

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DE LA DINÁMICA Y VARIACIÓN DE LOS
TERRITORIOS *CROMOSÓMICOS 9 Y 22 Y LOS GENES
BCR Y ABL1* EN CÉLULAS CD34+ MOVILIZADAS DE
SANGRE PERIFÉRICA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE VELÁZQUEZ RAMÍREZ

DIRIGIDO POR

Biol. EUNICE FABIAN-MORALES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DE LA DINÁMICA Y VARIACIÓN DE LOS
TERRITORIOS CROMOSÓMICOS 9 Y 22 Y LOS GENES
BCR Y *ABL1* EN CÉLULAS CD34+ MOVILIZADAS DE
SANGRE PERIFÉRICA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MARÍA GUADALUPE VELÁZQUEZ RAMÍREZ

DIRIGIDA POR

Biol. EUNICE FABIAN-MORALES

SINODALES

Biol. EUNICE FABIAN-MORALES

DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODAL

Dr. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

SINODAL

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Organización del genoma global	1
1.2 Territorios cromosómicos (TCs)	3
1.2.1 Origen del concepto	3
1.2.2 Concepto de los TCs	6
1.2.3 Implicación de los TCs en la Regulación transcripcional	9
1.3 Epigenética en la organización de los TCs	11
1.4 Organización de la cromatina y los TCs durante el envejecimiento celular	13
1.5 Relevancia del estudio de los territorios cromosómicos 9 y 22 y los genes <i>BCR</i> y <i>ABL</i>	17
1.5.1 Translocación cromosómica t(9;22)	17
1.5.2 Presencia de la t(9;22) en individuos sanos	19
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo general	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. METODOLOGÍA	24
4.1 Materiales y métodos	24
4.1.1 Obtención de células CD34+ y la línea celular PrEC	24
4.1.1.1 Obtención de muestras de sangre periférica movilizada (SPM) y aislamiento de células CD34+	24

4.1.1.2 Análisis de la línea celular PrEC como modelo comparativo	25
4.1.1.2.1 Protocolo de crecimiento y sincronización de la línea celular PrEC	25
4.1.2 Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia tridimensional (FISH-3D)	27
4.1.3 Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM) como herramienta de análisis en la dinámica de los TCs	28
4.1.4 Obtención y análisis de imágenes de la organización espacial	28
4.1.4.1 Volumen Normalizado de TCs	29
4.1.4.2 Factor de descompactación de la cromatina (FDC)	29
4.1.4.3 Posición radial relativa	29
4.1.4.4 Distancia mínima entre los TCs heterólogos y genes heterólogos	30
4.1.4.5 Cálculo del colocación de TCs heterólogos	30
4.1.5 Análisis estadístico	30
5. RESULTADOS	32
5.1 Obtención de imágenes	32
5.2 Reconstrucción Tridimensional de las imágenes	33
5.3 Reconocimiento y cuantificación de compartimientos por cada TC	34
5.4 Volumen normalizado de TCs en individuos sanos	35
5.5 Posición radial relativa de los genes <i>ABL1</i> y <i>BCR</i> , y TCs	37
5.6 Distancias mínimas entre TC9 y TC22 y entre los genes <i>BCR</i> y <i>ABL1</i>	39
5.7 Grado de colocación de los TCs heterologos	41
5.8 Correlación entre edad y número de compartimientos	42
6. DISCUSIÓN	43
7. CONCLUSIÓN	49
8. REFERENCIAS	51
ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Cambios en el patrón de metilación del DNA y en los niveles de DNMT en el envejecimiento, HGPS y cáncer	16
2	Comparación de estudios sobre la presencia del transcrito <i>bcr-abl1</i> en muestras de individuos sanos	20
3	Descripción de la población de estudio.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Organización del genoma	1
2	Conceptos tempranos a favor de una organización territorial de cromosomas en núcleos interfásicos.	3
3	Evidencia experimental para una organización territorial de cromosomas interfásicos	5
4	Reconstrucción 3D de núcleos y distribución radial relativa de TCs	7
5	Los cromosomas entremezclados son el resultado de la migración desde territorios cromosómicos	10
6	Cambios de la cromatina que ocurren durante el envejecimiento	14
7	Representación esquemática de la organización de las asas de cromatina de orden superior en tres condiciones celulares	15
8	Reconstrucción tridimensional de imágenes SIM	33
9	Reconstrucciones tridimensionales de los TCs 9 y TCs 22	35
10	Normalización de TCs	36
11	Posiciones radiales relativas de los genes <i>ABL1</i> y <i>BCR</i> , y TCs 9 y 22	38
12	Distancia mínima entre <i>BCR</i> y <i>ABL1</i> y distancia mínima entre TCs heterólogos	41
13	Volumen de colocalización normalizado entre TC9 y TC22	42
14	Porcentaje de la variante 1 en las muestras con relación a la edad	42

