16,3	2,6	21,0	2,1	103,7	10,1	0,6139	1,0000
Solvent DMSO / Diepoxibutane induced damage																		
Control	LFA145	16,0	45,8	11,1	40,7	7,0	100,0	17,2			54,2	6,0	55,4	2,3	100,0	4,2		
CRD6.4	LFA145	3,0	47,7	5,0	48,3	13,1	118,7	32,2	0,4419	0,9992	55,3	5,0	59,7	4,4	107,7	7,9	0,3175	0,9912
CRD7.4	LFA145	3,0	39,1	7,4	39,3	10,7	96,5	26,2	0,8728	1,0000	53,3	2,3	57,6	4,4	104,0	7,9	0,6059	1,0000
CRD8.4	LFA145	14,0	36,8	15,2	32,9	5,8	80,8	14,2	0,0529	0,4719	43,1	4,6	43,3	2,4	78,0	4,4	0,0001	0,0001
CRD9.4	LFA145	3,0	22,1	2,5	15,0	3,8	36,9	9,3	0,0001	0,0001	36,5	1,0	36,6	4,4	66,0	7,9	0,0001	0,0001
CRD10.4	LFA145	3,0	20,2	4,3	20,3	5,5	49,8	13,5	0,0018	0,0238	50,7	1,2	55,0	4,4	99,3	7,9	0,9258	1,0000
CRD11.3	LFA145	3,0	13,1	4,7	12,8	3,5	31,3	8,5	0,0001	0,0001	9,2	0,3	13,6	4,4	24,6	7,9	0,0001	0,0001
CRD12.4	LFA145	3,0	14,2	1,2	14,4	3,9	35,4	9,6	0,0001	0,0001	51,2	2,6	55,6	4,4	100,2	7,9	0,9746	1,0000
CRD13.4	LFA145	3,0	47,2	5,1	32,2	8,1	78,9	20,0	0,2468	0,9636	45,5	3,3	45,6	4,4	82,2	7,9	0,0187	0,2123
CRD14.4	LFA145	3,0	44,0	6,0	29,9	7,6	73,4	18,6	0,1309	0,8023	15,3	0,2	15,4	4,4	27,7	7,9	0,0001	0,0001
CRD15.4	LFA145	3,0	35,0	5,0	23,8	6,0	58,3	14,7	0,0086	0,1023	18,8	6,4	18,8	4,4	34,0	7,9	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA145	3,0	36,2	2,0	24,8	6,3	60,8	15,4	0,0151	0,1702	40,0	2,6	40,0	4,4	72,2	7,9	0,0003	0,0036
CRD17.4	LFA145	3,0	9,4	0,6	9,5	2,6	23,3	6,3	0,0001	0,0001	11,1	1,4	15,5	4,4	27,9	7,9	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA145	3,0	17,2	0,6	17,6	4,8	43,1	11,7	0,0002	0,0024	8,2	1,5	12,6	4,4	22,7	7,9	0,0001	0,0001
CRD19.4	LFA145	3,0	27,4	15,8	23,9	6,5	58,8	15,9	0,0173	0,1913	59,9	8,4	64,2	4,4	115,9	7,9	0,0397	0,3933
Solvent DMSO / Acetaldehyde induced damage																		
Control	LFA145	17,0	34,7	9,9	33,1	4,3	100,0	13,1			42,3	4,7	42,4	2,9	100,0	6,9		
CRD6.4	LFA145	3,0	27,2	6,8	22,1	4,8	66,6	14,6	0,0331	0,3312	46,7	1,8	45,0	4,2	106,2	9,9	0,4244	0,9987
CRD7.4	LFA145	3,0	43,4	1,3	36,0	7,9	108,7	23,8	0,6592	1,0000	44,3	2,2	42,7	4,2	100,7	9,9	0,9286	1,0000
CRD8.4	LFA145	15,0	23,1	8,7	21,9	2,9	66,2	8,9	0,0001	0,0001	30,0	8,5	30,6	3,0	72,2	7,0	0,0001	0,0001
CRD9.4	LFA145	3,0	10,5	2,2	8,4	1,7	25,3	5,2	0,0001	0,0001	20,5	0,4	10,8	3,9	25,5	9,3	0,0001	0,0001
CRD10.4	LFA145	3,0	9,3	2,0	7,6	1,7	23,0	5,0	0,0001	0,0001	35,3	4,2	33,7	4,2	79,5	9,9	0,0085	0,1003
CRD11.3	LFA145	3,0	24,5	5,8	19,9	4,4	60,2	13,2	0,0079	0,0953	24,1	2,1	22,4	4,2	52,9	9,9	0,0001	0,0001
CRD12.4	LFA145	3,0	8,3	1,1	6,9	1,5	20,8	4,5	0,0001	0,0001	22,9	1,0	21,3	4,2	50,2	9,9	0,0001	0,0001

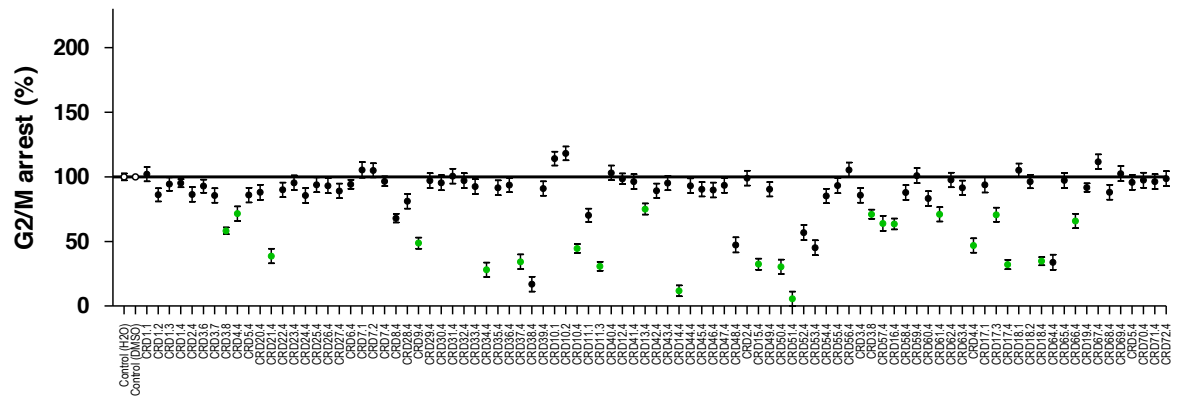
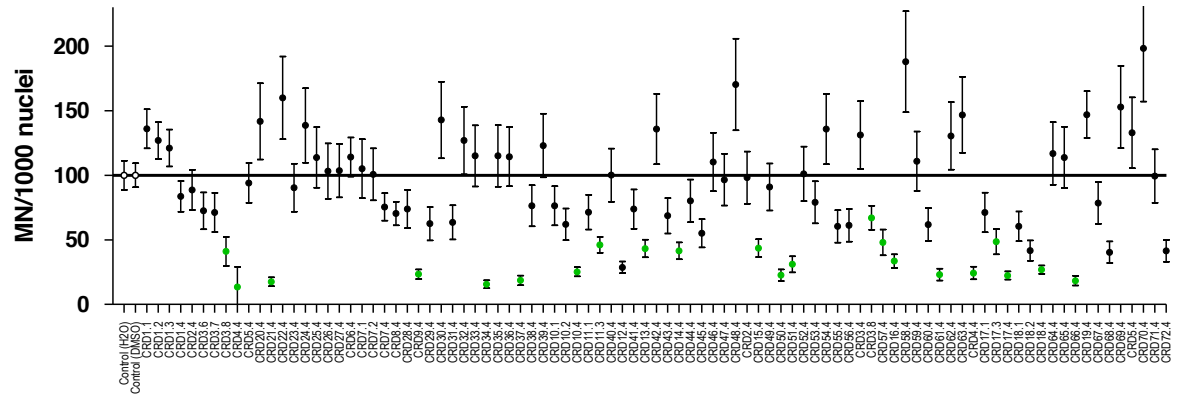
CRD13.4	LFA145	3,0	32,5	2,3	26,4	5,4	79,6	16,3	0,1926	0,9172	46,0	1,7	36,3	3,9	85,6	9,3	0,0413	0,3910
CRD14.4	LFA145	3,0	23,2	3,4	18,7	3,8	56,5	11,6	0,0012	0,0157	10,8	1,8	1,1	3,9	2,7	9,3	0,0001	0,0001
CRD15.4	LFA145	3,0	16,2	1,5	13,1	2,7	39,5	8,1	0,0001	0,0001	11,6	1,8	1,8	3,9	4,4	9,3	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA145	3,0	14,7	2,5	11,8	2,4	35,6	7,3	0,0001	0,0001	31,2	0,5	21,5	3,9	50,7	9,3	0,0001	0,0001
CRD17.4	LFA145	3,0	7,3	2,2	5,9	1,3	17,7	3,9	0,0001	0,0001	8,1	0,6	6,4	4,2	15,1	9,9	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA145	3,0	20,3	5,4	16,4	3,6	49,5	10,8	0,0002	0,0034	14,1	1,2	12,5	4,2	29,5	9,9	0,0001	0,0001
CRD19.4	LFA145	3,0	41,6	4,2	34,4	7,5	103,8	22,7	0,8427	1,0000	40,7	3,7	39,1	4,2	92,2	9,9	0,3152	0,9882
Solvent DMSO / Formaldehyde induced damage																		
Control	LFA145	17,0	57,2	26,1	50,3	6,1	100,0	12,1			39,1	4,0	38,3	2,2	100,0	5,7		
CRD6.4	LFA145	3,0	35,6	2,2	42,4	8,7	84,4	17,2	0,3404	0,9895	42,2	1,8	38,8	3,2	101,3	8,4	0,8414	1,0000
CRD7.4	LFA145	3,0	26,3	6,4	30,8	6,3	61,2	12,5	0,0062	0,0705	34,6	2,9	31,2	3,2	81,5	8,4	0,0063	0,0711
CRD8.4	LFA145	12,0	37,7	13,8	33,9	4,5	67,5	8,9	0,0001	0,0004	28,4	4,3	27,9	2,3	72,9	6,0	0,0001	0,0001
CRD9.4	LFA145	3,0	24,3	3,3	15,6	3,0	31,0	5,9	0,0001	0,0001	36,5	1,9	36,6	3,0	95,7	7,9	0,4824	0,9994
CRD10.4	LFA145	3,0	14,5	3,1	17,0	3,5	33,8	6,9	0,0001	0,0001	35,8	1,7	32,4	3,2	84,6	8,4	0,0231	0,2277
CRD11.3	LFA145	3,0	21,3	1,5	25,4	5,2	50,4	10,3	0,0001	0,0019	27,0	0,7	23,6	3,2	61,6	8,4	0,0001	0,0001
CRD12.4	LFA145	3,0	10,5	2,8	12,2	2,5	24,3	5,0	0,0001	0,0001	28,1	2,4	24,8	3,2	64,6	8,4	0,0001	0,0001
CRD13.4	LFA145	3,0	33,7	4,0	21,7	4,1	43,1	8,2	0,0001	0,0001	37,7	3,2	37,8	3,0	98,8	7,9	0,8440	1,0000
CRD14.4	LFA145	3,0	22,0	3,7	14,1	2,7	28,0	5,4	0,0001	0,0001	21,7	1,5	21,9	3,0	57,2	7,9	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA145	3,0	39,9	20,8	22,6	4,3	44,8	8,6	0,0001	0,0001	42,4	5,0	42,6	3,0	111,1	7,9	0,0728	0,5512
CRD17.4	LFA145	3,0	11,8	0,1	14,1	2,9	28,1	5,7	0,0001	0,0001	20,7	8,0	17,3	3,2	45,2	8,4	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA145	3,0	10,5	1,7	12,5	2,5	24,8	5,1	0,0001	0,0001	6,7	0,9	3,4	3,2	8,8	8,4	0,0001	0,0001
CRD19.4	LFA145	3,0	28,7	6,8	33,6	6,9	66,9	13,6	0,0245	0,2410	35,6	0,5	32,2	3,2	84,1	8,4	0,0189	0,1912

Taula A1. Dades globals de la freqüència de MN i parada en G2/M de tot el cribatge de fàrmacs antioxidants.

A

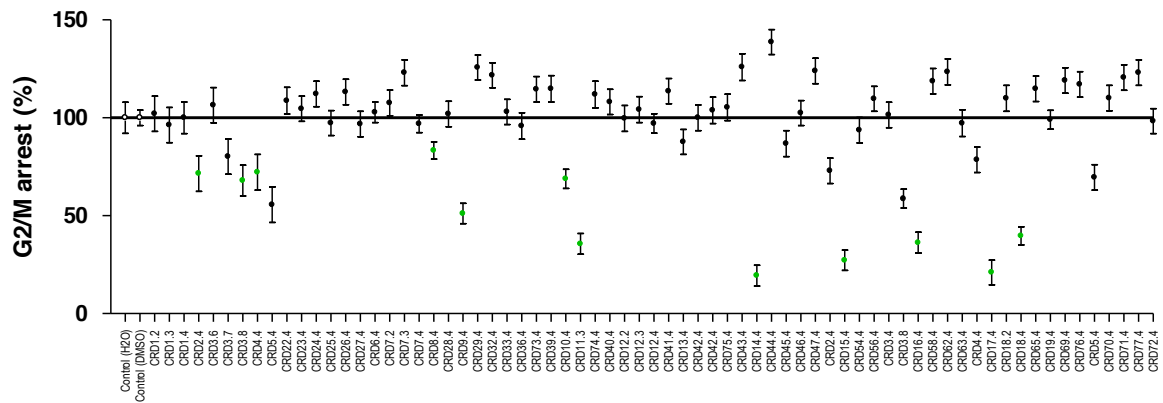
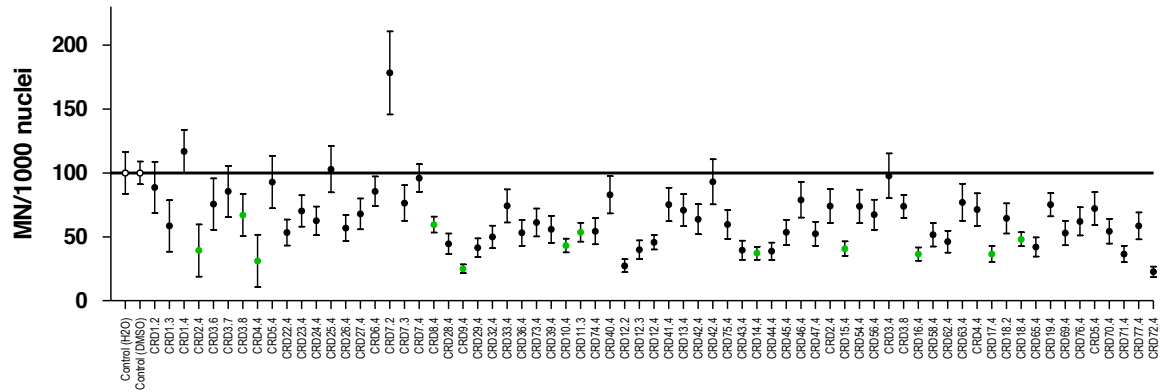
LFA55

DEB induced damage



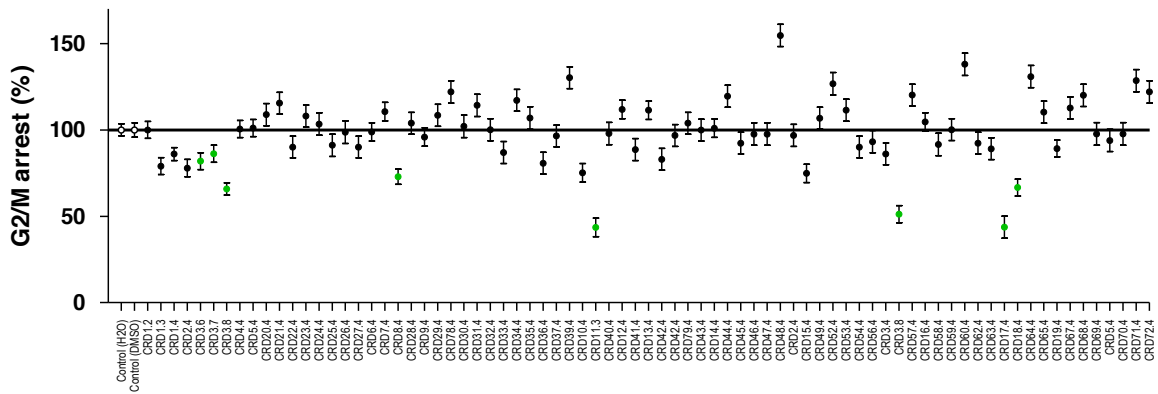
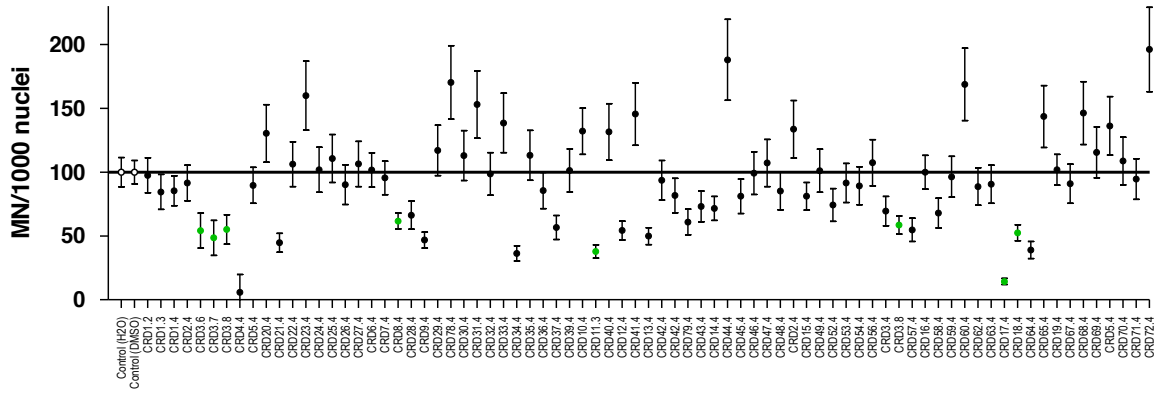
LFA55