RESUMEN

En el núcleo interfásico, los cromosomas ocupan áreas limitadas definidas como territorios cromosómicos (TCs), las cuales se distribuyen de acuerdo con su estirpe celular. Dentro de cada TC, el posicionamiento de las regiones genómicas no es aleatorio y se correlaciona con fenómenos como la diferenciación celular y los rearrreglos cromosómicos. El cromosoma Filadelfia resultante de la translocación $t(9;22)$, conduce a la formación de una proteína quimérica constitutivamente activa *BCR-ABL1*, característica común de la leucemia mieloide crónica (LMC). Asimismo, individuos sanos sin diagnóstico de LMC expresan el transcrito fusionado *BCR/ABL1* en una fracción de sus células hematopoyéticas. Ismaili y col. confirmaron que esta prevalencia es observada en individuos sanos y que además varía con la edad. Dado que se sugiere que las características topológicas de los TCs 9 y 22 influyen en la probabilidad del intercambio de material genético que produce la $t(9;22)$ es probable que dichas características se modifiquen como parte del proceso de envejecimiento celular, y esto a su vez, incrementa la probabilidad de generación de aberraciones cromosómicas como la $t(9;22)$ y consecuente fusión de los genes *BCR* y *ABL1*. Con la finalidad de evaluar esta hipótesis, se propuso analizar el posicionamiento de los genes *BCR* y *ABL1*, así como de los TCs 9 y 22 en células CD34+ de sangre periférica movilizada de donadores sanos de diferentes edades. El abordaje metodológico que contempló el análisis y reconstrucción tridimensional de los núcleos mostraron diferentes números de compartimientos (clasificados como variantes) por TCs, de los cuales, el paciente con mayor edad resultó tener la muestra con más variantes. Así mismo, las distancias mínimas entre *BCR* y *ABL1* se observaron más cercas entre sí en las muestras de la edad promedio de los pacientes en comparación con las edades menores y mayores del experimento. El analizar las características topológicas del núcleo en células hematopoyéticas de individuos de diferente edad y por ende en diferente etapa de envejecimiento, nos permitirá comprender y describir si existe una asociación en la reorganización de la cromatina vinculada a procesos de envejecimiento celular que además puedan estar involucrados en el desarrollo de enfermedades como el cáncer.

1. ANTECEDENTES

1.1. Organización del genoma global

Enfoques bioquímicos basados en el entrecruzamiento químico de la cromatina han proporcionado una visión integral de la topología del genoma demostrando la existencia de asas y dominios de cromatina como características que organizan el genoma en múltiples niveles y escalas de longitud (Dekker y col., 2017). La fibra de cromatina está formada por unidades de 146 pares de bases (pb) de DNA envueltas alrededor de nucleosomas que consisten en octámeros de proteínas histonas y se pliega irregularmente en características de orden superior, como asas y dominios. Las asas de cromatina existen en diferentes tamaños que van desde Kpb a Mpb. En la escala más pequeña, las asas median la interacción de elementos reguladores. Las asas de Mpb de longitud, contribuyen a la compactación 3D del genoma y se utilizan con frecuencia para regular grupos de genes de una manera temporal y espacial precisa mediante la asociación secuencial de elementos río arriba con genes diana individuales (Figura 1) (Halfon, 2020; Misteli, 2020).