Acetaldehyde induced damage



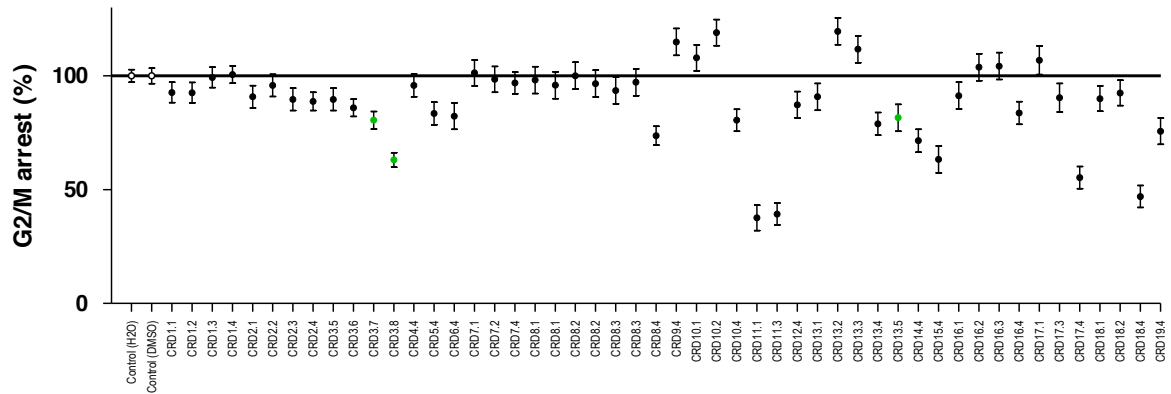
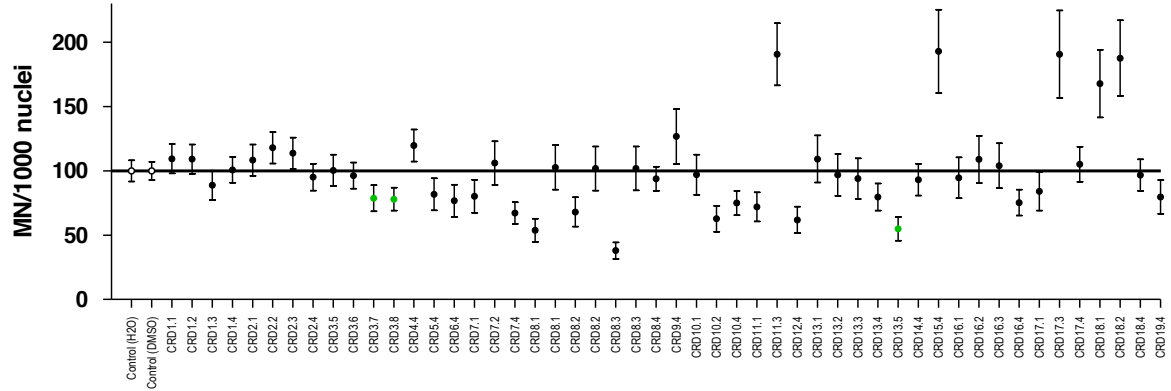
LFA55

Formaldehyde induced damage



LFA55

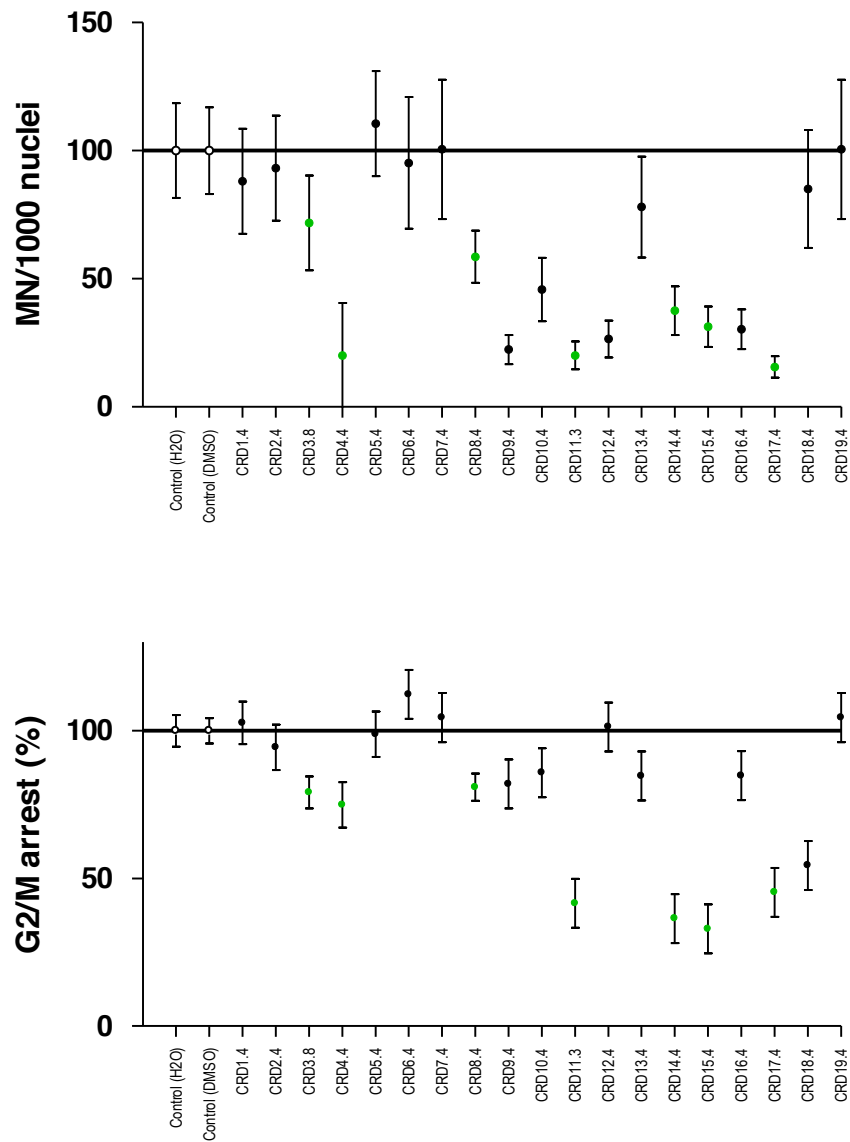
Spontaneous damage



B

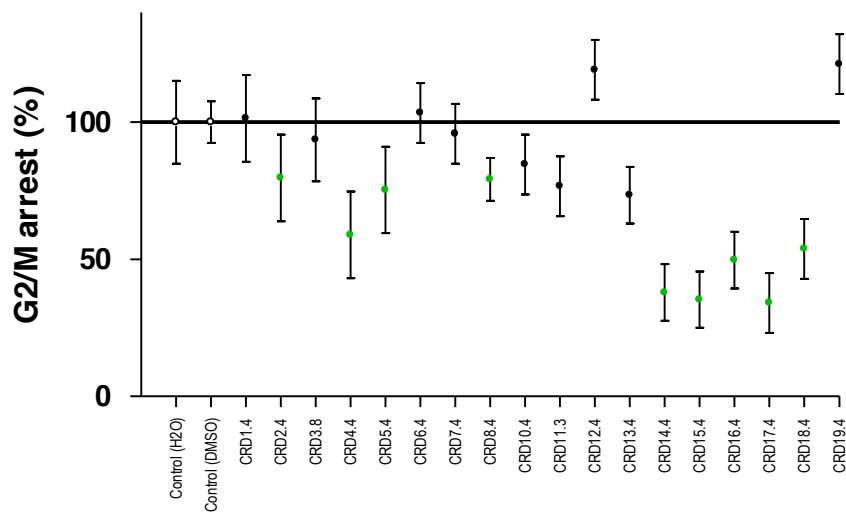
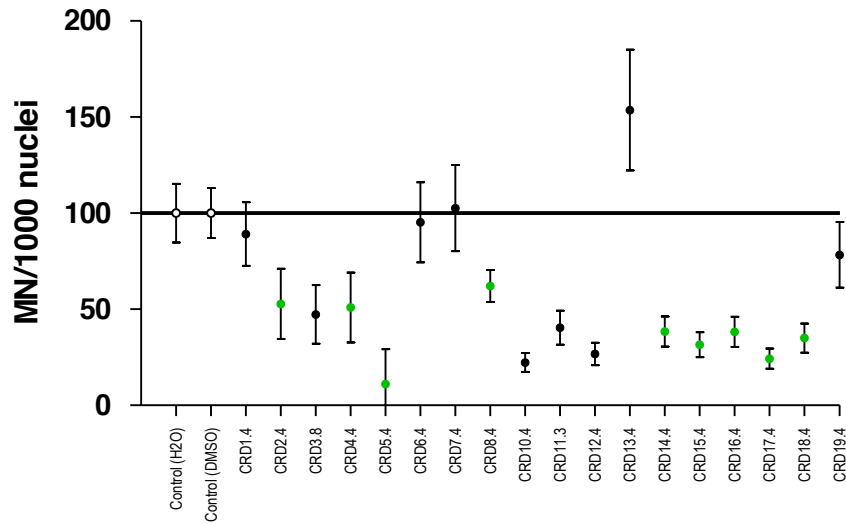
LFA88

DEB induced damage



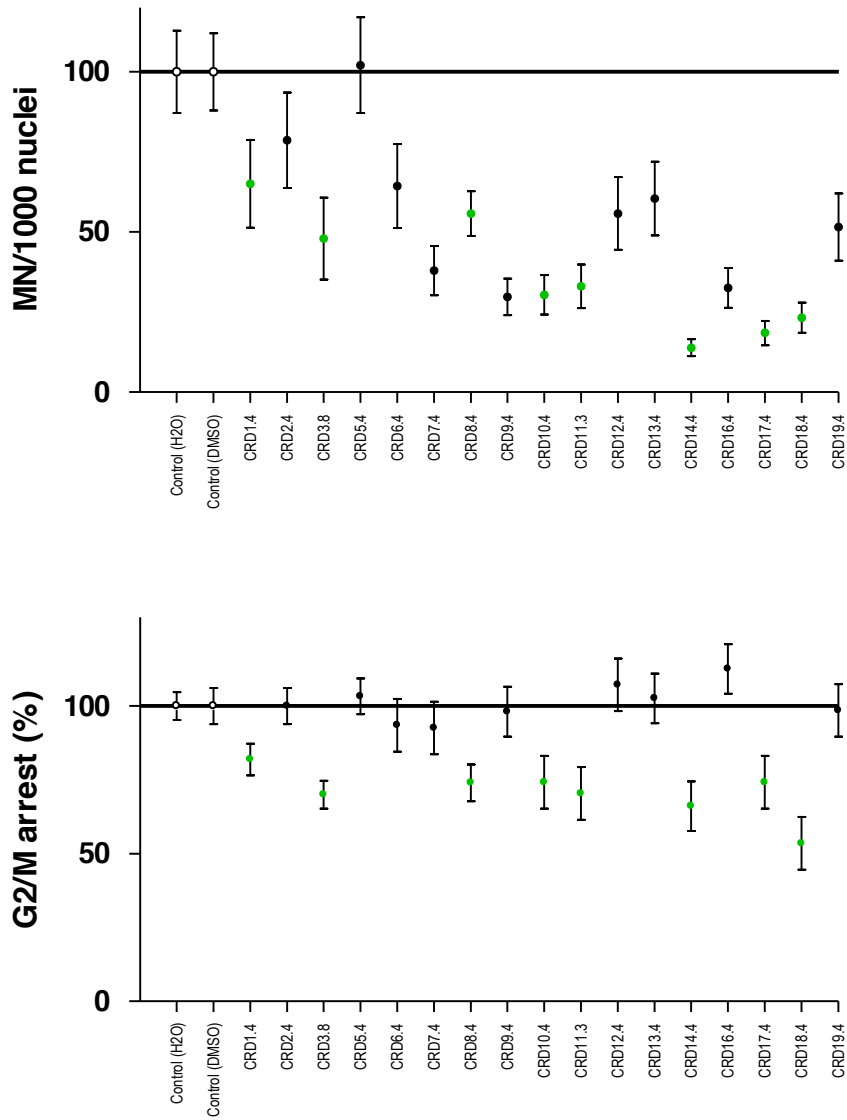
LFA88

Acetaldehyde induced damage



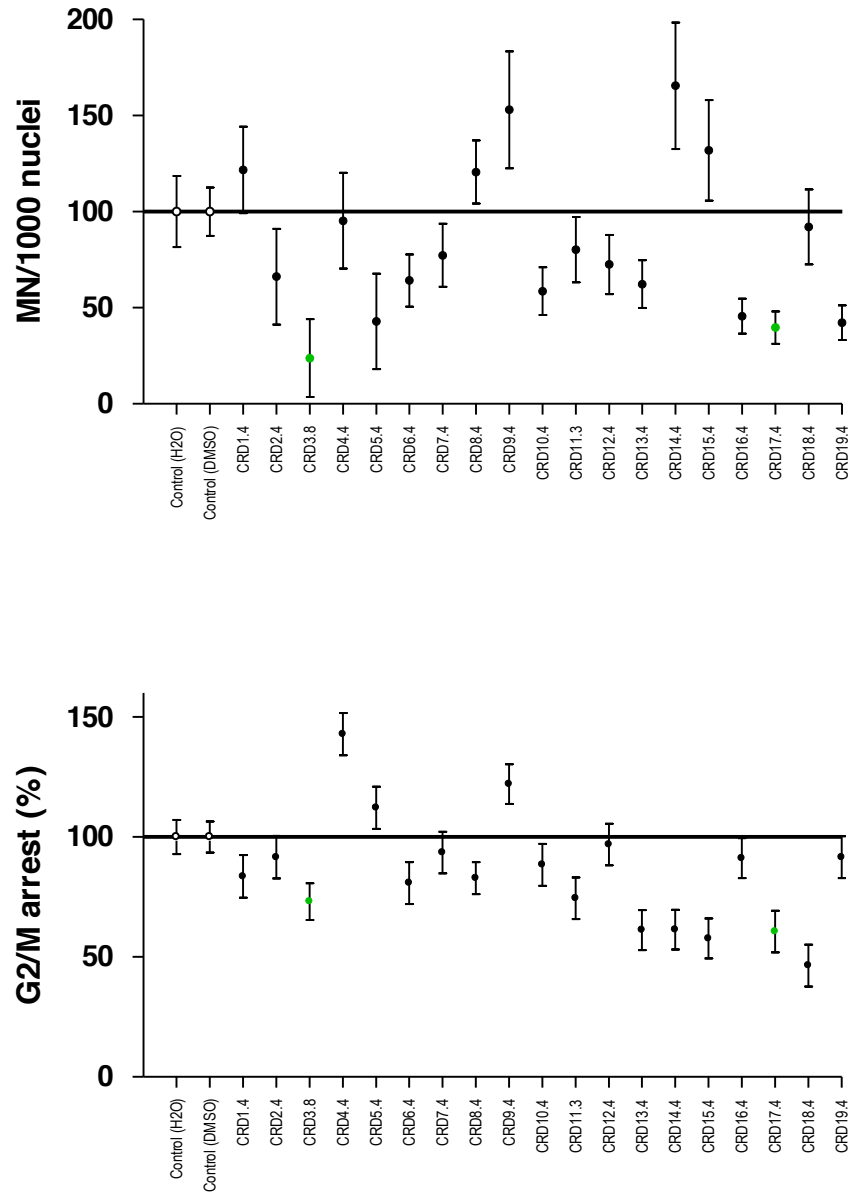
LFA88

Formaldehyde induced damage



LFA88

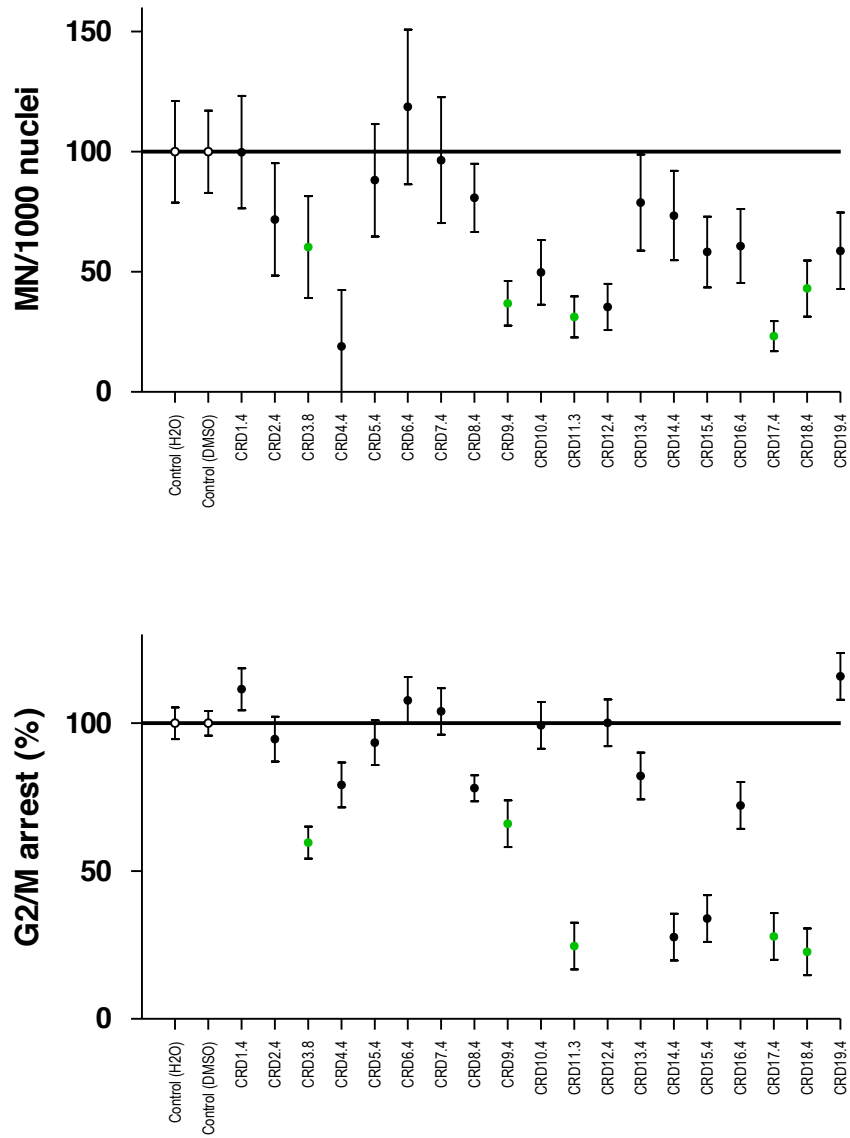
Spontaneous damage



c

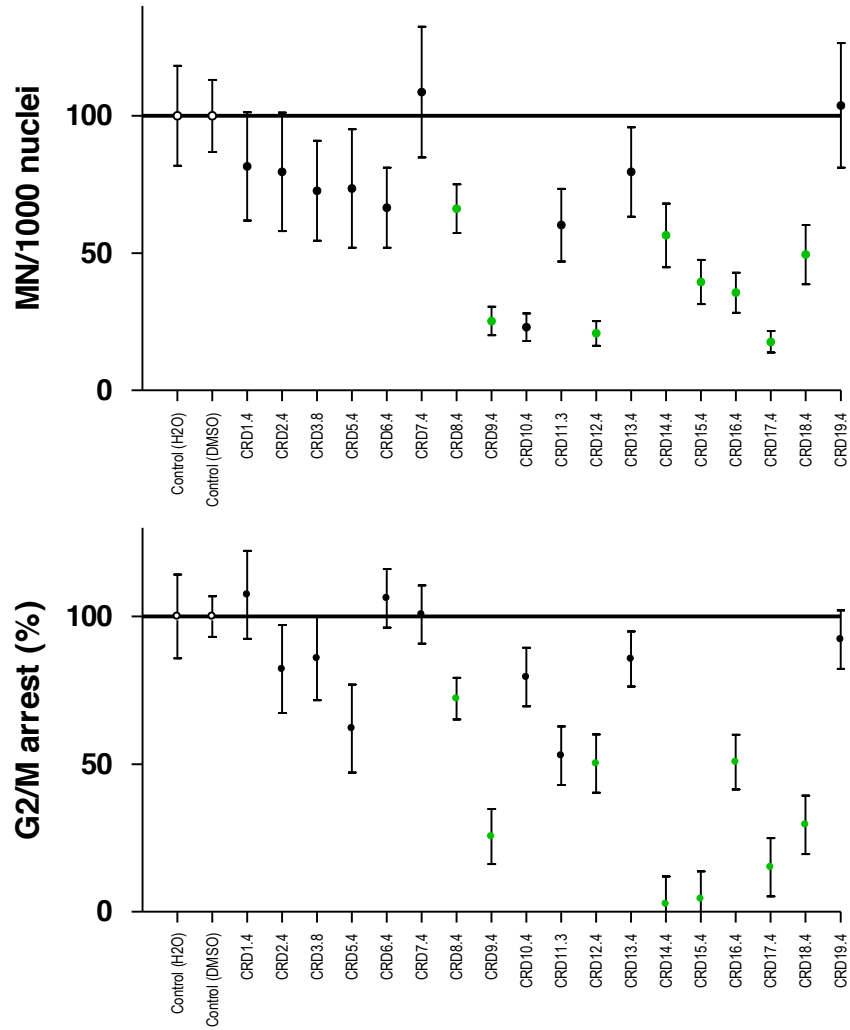
LFA145

DEB induced damage



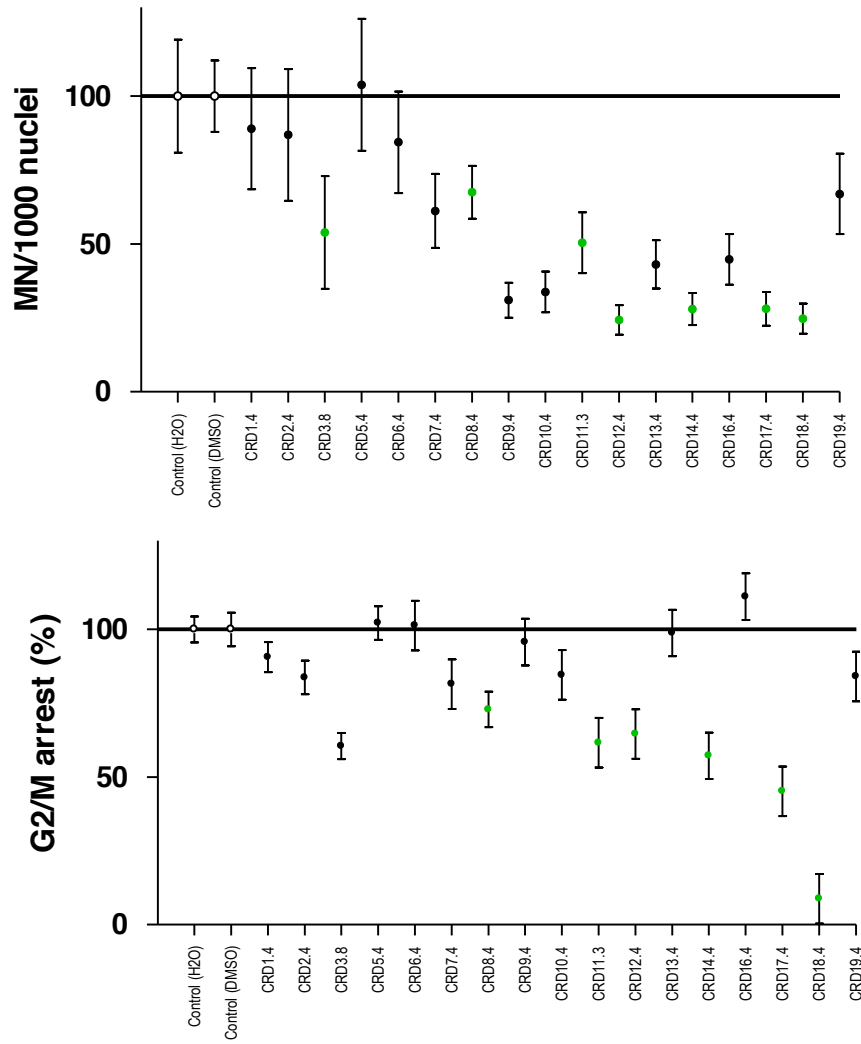
LFA145

Acetaldehyde induced damage



LFA145

Formaldehyde induced damage



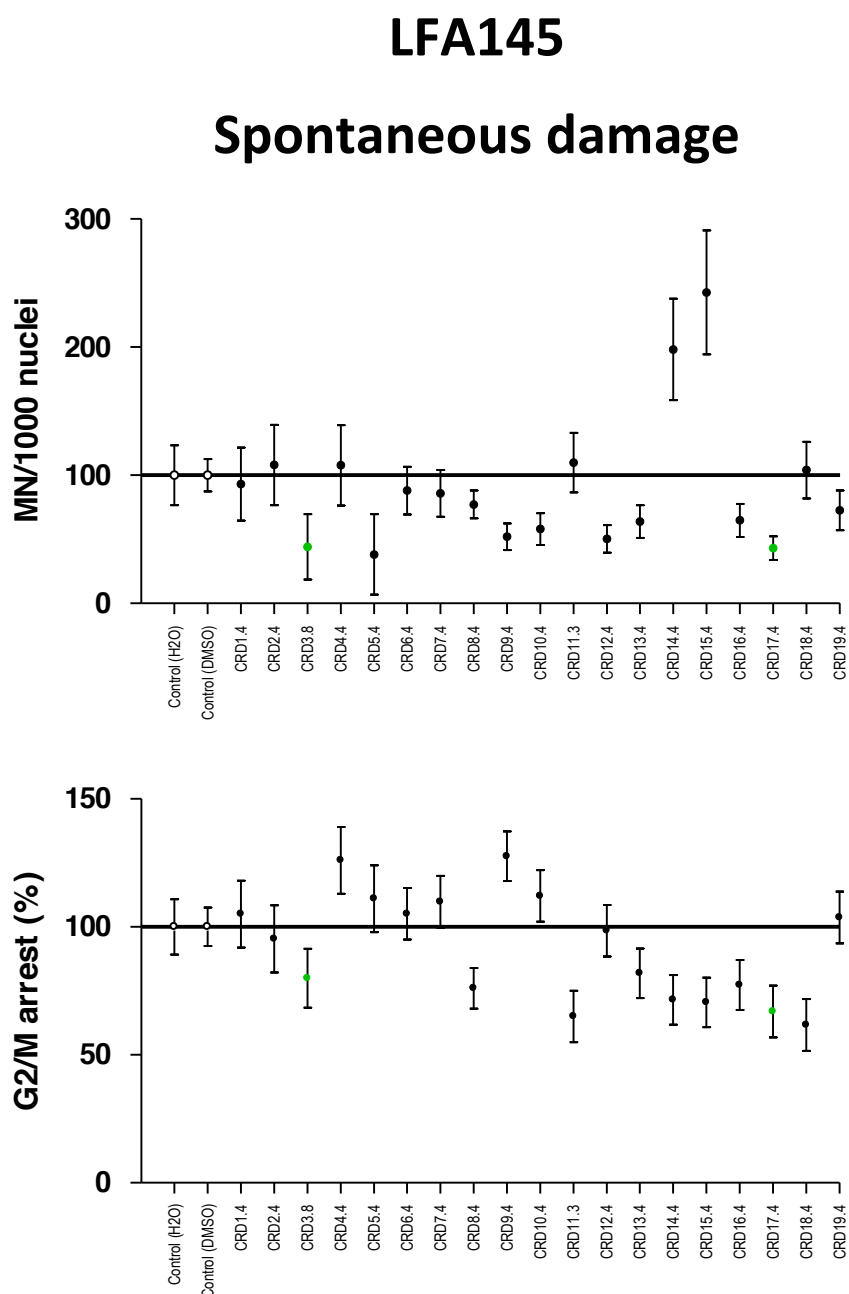


Figura A4. Efecte dels fàrmacs antioxidants en la fragilitat cromosòmica i la parada en G2/M induïda per diferents agents inductors d'ICLs i espontània en tres línies limfoblàstoids Fanconi. Les línies cel·lulars es van tractar amb els fàrmacs antioxidants en un rang de concentracions entre 10 i 10000 μM tant induint el dany amb DEB (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), formaldehid (200 μM durant 1 hora) i acetaldehid (5 mM) com de manera espontània. Es va utilitzar per un primer cribatge la línia cel·lular LFA55 (A) i per validar els resultats les línies LFA88 (B) i LFA145 (C). Els resultats es presenten com la freqüència de MN cada 1000 nuclis o el percentatge de cèl·lules en fase G2/M del cicle cel·lular. En el gràfic es mostra la mitja \pm SEM d'almenys 3 rèpliques. El control es correspon a la mostra sense tractar i està normalitzat al 100 %.