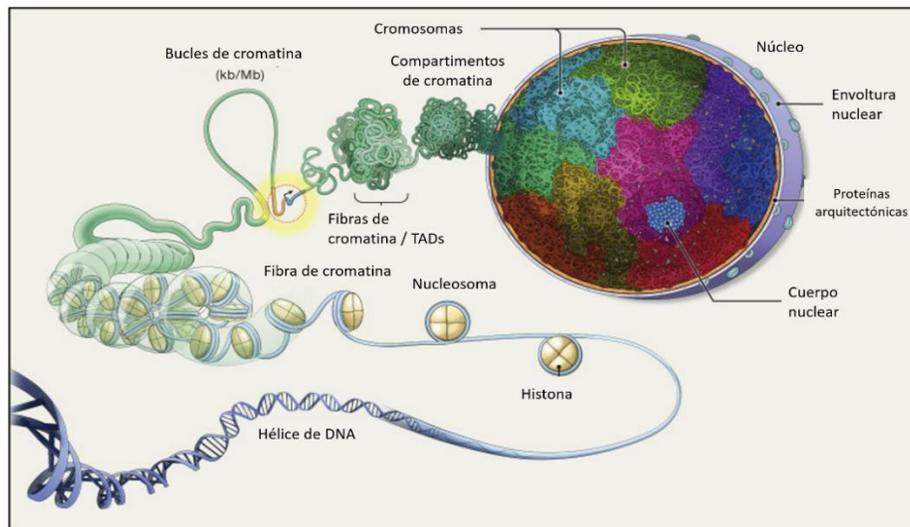


Figura 1. Organización del genoma. Los genomas están organizados en múltiples niveles. El DNA se envuelve alrededor del nucleosoma formando la fibra de

cromatina que se pliega en asas. Luego, la fibra se pliega en dominios de cromatina, denominados TAD, que se asocian entre sí para crear compartimentos de cromatina. El DNA de cada cromosoma ocupa un volumen distinto, o territorio cromosómico (varios colores), dentro del núcleo celular, generando patrones no aleatorios de cromosoma y genes. En el espacio libre de DNA, el núcleo también contiene RNA y agregados proteicos que forman cuerpos nucleares (azul) (Misteli, 2020).

El siguiente nivel de organización del genoma son los dominios de cromatina conocidos como dominios asociados topológicamente (TAD), que representan regiones del genoma con amplias interacciones internas de cromatina y menos contactos con secuencias circundantes, que a menudo están delimitados por proteínas involucradas en la arquitectura nuclear como factor de unión a CCCTC (CTCF) también conocida como proteínas de unión al DNA, del tipo dedos de zinc. Estos dominios proporcionan un marco estructural para la regulación precisa de los genes y facilitan las interacciones cromatina-cromatina (Finn y Misteli, 2019; Dekker y Mirny, 2016). Los dominios de cromatina individuales tienen una propensión a ensamblarse en compartimentos de cromatina de orden superior. Este nivel de organización es morfológicamente evidente en la segregación espacial de heterocromatina y eucromatina (Jagannathan y col., 2019).

Los cromosomas, los portadores físicos de la información genética y la unidad más grande de organización del genoma eucariota, se compactan en niveles jerárquicos y adoptan una organización y topografía compleja. A lo largo de la interfase, el DNA que forma un solo cromosoma ocupa un territorio del núcleo relativamente compacto y espacialmente restringido. La separación de fases del DNA promueve la auto-interacción de dominios homotípicos separados en distancias mayores a lo largo de un solo cromosoma. Como consecuencia, la topología general de un cromosoma es determinada por la red de interacciones homotípicas entre dominios de cromatina, que conduce a la disposición agrupada de dominios de cromatina y a la formación de territorio cromosómico (Cremer y Cremer, 2010; Wang y col., 2016).

1.2 Territorios cromosómicos (TCs)

1.2.1 Origen del concepto

En 1885, Carl Rabl propuso un arreglo territorial de los cromosomas interfásicos en núcleos de células animales, pero fue Theodor Boveri quien definió “territorio cromosómico (TC)” en sus estudios seminales de estadios de blastómeros de *Parascaris equorum* y *Ascaris megalocephala*. Señaló que los cromosomas interfásicos mantienen su individualidad y ocupan un espacio nuclear determinado (Figura 2A y Figura 2B), asimismo, diferenció los extremos cromosómicos que sobresalen en las protuberancias de núcleos profásicos (Figura 2C). Utilizó las protuberancias señaladas como marcadores de la posición nuclear de los TCs definidos en los núcleos interfásicos observando una disposición cromosómica determinada (Figura 2D). Dos décadas después, Eduard Strasburger publicó un dibujo afirmando que los TCs se forman a partir de pequeños grupos de cromatina (Figura 2E), mientras que Boveri analizó una estructura de TCs, similar a una esponja, mediante redes de asas de cromatina (Figura 2F) (Cremer y Cremer, 2010).