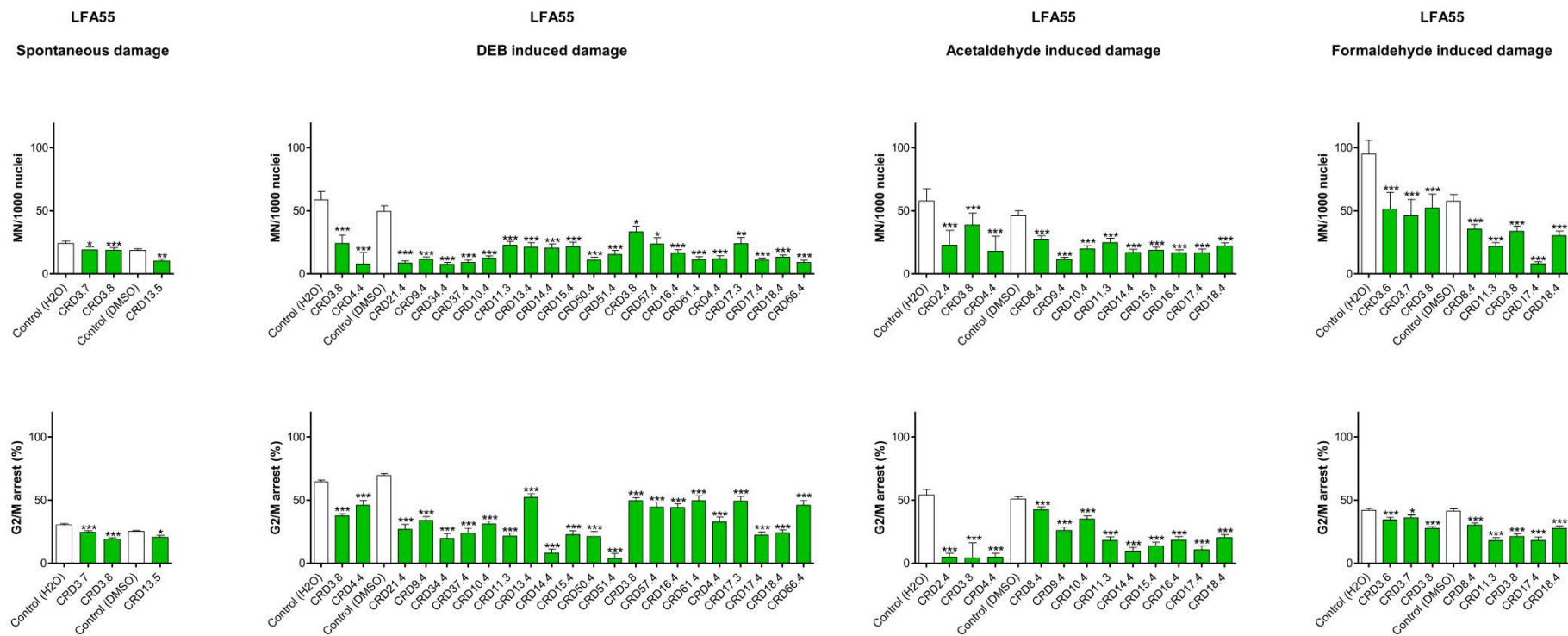
Drug	Cell Line	N	MN							G2								
			Mean	SD	Normalized data	SEM of normalized data	Normalized data to 0-100 scale	SEM of normalized data to 0-100 scale	p-value	Adjusted p-value	Mean	SD	Normalized data	SEM of normalized data	Normalized data to 0-100 scale	SEM of normalized data to 0-100 scale	p-value	Adjusted p-value
Solvent H2O / Spontaneous damage																		
Control	LFA55	35,0	22,7	8,6	24,0	2,0	100,0	8,2			30,6	4,1	30,5	0,8	100,0	2,8		
CRD3.7	LFA55	7,0	13,7	3,8	18,9	2,4	78,7	10,1	0,0025	0,0325	22,8	1,7	24,5	1,2	80,5	3,8	0,0001	0,0001
CRD3.8	LFA55	17,0	14,3	5,4	18,7	2,1	78,0	8,9	0,0001	0,0002	18,3	3,3	19,2	1,0	63,1	3,2	0,0001	0,0001
Solvent H2O / Diepoxybutane induced damage																		
Control	LFA55	16,0	57,9	14,9	58,8	6,6	100,0	11,3			64,6	7,5	64,4	1,7	100,0	2,7		
CRD3.8	LFA55	17,0	22,8	15,4	24,2	6,6	41,1	11,2	0,0001	0,0001	37,5	10,0	37,5	1,7	58,2	2,6	0,0001	0,0001
CRD4.4	LFA55	3,0	21,5	1,9	8,0	9,1	13,6	15,5	0,0001	0,0001	47,9	3,4	46,1	3,7	71,5	5,7	0,0001	0,0001
Solvent H2O / Acetaldehyde induced damage																		
Control	LFA55	12,0	61,2	18,4	57,9	9,5	100,0	16,4			54,2	7,6	54,2	4,3	100,0	7,9		
CRD2.4	LFA55	3,0	15,2	7,6	22,7	11,9	39,3	20,5	0,0001	0,0006	47,6	2,6	38,7	4,9	71,5	9,1	0,0001	0,0001
CRD3.8	LFA55	12,0	42,1	29,3	38,8	9,5	67,0	16,4	0,0001	0,0008	36,8	10,5	36,8	4,3	67,9	7,9	0,0001	0,0001
CRD4.4	LFA55	3,0	10,4	1,2	18,0	11,9	31,1	20,5	0,0001	0,0001	48,0	2,1	39,1	4,9	72,2	9,1	0,0001	0,0001
Solvent H2O / Formaldehyde induced damage																		
Control	LFA55	12,0	91,1	25,4	95,0	10,9	100,0	11,5			42,2	5,8	42,0	1,5	100,0	3,5		
CRD3.6	LFA55	3,0	86,9	12,1	51,5	13,0	54,2	13,7	0,0001	0,0001	36,3	0,8	34,4	2,1	81,9	4,9	0,0001	0,0003
CRD3.7	LFA55	3,0	81,4	9,8	46,0	13,0	48,5	13,7	0,0001	0,0001	38,1	2,9	36,2	2,1	86,2	4,9	0,0012	0,0106
CRD3.8	LFA55	12,0	48,4	31,8	52,3	10,9	55,1	11,5	0,0001	0,0001	27,8	3,0	27,6	1,5	65,8	3,5	0,0001	0,0001
Solvent DMSO / Spontaneous damage																		
Control	LFA55	82,0	20,1	10,2	18,5	1,3	100,0	7,1			25,4	5,2	25,2	0,8	100,0	3,4		
CRD13.5	LFA55	3,0	13,1	2,9	10,2	1,7	54,9	9,2	0,0001	0,0051	18,6	0,2	20,6	1,5	81,6	5,9	0,0003	0,0103
Solvent DMSO / Diepoxybutane induced damage																		
Control	LFA55	64,0	53,3	22,0	49,5	4,6	100,0	9,3			69,7	7,4	69,7	1,4	100,0	2,0		
CRD21.4	LFA55	3,0	8,7	1,2	8,6	1,7	17,5	3,5	0,0001	0,0001	39,9	5,7	26,9	3,9	38,7	5,6	0,0001	0,0001
CRD9.4	LFA55	6,0	16,3	7,0	11,6	1,8	23,4	3,7	0,0001	0,0001	34,7	4,3	33,9	3,0	48,7	4,3	0,0001	0,0001
CRD34.4	LFA55	3,0	7,7	0,9	7,7	1,5	15,6	3,1	0,0001	0,0001	32,5	4,1	19,6	3,9	28,1	5,6	0,0001	0,0001
CRD37.4	LFA55	3,0	9,5	3,6	9,2	1,8	18,6	3,7	0,0001	0,0001	36,8	3,1	23,9	3,9	34,3	5,6	0,0001	0,0001
CRD10.4	LFA55	11,0	13,1	6,2	12,5	1,7	25,3	3,5	0,0001	0,0001	25,6	15,3	31,1	2,5	44,6	3,5	0,0001	0,0001
CRD11.3	LFA55	11,0	24,2	10,4	22,8	3,0	46,1	6,1	0,0001	0,0001	21,8	6,8	21,5	2,4	30,8	3,5	0,0001	0,0001
CRD13.4	LFA55	6,0	30,3	22,3	21,4	3,4	43,3	6,8	0,0001	0,0001	55,7	2,4	52,3	3,0	75,1	4,3	0,0001	0,0001
CRD14.4	LFA55	6,0	28,6	9,4	20,5	3,2	41,5	6,5	0,0001	0,0001	15,3	2,1	8,2	2,9	11,8	4,2	0,0001	0,0001
CRD15.4	LFA55	6,0	28,5	5,9	21,6	3,4	43,6	6,9	0,0001	0,0001	23,4	16,3	22,6	3,0	32,4	4,3	0,0001	0,0001
CRD50.4	LFA55	3,0	11,2	0,8	11,2	2,2	22,7	4,5	0,0001	0,0001	34,1	2,3	21,2	3,9	30,4	5,6	0,0001	0,0001
CRD51.4	LFA55	3,0	18,8	15,2	15,4	3,1	31,1	6,2	0,0001	0,0001	16,9	0,9	3,9	3,9	5,6	5,6	0,0001	0,0001
CRD3.8	LFA55	9,0	29,5	10,1	33,2	4,6	67,0	9,3	0,0005	0,0386	55,8	9,9	49,5	2,5	71,1	3,6	0,0001	0,0001
CRD57.4	LFA55	3,0	15,2	3,4	23,7	4,9	48,0	10,0	0,0001	0,0104	50,2	9,5	44,6	4,0	64,0	5,8	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA55	6,0	23,6	10,4	16,6	2,6	33,6	5,3	0,0001	0,0001	51,3	4,4	44,2	2,9	63,5	4,2	0,0001	0,0001
CRD61.4	LFA55	3,0	11,9	4,4	11,4	2,3	23,1	4,6	0,0001	0,0001	62,4	5,2	49,5	3,9	71,0	5,6	0,0001	0,0001
CRD4.4	LFA55	3,0	12,2	3,0	12,0	2,4	24,3	4,9	0,0001	0,0001	45,6	2,1	32,7	3,9	46,9	5,6	0,0001	0,0001
CRD17.3	LFA55	4,0	25,0	5,3	24,0	4,8	48,6	9,7	0,0001	0,0057	39,2	4,0	49,2	3,8	70,7	5,5	0,0001	0,0001
CRD17.4	LFA55	10,0	14,7	6,7	11,1	1,5	22,4	3,1	0,0001	0,0001	17,3	10,9	22,4	2,5	32,1	3,6	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA55	14,0	14,6	7,7	13,3	1,6	26,9	3,3	0,0001	0,0001	27,2	17,7	24,2	2,2	34,7	3,1	0,0001	0,0001
CRD66.4	LFA55	3,0	9,1	1,4	9,1	1,8	18,4	3,7	0,0001	0,0001	58,8	1,6	45,9	3,9	65,8	5,6	0,0001	0,0001
Solvent DMSO / Acetaldehyde induced damage																		
Control	LFA55	37,0	49,4	21,2	46,0	4,1	100,0	8,9			51,0	7,2	51,0	2,0	100,0	3,9		
CRD8.4	LFA55	16,0	24,6	5,3	27,5	2,9	59,6	6,3	0,0001	0,0001	40,0	14,9	42,4	2,2	83,3	4,4	0,0001	0,0001
CRD9.4	LFA55	6,0	14,1	2,1	11,5	1,6	25,0	3,4	0,0001	0,0001	27,6	5,3	26,0	2,7	51,1	5,2	0,0001	0,0001

CRD10.4	LFA55	9,0	22,3	4,6	19,9	2,5	43,2	5,4	0,0001	0,0001	37,1	13,7	35,1	2,5	68,8	4,9	0,0001	0,0001
CRD11.3	LFA55	6,0	25,4	5,3	24,7	3,4	53,6	7,4	0,0001	0,0001	20,0	13,0	18,1	2,7	35,6	5,3	0,0001	0,0001
CRD14.4	LFA55	6,0	16,5	5,9	17,1	2,4	37,2	5,1	0,0001	0,0001	17,8	1,5	9,9	2,7	19,4	5,3	0,0001	0,0001
CRD15.4	LFA55	6,0	23,0	3,9	18,8	2,6	40,8	5,6	0,0001	0,0001	15,5	4,6	13,9	2,7	27,2	5,2	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA55	6,0	19,4	5,5	16,8	2,3	36,5	5,1	0,0001	0,0001	22,1	2,2	18,4	2,7	36,2	5,3	0,0001	0,0001
CRD17.4	LFA55	3,0	17,4	3,2	16,8	2,9	36,5	6,3	0,0001	0,0001	21,2	2,1	10,7	3,2	21,0	6,3	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA55	12,0	23,3	6,8	22,1	2,5	48,1	5,5	0,0001	0,0001	23,4	6,9	20,2	2,4	39,7	4,6	0,0001	0,0001
Solvent DMSO / Formaldehyde induced damage																		
Control	LFA55	33,0	60,9	26,5	57,6	5,3	100,0	9,2			41,0	6,4	41,4	1,7	100,0	4,1		
CRD8.4	LFA55	17,0	41,3	13,1	35,6	3,6	61,7	6,3	0,0001	0,0001	32,0	8,8	30,2	1,8	72,9	4,4	0,0001	0,0001
CRD11.3	LFA55	6,0	22,8	4,3	21,8	3,0	37,9	5,2	0,0001	0,0001	14,5	4,6	18,0	2,2	43,6	5,4	0,0001	0,0001
CRD3.8	LFA55	8,0	26,5	3,4	33,8	4,1	58,6	7,1	0,0001	0,0001	22,2	2,2	21,2	2,1	51,2	5,0	0,0001	0,0001
CRD17.4	LFA55	3,0	10,8	0,5	8,2	1,4	14,3	2,4	0,0001	0,0001	17,4	0,5	18,1	2,6	43,7	6,4	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA55	9,0	29,8	6,6	30,3	3,6	52,5	6,3	0,0001	0,0001	26,7	11,6	27,6	2,0	66,6	4,9	0,0001	0,0001

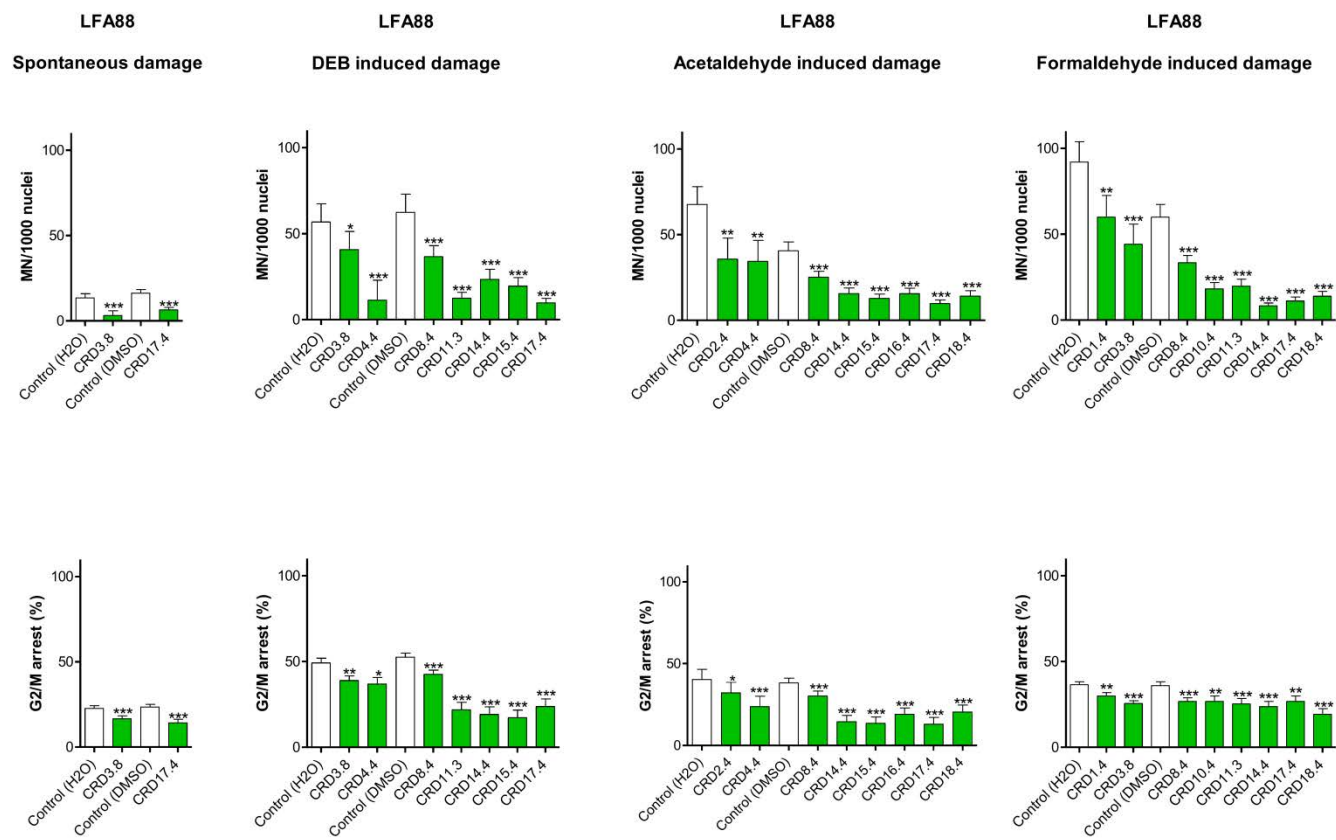
Drug	Cell Line	N	MN							G2								
			Mean	SD	Normalized data	SEM of normalized data	Normalized data to 0-100 scale	SEM of normalized data to 0-100 scale	p-value	Adjusted p-value	Mean	SD	Normalized data	SEM of normalized data	Normalized data to 0-100 scale	SEM of normalized data to 0-100 scale	p-value	Adjusted p-value
Solvent H2O / Spontaneous damage																		
Control	LFA88	9,0	21,1	2,4	13,4	2,5	100,0	18,5			22,6	2,5	22,6	1,6	100,0	7,2		
CRD3.8	LFA88	6,0	10,1	4,8	3,2	2,7	23,8	20,2	0,0001	0,0001	17,8	2,5	16,6	1,7	73,1	7,7	0,0001	0,0001
Solvent H2O / Diepoxybutane induced damage																		
Control	LFA88	6,0	56,8	16,2	56,8	10,5	100,0	18,5			49,1	5,1	49,2	2,7	100,0	5,4		
CRD3.8	LFA88	6,0	40,8	14,8	40,8	10,5	71,8	18,5	0,0068	0,0313	38,8	2,5	38,9	2,7	79,1	5,4	0,0020	0,0094
CRD4.4	LFA88	3,0	23,8	1,8	11,3	11,6	20,0	20,5	0,0001	0,0001	35,4	4,0	36,9	3,8	74,9	7,7	0,0034	0,0160
Solvent H2O / Acetaldehyde induced damage																		
Control	LFA88	6,0	62,0	19,3	67,6	10,4	100,0	15,3			40,3	3,8	40,3	6,1	100,0	15,1		
CRD2.4	LFA88	3,0	37,8	5,6	35,7	12,3	52,8	18,2	0,0004	0,0020	37,1	1,7	32,1	6,4	79,7	15,8	0,0084	0,0382
CRD4.4	LFA88	3,0	36,5	1,0	34,4	12,3	50,9	18,2	0,0002	0,0012	28,7	5,2	23,7	6,4	58,9	15,8	0,0001	0,0001
Solvent H2O / Formaldehyde induced damage																		
Control	LFA88	6,0	81,8	16,9	92,0	11,8	100,0	12,8			35,7	2,1	36,5	1,7	100,0	4,7		
CRD1.4	LFA88	3,0	37,4	7,7	59,9	12,7	65,1	13,7	0,0008	0,0030	28,9	2,9	29,9	2,0	81,9	5,4	0,0006	0,0024
CRD3.8	LFA88	6,0	33,8	14,5	44,1	11,8	47,9	12,8	0,0001	0,0001	24,8	2,1	25,5	1,7	70,0	4,7	0,0001	0,0001
Solvent DMSO / Spontaneous damage																		
Control	LFA88	24,0	18,8	6,3	16,2	2,0	100,0	12,6			24,0	2,5	23,6	1,5	100,0	6,5		
CRD17.4	LFA88	3,0	8,9	0,8	6,4	1,4	39,7	8,4	0,0001	0,0001	14,5	0,2	14,3	2,1	60,6	8,7	0,0001	0,0001
Solvent DMSO / Diepoxybutane induced damage																		
Control	LFA88	18,0	67,4	26,1	62,4	10,6	100,0	16,9			51,3	4,7	52,6	2,3	100,0	4,3		
CRD8.4	LFA88	15,0	44,3	21,3	36,6	6,4	58,6	10,2	0,0001	0,0001	41,8	6,3	42,6	2,4	80,9	4,6	0,0001	0,0001
CRD11.3	LFA88	3,0	12,5	1,2	12,5	3,4	20,1	5,4	0,0001	0,0001	17,7	2,2	21,9	4,4	41,6	8,3	0,0001	0,0001
CRD14.4	LFA88	3,0	37,6	0,9	23,4	5,9	37,5	9,5	0,0001	0,0001	16,4	0,4	19,2	4,4	36,4	8,3	0,0001	0,0001
CRD15.4	LFA88	3,0	31,4	2,8	19,6	4,9	31,3	7,9	0,0001	0,0001	14,5	0,1	17,3	4,4	32,9	8,3	0,0001	0,0001
CRD17.4	LFA88	3,0	9,9	2,6	9,8	2,6	15,6	4,2	0,0001	0,0001	19,7	1,2	23,8	4,4	45,3	8,3	0,0001	0,0001
Solvent DMSO / Acetaldehyde induced damage																		
Control	LFA88	18,0	44,9	22,8	40,5	5,3	100,0	13,0			37,9	3,8	38,2	2,9	100,0	7,6		
CRD8.4	LFA88	15,0	26,4	13,3	25,2	3,4	62,1	8,3	0,0001	0,0001	30,8	4,7	30,2	3,0	79,2	7,8	0,0001	0,0001
CRD14.4	LFA88	3,0	15,8	2,3	15,6	3,2	38,4	7,9	0,0001	0,0001	19,5	1,8	14,5	3,9	37,9	10,3	0,0001	0,0001
CRD15.4	LFA88	3,0	13,0	2,3	12,8	2,6	31,6	6,5	0,0001	0,0001	18,5	1,6	13,5	3,9	35,3	10,3	0,0001	0,0001
CRD16.4	LFA88	3,0	15,6	2,0	15,5	3,2	38,2	7,8	0,0001	0,0001	23,9	1,5	19,0	3,9	49,7	10,3	0,0001	0,0001
CRD17.4	LFA88	3,0	13,1	3,6	9,8	2,1	24,3	5,3	0,0001	0,0001	8,7	1,0	13,0	4,2	34,1	10,9	0,0001	0,0001
CRD18.4	LFA88	3,0	18,6	2,5	14,2	3,1	35,0	7,6	0,0001	0,0001	16,2	1,7	20,5	4,2	53,8	10,9	0,0001	0,0001

Taula A2. Dades dels fàrmacs candidats que van reduir tant la freqüència de MN i parada en G2/M.

A



B



C

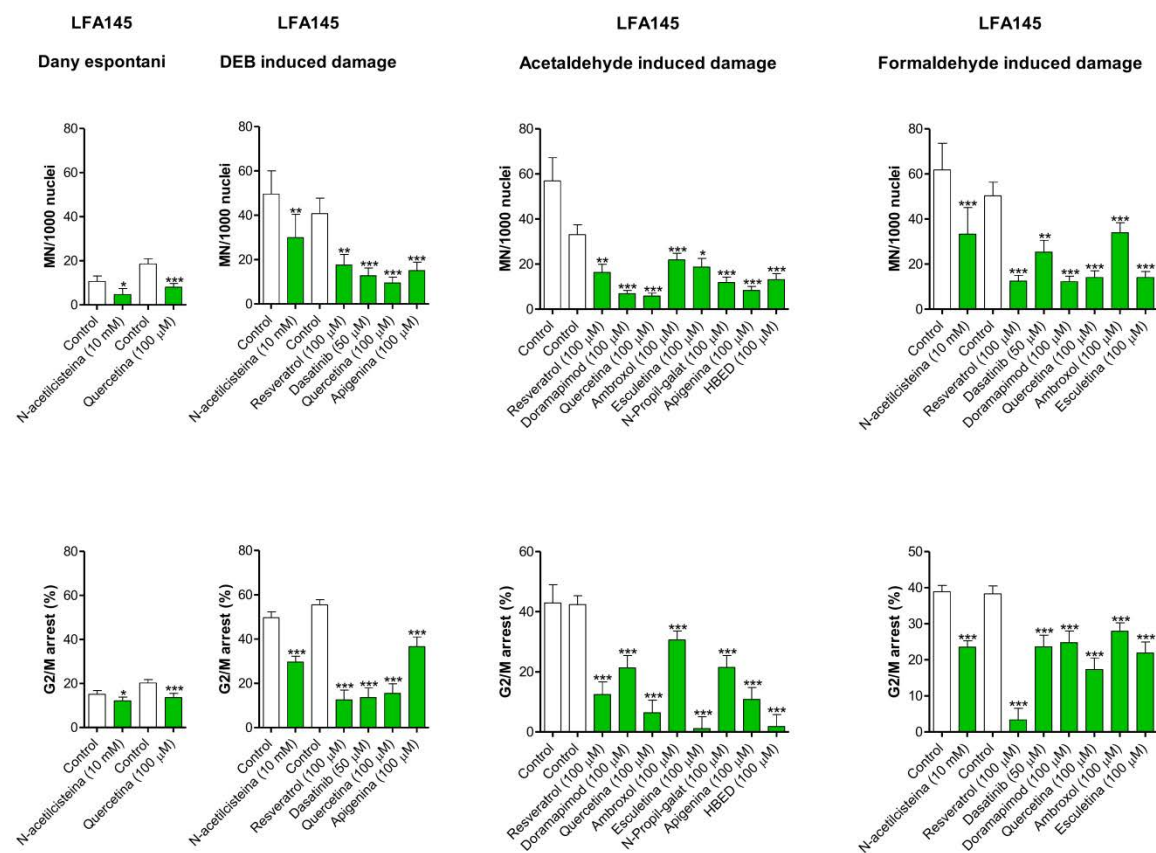
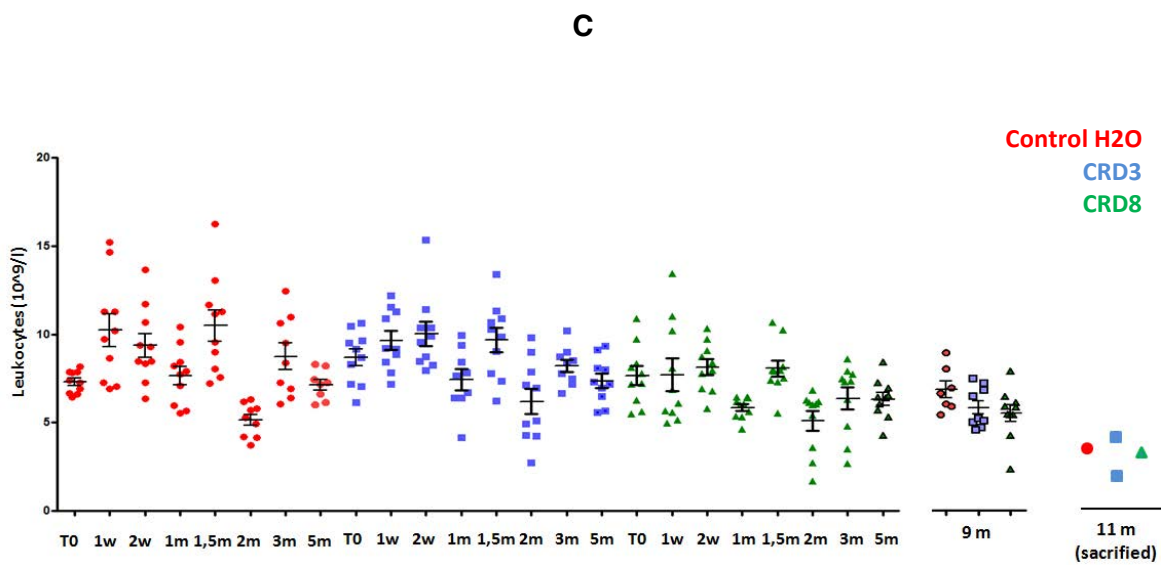
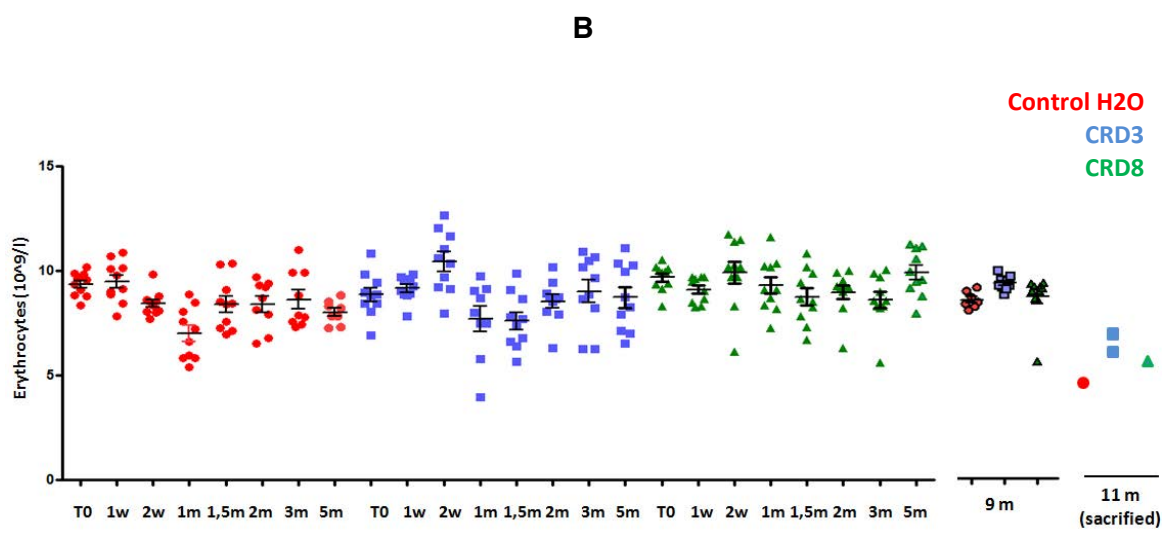
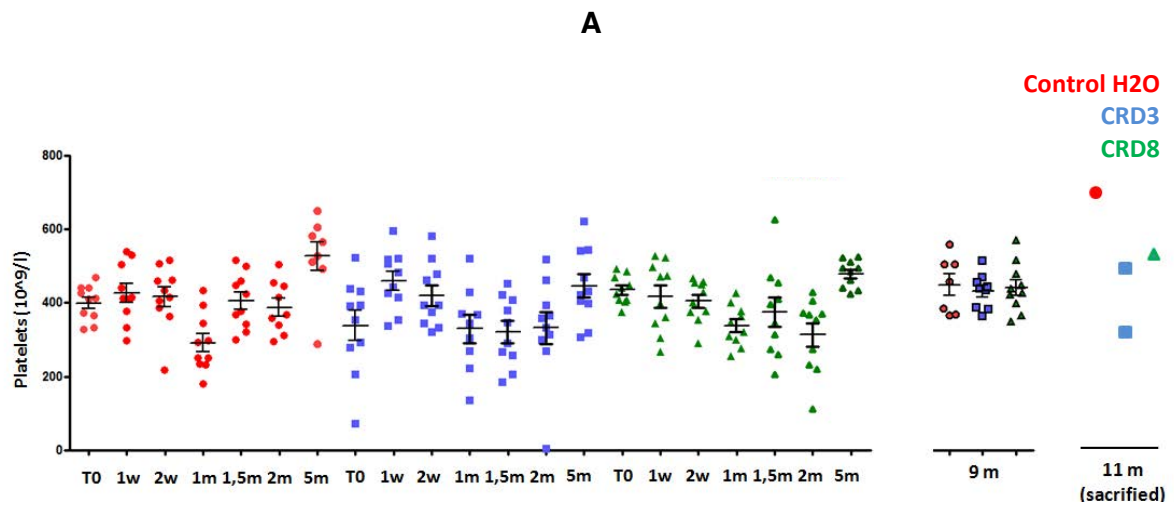


Figura A5. Fàrmacs candidats que van reduir la fragilitat cromosòmica i la parada en G2/M induïda. Les línies cel·lulars es van tractar amb els fàrmacs antioxidants en un rang de concentracions entre 10 i 10000 µM tant induint el dany amb DEB (0,1 µg/ml), formaldehid (200 µM) durant 1 hora) i acetaldehid (5 mM) com de manera espontània. Es va utilitzar per un primer cribatge la línia cel·lular LFA55 (A) i per validar els resultats les línies LFA88 (B) i LFA145 (C). Els resultats es presenten com la freqüència de MN cada 1000 nuclis o el percentatge de cèl·lules en fase G2/M del cicle cel·lular. En el gràfic es mostra la mitja ± SEM d'almenys 3 rèpliques. El control es correspon a la mostra sense tractar i està normalitzat al 100 %.



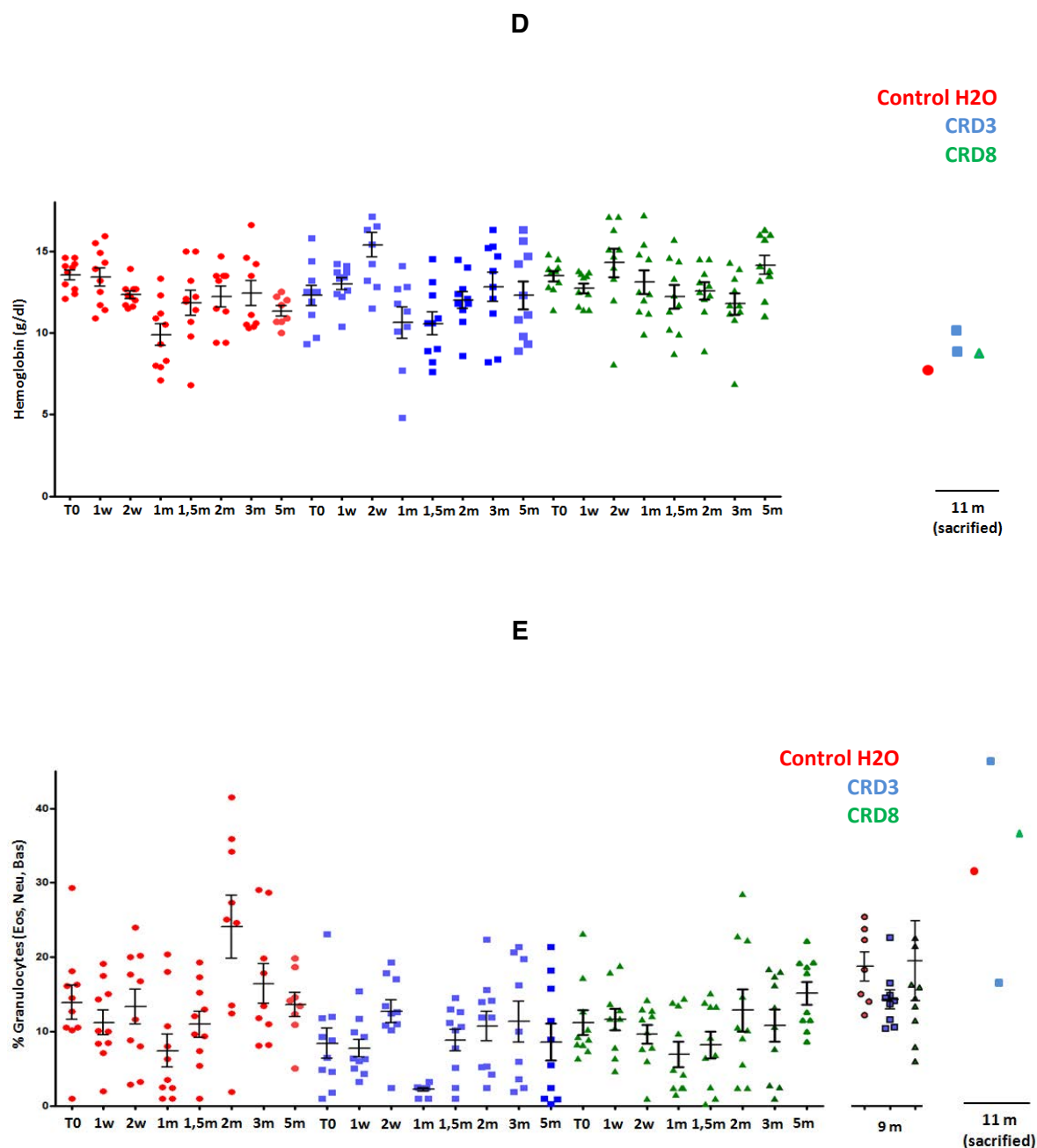


Figura A6. Paràmetres hematològics dels ratolins Fanconi que van rebre tractament de CRD3 i CRD8. Durant les setmanes 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36 i 44 es van obtenir mostres de sang per un tall a la vena coccígia tant dels ratolins no tractats com dels ratolins tractats amb els dos fàrmacs d'estudi i es van determinar els valors de plaquetes (A), eritròcits (B), leucòcits (C), hemoglobina (D) i granulòcits (E).