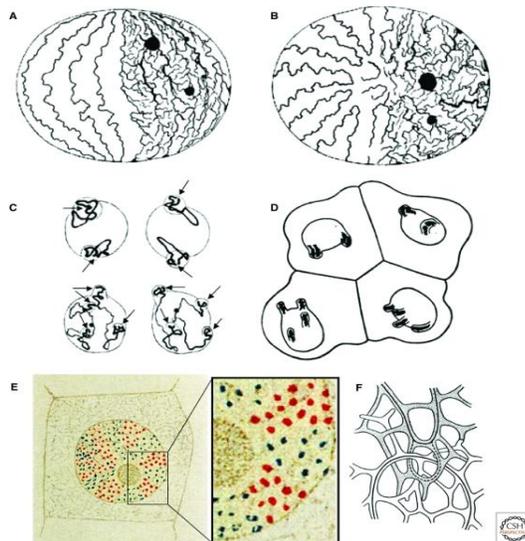


Figura 2. Conceptos tempranos a favor de una organización territorial de cromosomas en núcleos interfásicos. (A) Núcleo interfásico de células epiteliales de larvas de *Salamandra maculata* donde los TCs se forman a partir de hilos de

cromatina primarios (lado izquierdo), a partir de los cuales los hilos secundarios y terciarios se ramifican y forman una red de cromatina (lado derecho). (B) Vista desde arriba. (C) Dos embriones de *Ascaris megalocephala univalens* fijados durante la profase. Las flechas apuntan a protuberancias nucleares que contienen las partes distales de los dos cromosomas de la línea germinal. (D) Embrión fijo de cuatro células muestra dos pares de células con una disposición claramente diferente de estas protuberancias en los núcleos interfásicos. (E) Vista en color del modelo de Eduard Strasburger de un núcleo de células de tejido de la planta *Galtonia candicans*. (F) Las fibras de cromatina sombreadas en blanco y gris en el boceto de Boveri de 1909 reflejan dos TCs vecinos con estructuras en forma de esponja construidas a partir de redes de asas de cromatina anastomizantes. Estos experimentos proporcionaron la primera evidencia convincente, aunque aún indirecta, de la existencia de territorios cromosómicos (Cremer y Cremer, 2010).

En 1984, Cremer y su grupo encontraron evidencia temprana de TCs en núcleos de células diploides de hámster chino usando en microirradiación ($\lambda = 257 \text{ nm}$) para inducir daño en DNA (Figura 3A). Se predijo que el daño del DNA infligido dentro de un pequeño volumen del núcleo produciría resultados diferentes dependiendo de cómo se organizan los cromosomas. Cada hilo refleja una fibra de cromatina que constituye un cromosoma individual. En el caso de hilos distribuidos en todo el espacio nuclear (panel superior), la etiqueta de "daño" se dispersaría en muchos hilos, si los hilos individuales ocupan territorios distintos (panel inferior), la etiqueta localizada marcaría solo un pequeño subconjunto de hilos (Figura 3B). Esta justificación experimental se realizó de la siguiente manera: los núcleos de células vivas se microirradiaron en G1, el DNA dañado localmente se marcó con 3H-timidina y se detectó mediante autorradiografía en núcleos fijados inmediatamente después de la radiación (Figura 3C) o en extensiones de metafase preparadas a partir de células a las que se les permitió pasar a la siguiente mitosis (Figura 3D). Alternativamente, el DNA microirradiado se visualizó mediante inmunotinción con anticuerpos generados contra DNA dañado por UV (Figura 3E), mostrando claramente que la radiación de una pequeña parte del núcleo dañó solo un pequeño

subconjunto del complemento cromosómico mitótico (Figura 3D). Las partes marcadas de los cromosomas mitóticos revelaron los segmentos dañados por los rayos UV de los territorios cromosómicos vecinos afectados por el micro haz durante la interfase precedente. De acuerdo con este resultado, la microirradiación de una pequeña parte de la placa de metafase de una célula viva produjo un patrón de espejo de dominios claramente marcados en los núcleos hijos resultantes. Estos experimentos proporcionaron la primera evidencia convincente, aunque aún indirecta, de la existencia de territorios cromosómicos (Cremer y Cremer, 2010).