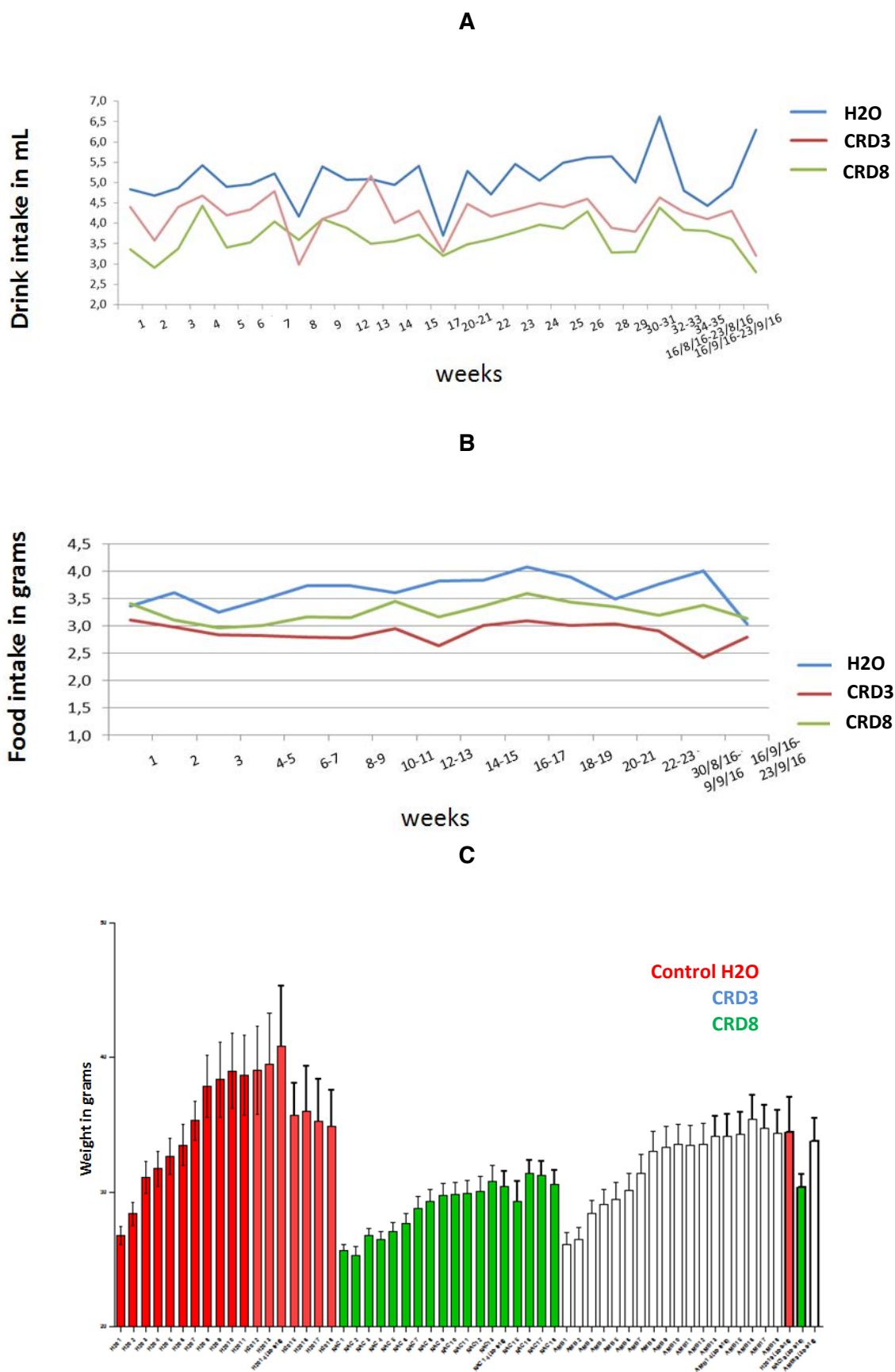


Figura A7. La ingesta de menjar i d'aigua bevable i el pes dels animals va ser menor en els animals que van rebre tractament de fàrmacs antioxidants. Durant les setmanes 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36 i 44 es van prendre els valors de la ingesta de beguda (A) i es van pesar els animals (C).

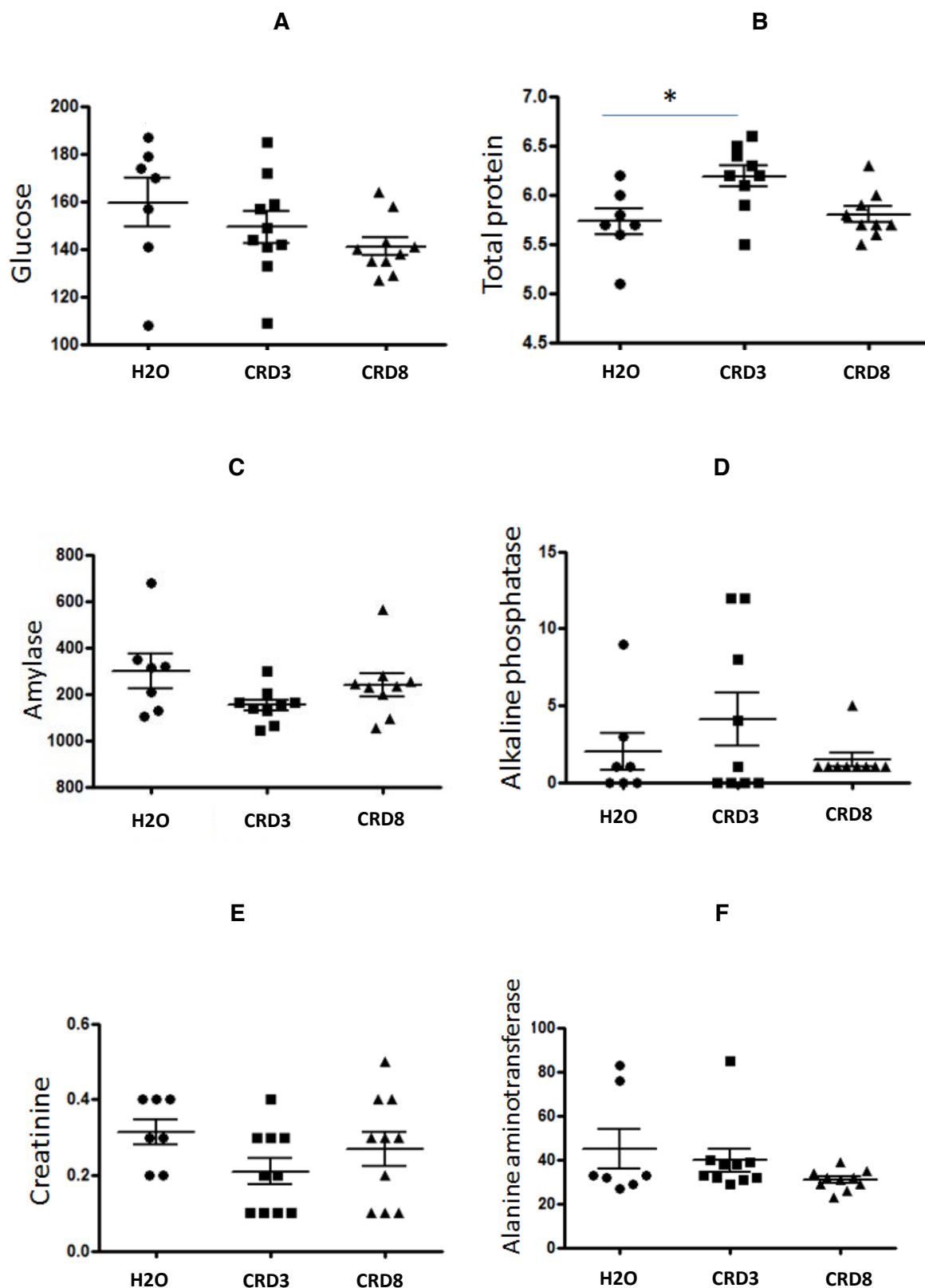


Figura A8. Anàlisi dels paràmetres bioquímics dels animals sacrificats. Un cop acabat l'estudi, es van sacrificar els animals i es va realitzar un anàlisi de la bioquímica bàsica, per conèixer els nivells de glucosa (mg/dl) (A), proteïna total (g/dl) (B), amilasa U/l (C), fosfatasa alcalina (U/l) (D), creatinina (mg/dl) (E) i alanina aminotransferasa (U/l) (F), i així saber l'estat general de l'animal al final del tractament.

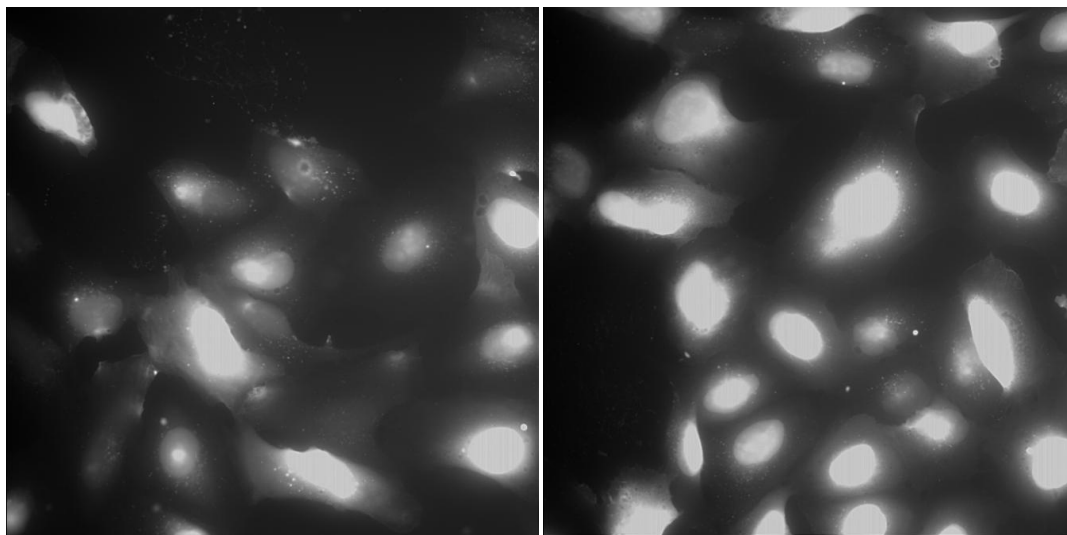
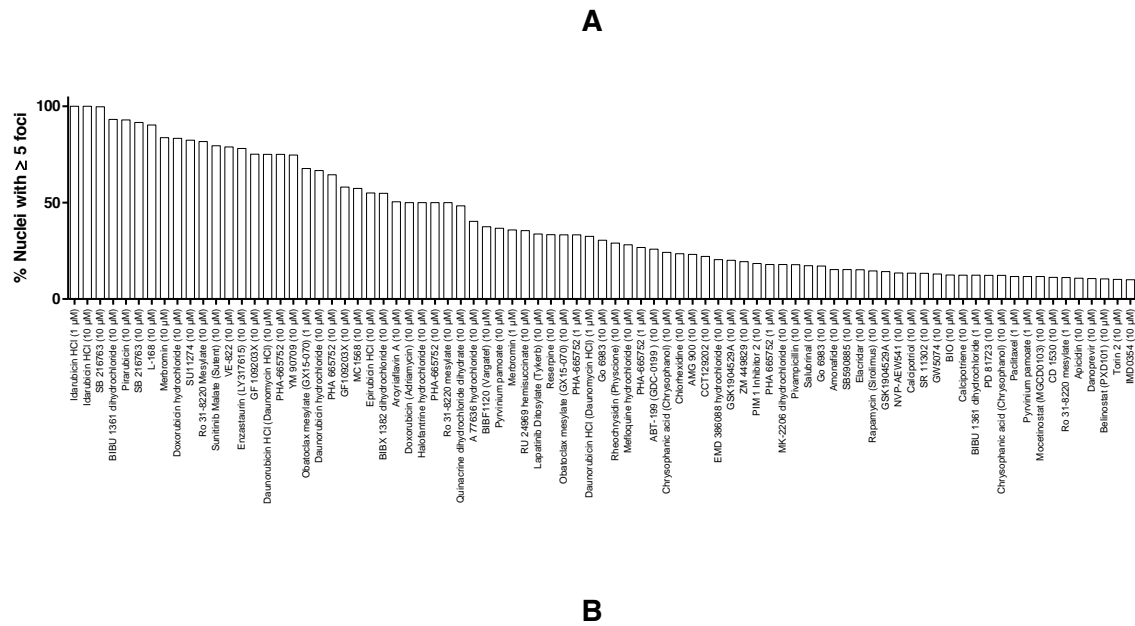
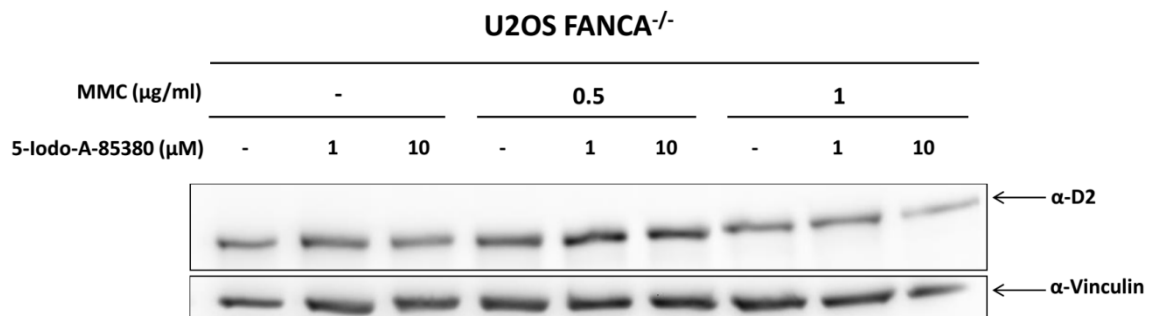
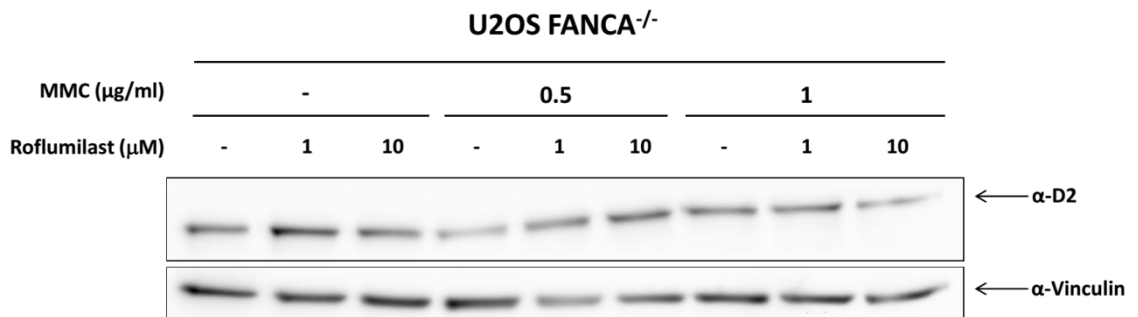


Figura A9. L'anàlisi d'imatges identifica 83 falsos positius amb més d'un 10 % de nuclis amb *foci*. Compostos falsos positius detectats amb el software d'anàlisi amb un 10 % de nuclis amb 5 o més *foci* (A). Imatges dels nuclis autofluorescents falsos positius identificats amb presència de 5 o més *foci* de manera errònia (B). Els fàrmacs candidats obtinguts a partir de l'anàlisi automàtic de les imatges es van comprovar visualment una per una per validar la presència de nuclis amb 5 o més *foci*. Els resultats s'expressen com el percentatge de nuclis amb 5 o més *foci* dividit entre els nuclis totals.

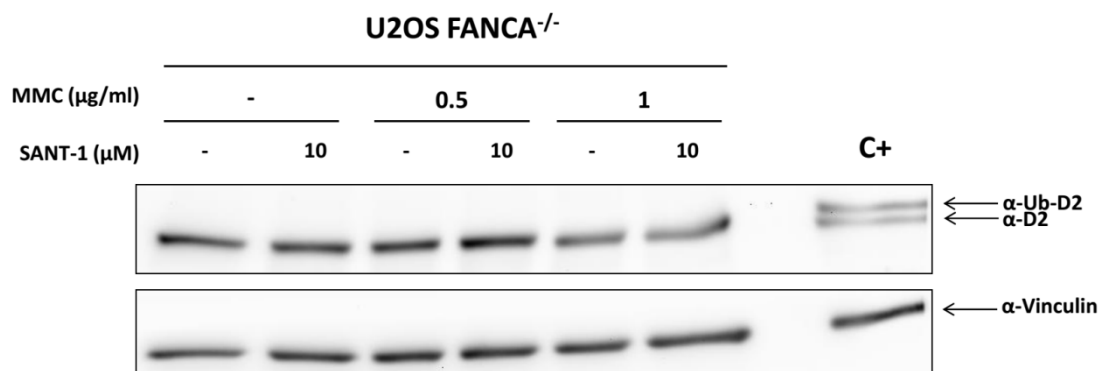
A



B



C



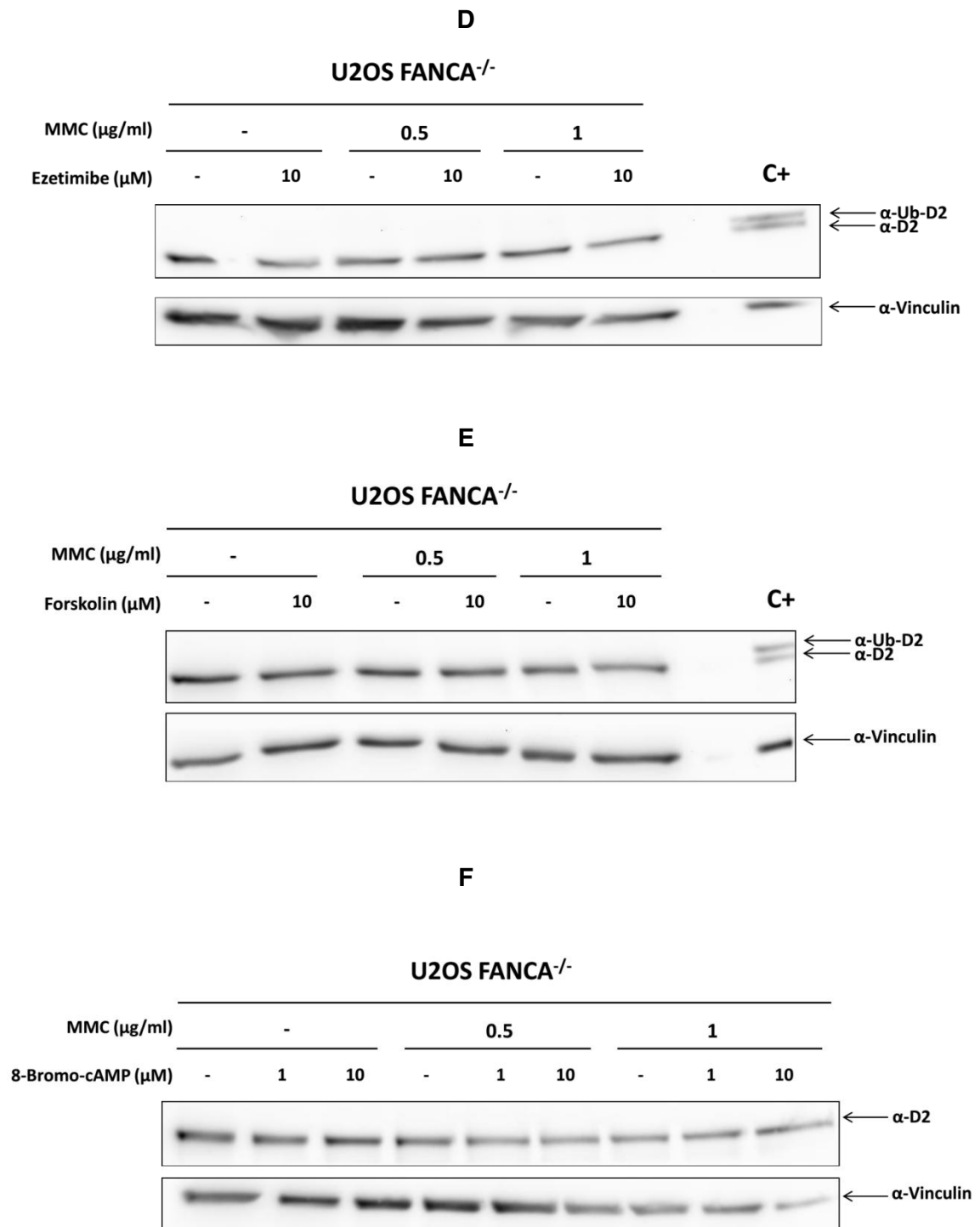


Figura A10. Anàlisi de l'expressió de FANCD2 monoubiquitinada després del tractament amb els fàrmacs candidats per reactivar la ruta FA/BRCA. Les cèl·lules es van tractar amb els fàrmacs 5-Iodo-A-85380 (A), roflumilast (B) i 8-Bromo-cAMP (F) a dosis 1 i 10 µM i amb SANT-1 (C), ezetimibe (D), forskolin (E) i AG 555 (figura 42 de resultats) a dosis 10 µM, com també es van exposar a la MMC a dosis 0,5, 1 i 2 µg/ml durant 24 hores. Les cèl·lules es van lissar i es va observar l'expressió de FANCD2 per WB, utilitzant la vinculina com a control de càrrega.

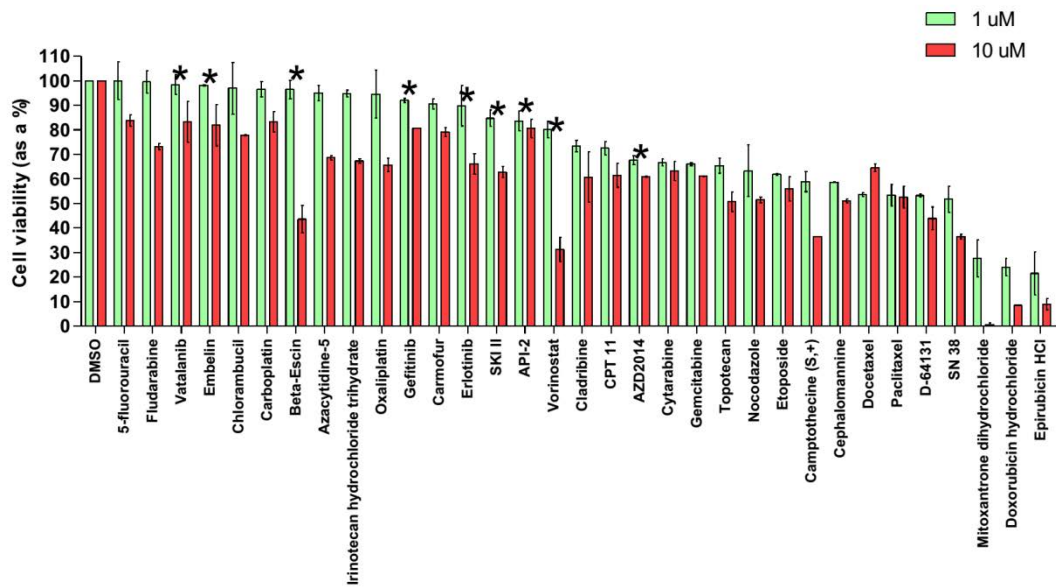


Figura A11. Fàrmacs antitumorals que van reduir, al menys, un 20 % la supervivència de les cèl·lules U2OS FANCA^{-/-}. La línia U2OS FANCA^{-/-} es va tractar durant 48 hores amb 3.800 compostos diferents a concentracions de 1 i 10 μM i amb HU a una dosi 2 mM durant 24 hores. En el gràfic es mostren els compostos que van reduir la viabilitat cel·lular un 20 % tant a 1 com a 10 μM. El control sense tractament de fàrmac està normalitzat al 100 % i els resultats es presenten com el percentatge de cèl·lules vives respecte les cèl·lules sense tractament. En el gràfic es mostra la mitjana ± SD de dues rèpliques. Els asteriscs mostren els compostos que segons revisió bibliogràfica el seu mecanisme d'acció no indueix dany al DNA.

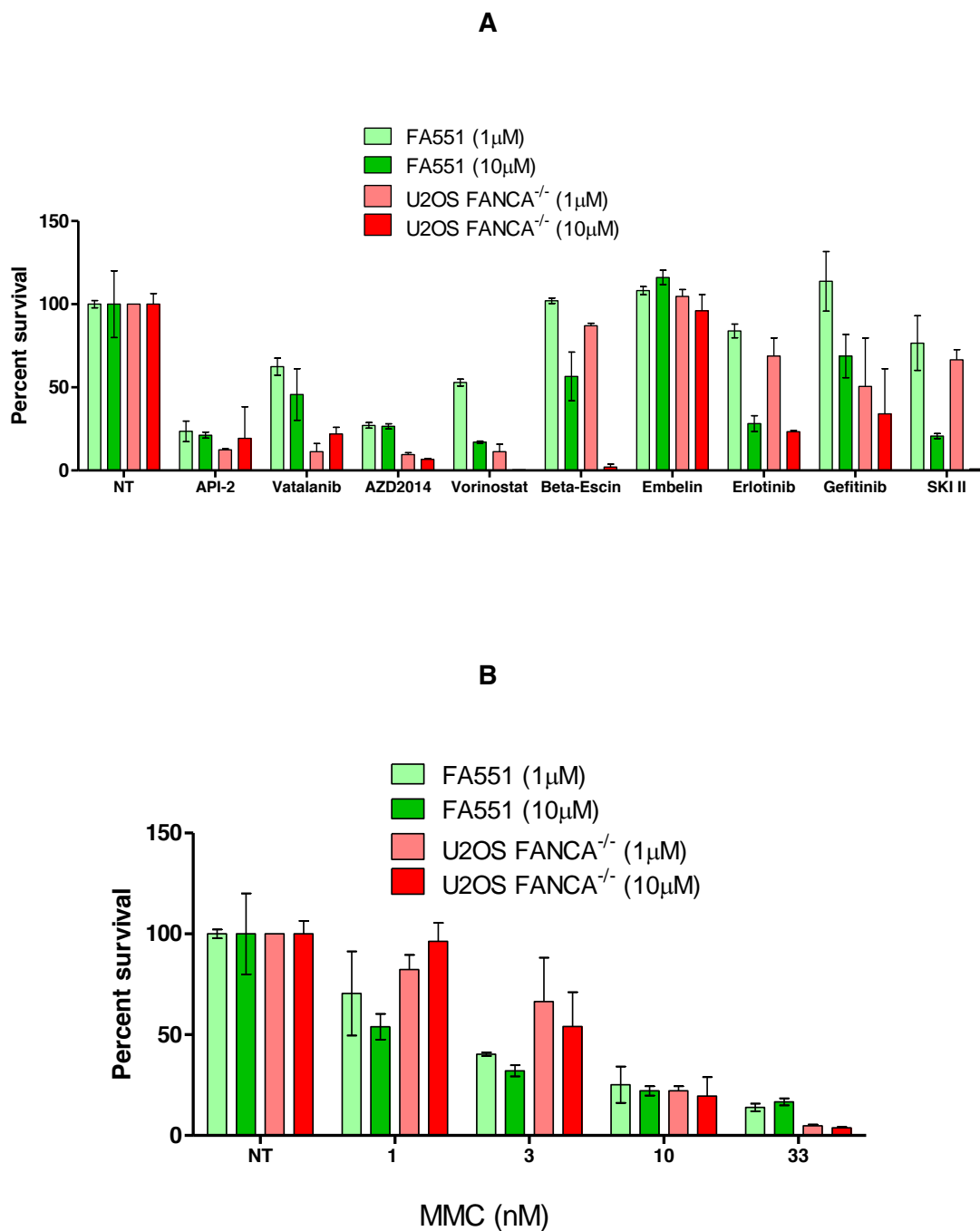
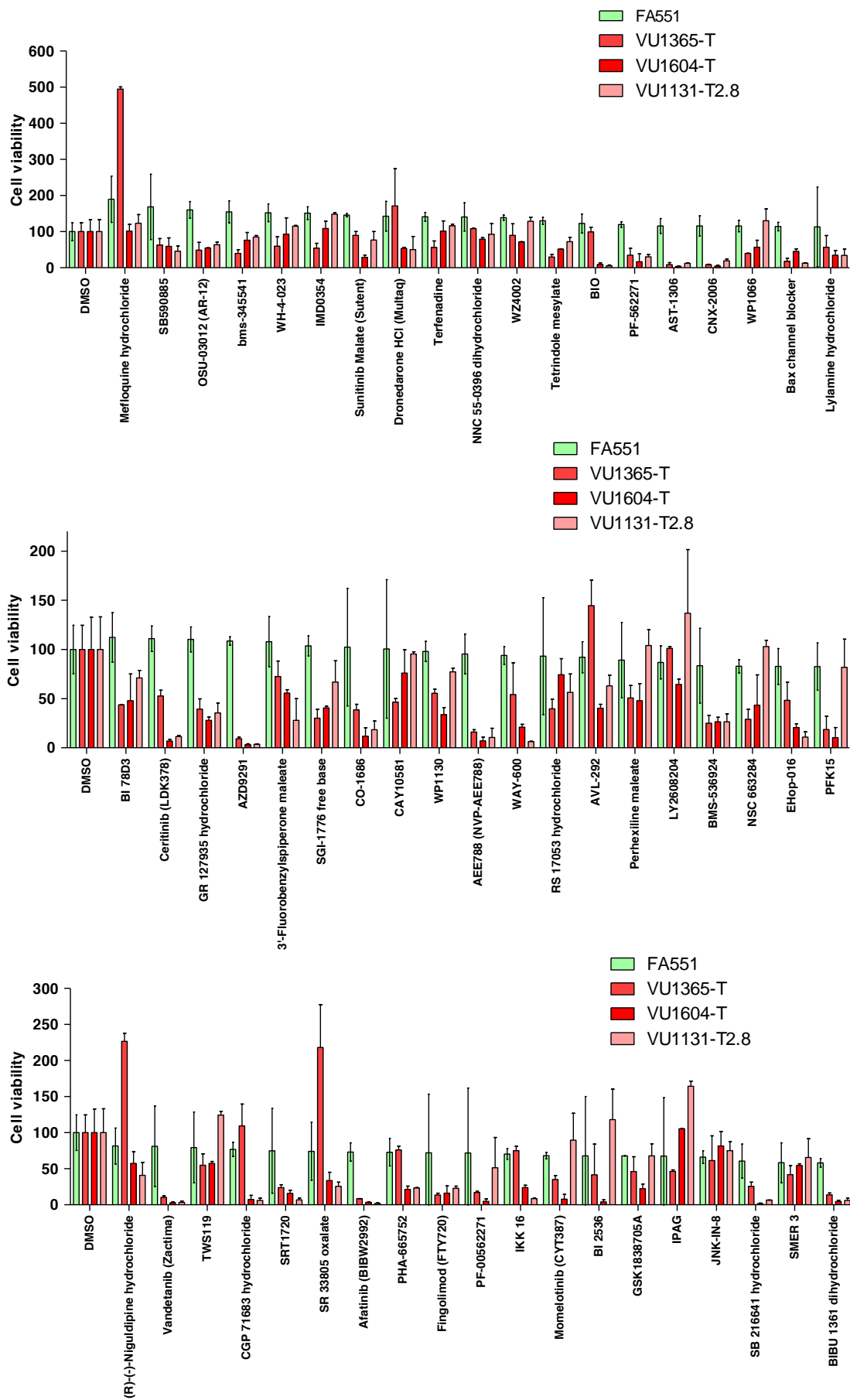
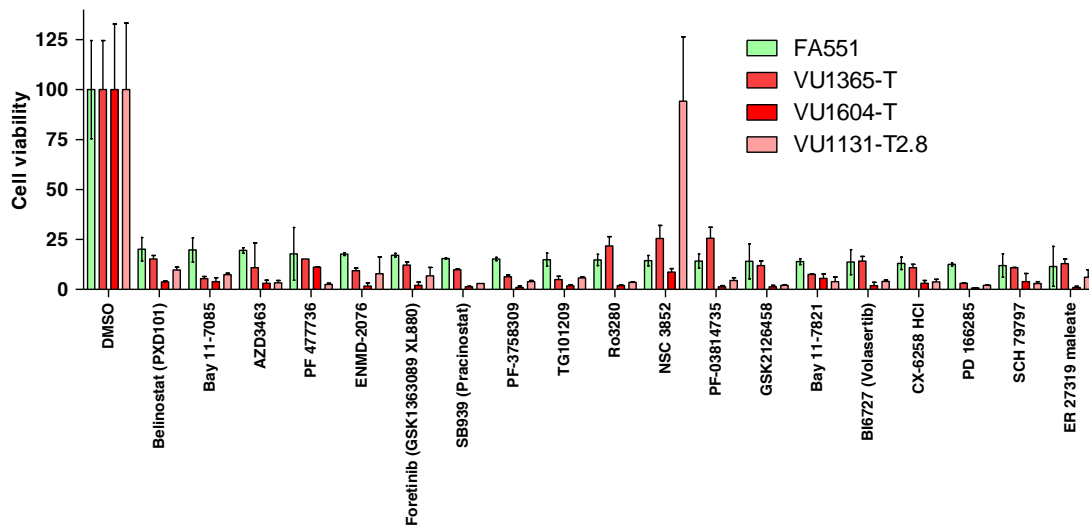
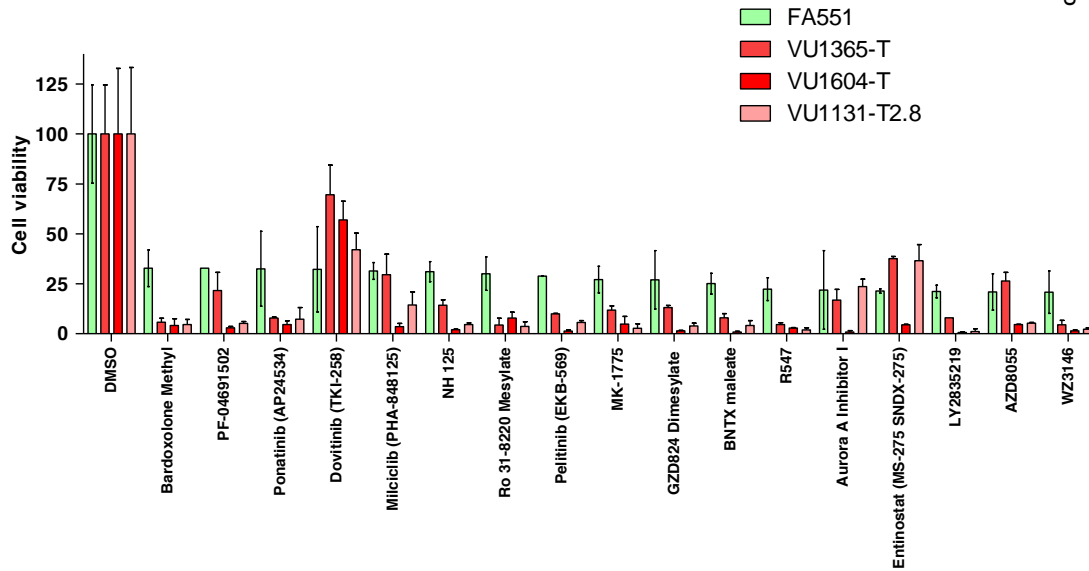
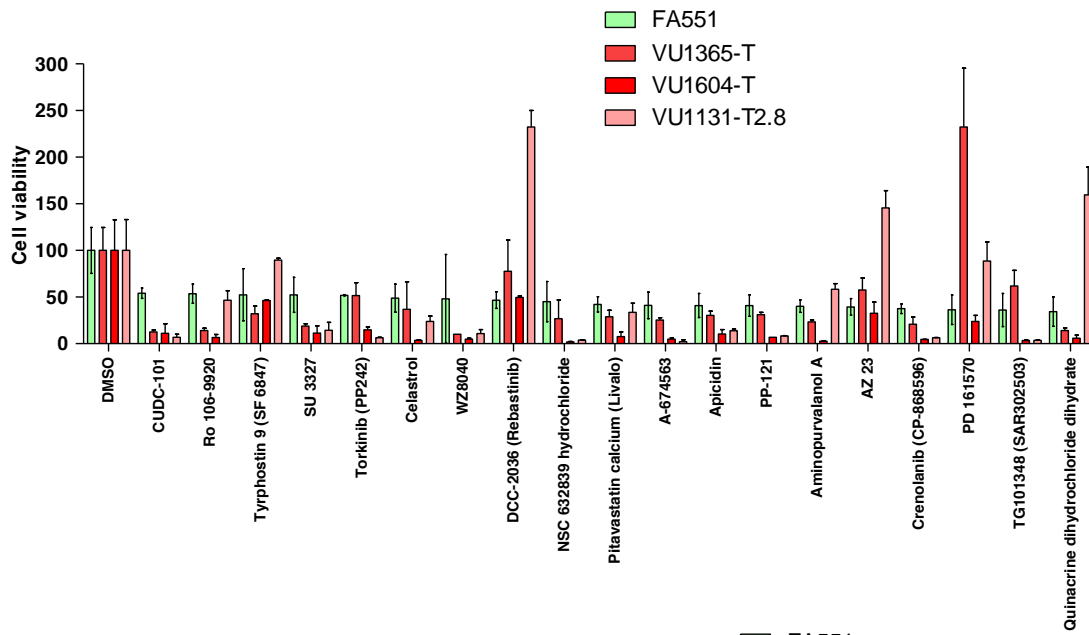


Figura A12. Efecte dels 9 fàrmacs antitumorals seleccionats en una línia tumoral i una línia primària Fanconi. La línia tumoral U2OS FANCA^{-/-} i la FA551 es van tractar durant 7 dies amb els 9 compostos candidats a concentracions de 1 i 10 μM (A) i amb la MMC a dosis de 1, 3, 10 i 33 nM, utilitzat com a control de dany (B). El control sense tractament de fàrmac està normalitzat al 100 % i els resultats es presenten com el percentatge de cèl·lules vives respecte les cèl·lules sense tractament. En el gràfic es mostra la mitjana ± SD de dues rèpliques.

A





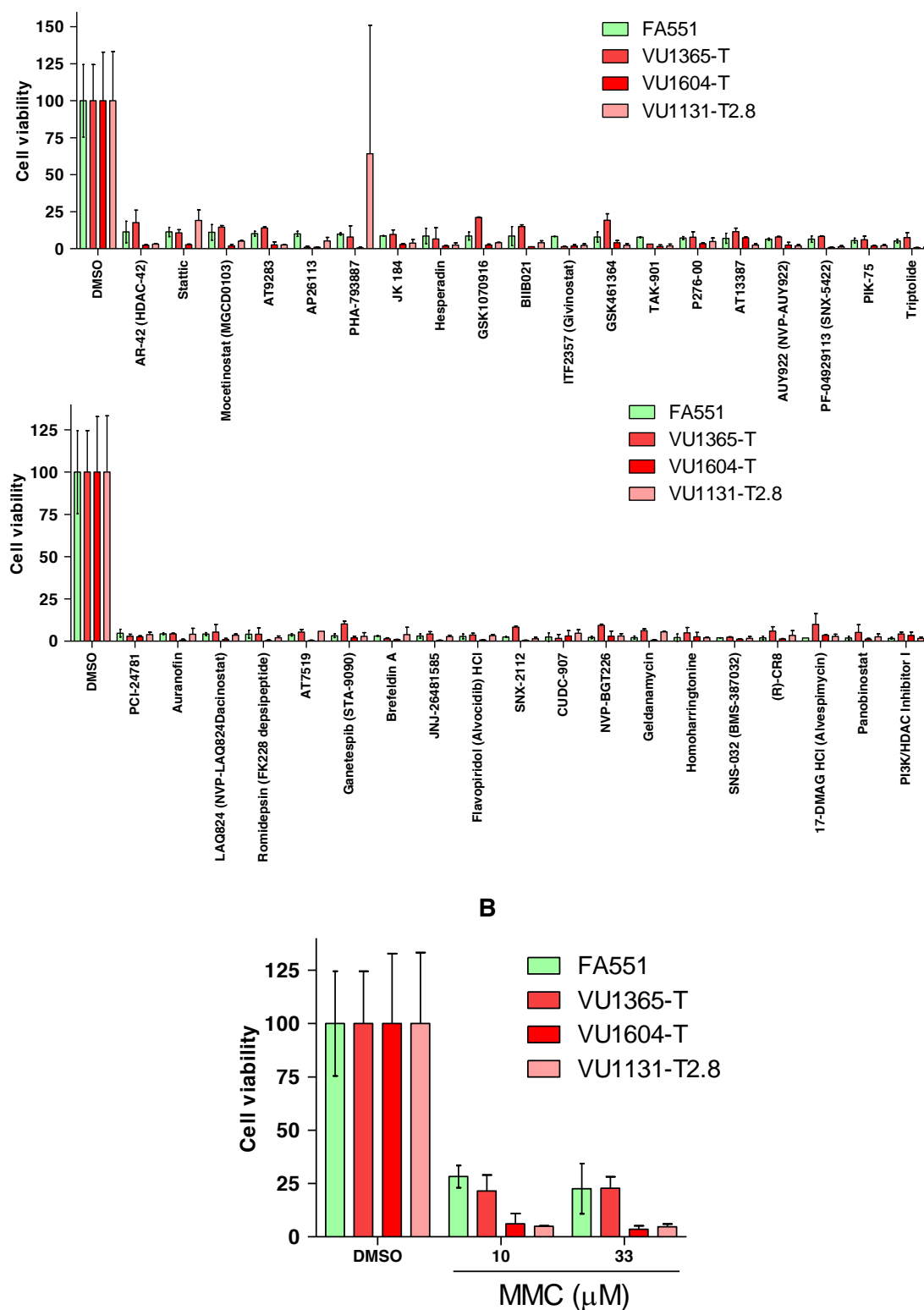
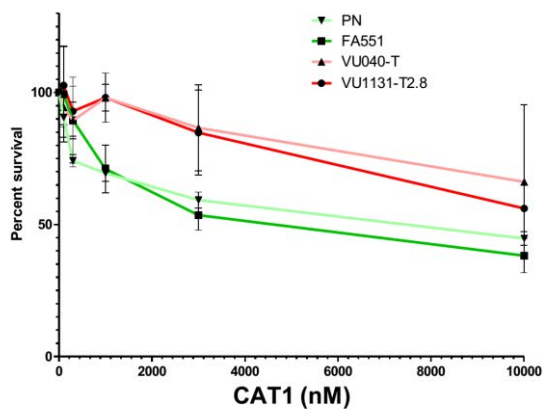
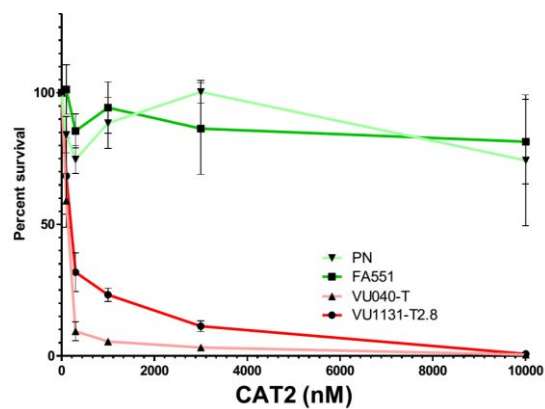


Figura A13. Fàrmacs associats a diferents dianes terapèutiques no genotòxiques que van reduir un 50 % la supervivència de les cèl·lules U2OS FANCA^{-/-} en el cribatge inicial. Les línies cel·lulars de HNSCC VU1131-T2.8, VU1604-T i VU1365-T i els fibroblasts primaris FA551 es van tractar durant 7 dies amb els 150 compostos seleccionats a una dosi 1 μM (A) i amb la MMC a dosis de 10 i 33 nM, utilitzada com a control de dany (B). El control sense tractament de fàrmac està normalitzat al 100 % i els resultats es presenten com el percentatge de cèl·lules vives respecte les cèl·lules sense tractament. En el gràfic es mostra la mitjana \pm SD de dues rèpliques.

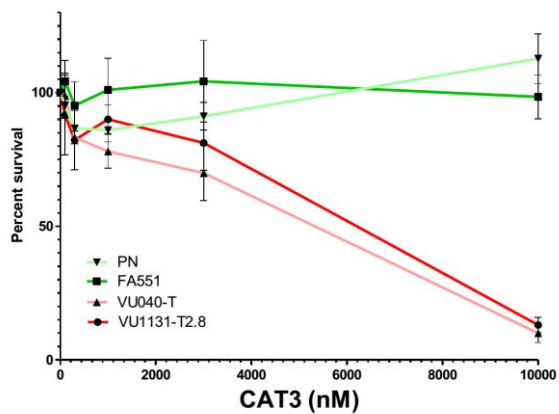
A



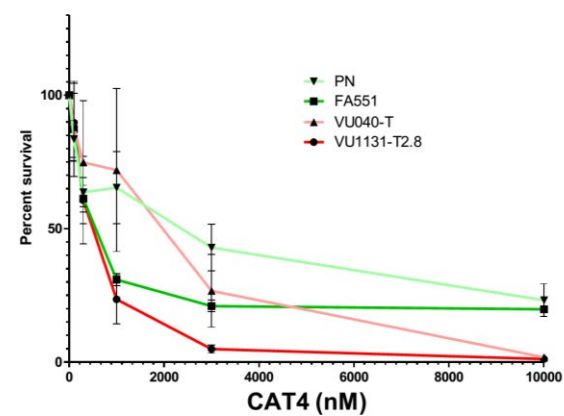
B



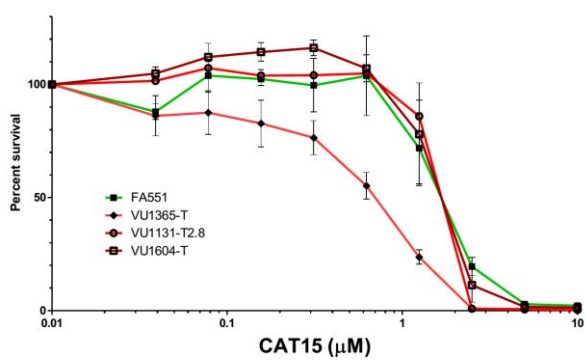
C



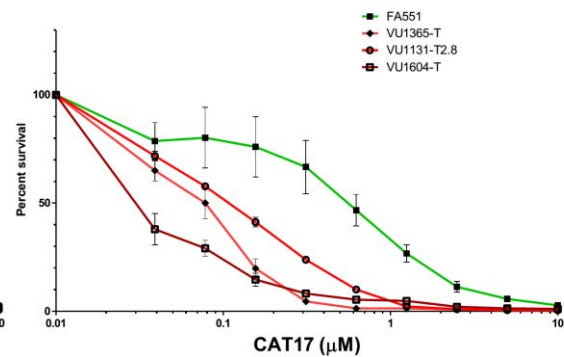
D



E



F



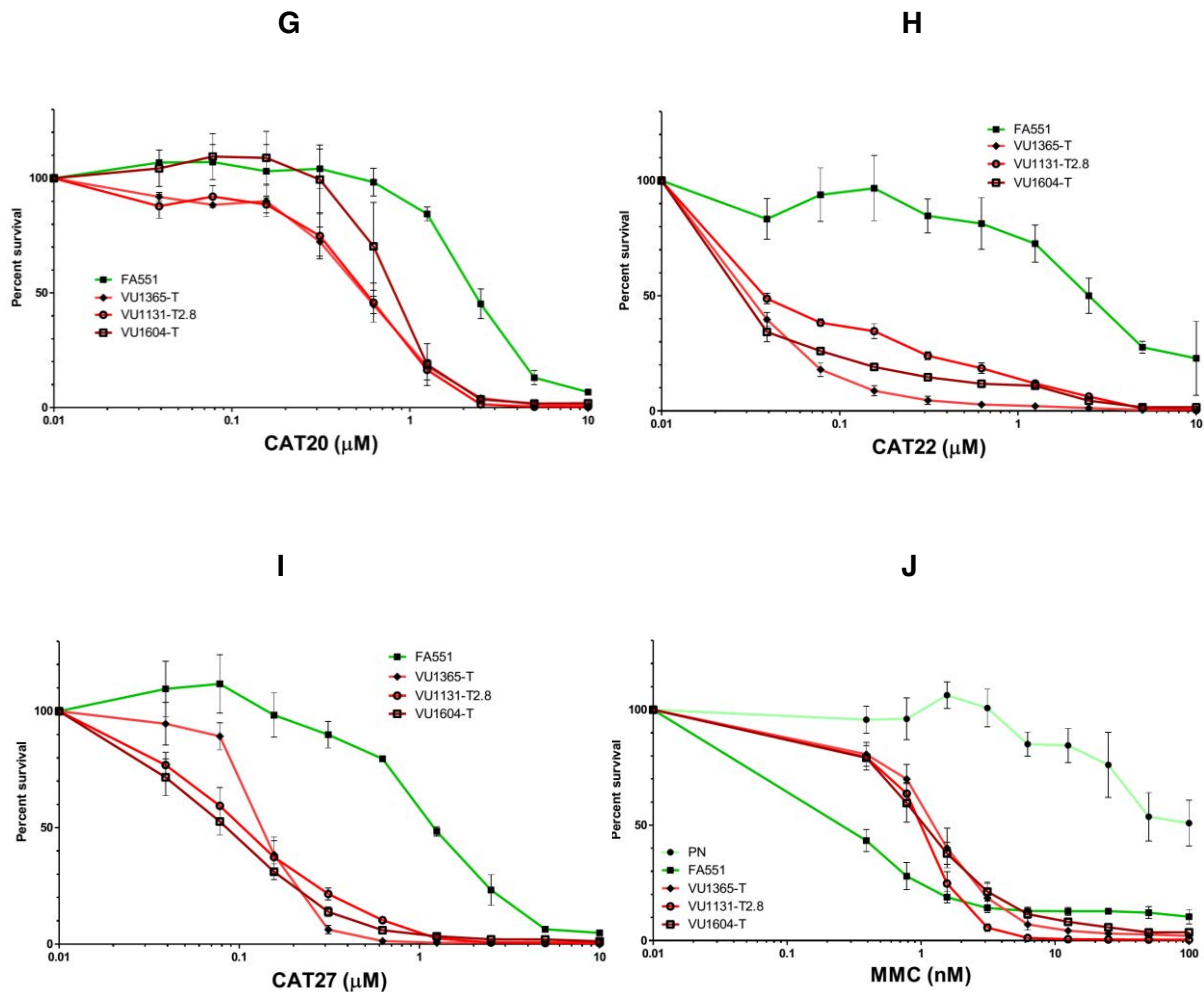


Figura A14. Efecte dels compostos antitumorals CAT1, CAT2, CAT3, CAT4, CAT15, CAT17, CAT20, CAT22 i CAT27 en la supervivència de les línies de fibroblasts primaris i els HNSCC Fanconi. Els compostos CAT1 (A), CAT2 (B), CAT3 (C), CAT4 (D) es van estudiar per corbes de supervivència a dosis entre 0,03 i 10 µM utilitzant el comptador cel·lular Beckman Coulter i es van tractar les línies de HNSCC VU040-T i VU1131-T2.8 i els fibroblasts primaris PN i FA551 durant 7 dies. Els compostos CAT2 (resultats, apartat 4.7.1), CAT15 (E), CAT17 (F), CAT20 (G), CAT22 (H) i CAT27 (I) es van estudiar per corbes de supervivència a dosis entre 0,03 i 10 µM utilitzant l'assaig de sulfurodamina B i es van tractar les línies de HNSCC VU1131-T2.8 (FANCC), VU1604-T i VU1365-T i els fibroblasts primaris FA551 durant 7 dies. Es va utilitzar la MMC com a control de dany amb una corba de dosi entre 0,01 i 100 nM (J). El control sense tractament de fàrmac està normalitzat al 100 % i els resultats es presenten com el percentatge de cèl·lules vives respecte les cèl·lules sense tractament. En el gràfic es mostra la mitjana ± SEM d'almenys 3 experiments independents.