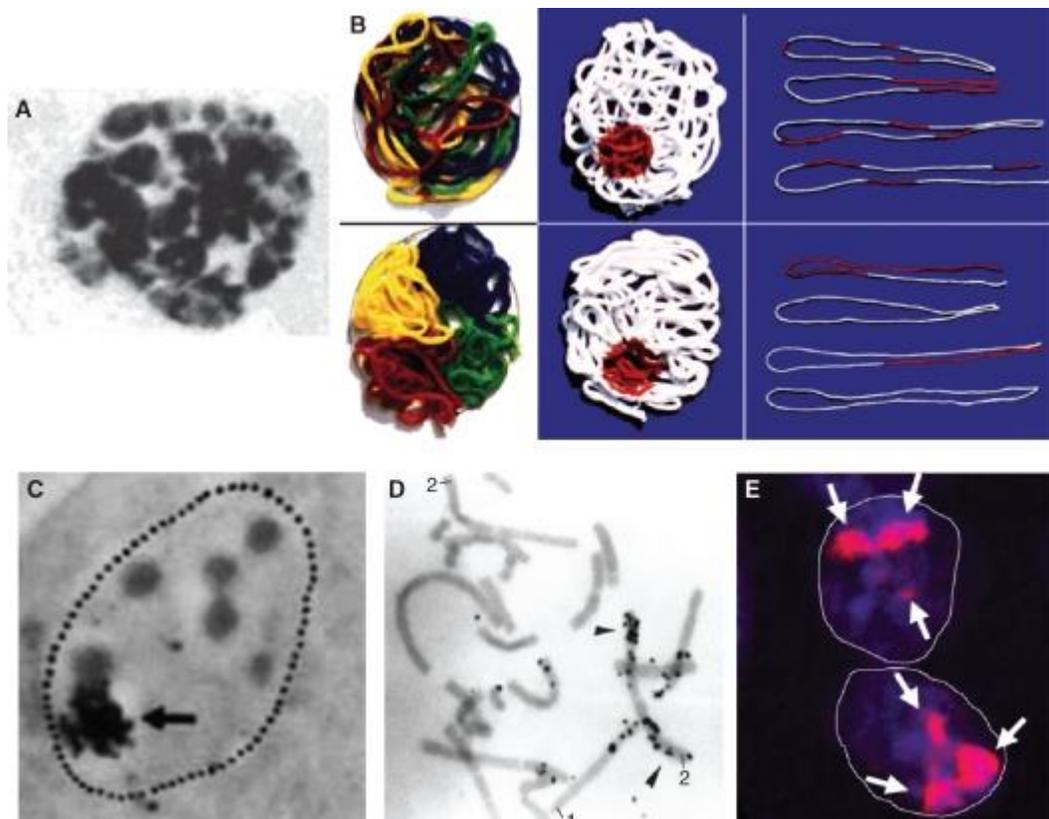


Figura 3. Evidencia experimental para una organización territorial de cromosomas interfásicos. (A) El núcleo de interfase teñido con Giemsa de una célula fijada de hámster chino. (B) Justificación experimental de los experimentos de microrayos UV para distinguir entre una disposición cromosómica no territorial (panel superior) y territorial (panel inferior) en los núcleos celulares. (C) Autorradiografía de una célula

diploide de hámster chino. (D) Metafase extendida después de la microirradiación (E) Identificación inmunocitoquímica de DNA microirradiado (Cremer y Cremer, 2010).

1.2.2 Concepto de Territorios Cromosómicos (TCs)

Los TCs se definen como regiones tridimensionales determinadas que ocupan los cromosomas en el núcleo interfásico. Estas regiones tienen un arreglo y posicionamiento bien definido, sin embargo, son dinámicos y capaces de interactuar mediante la formación de asas de cromatina, permitiendo así, un contacto cercano entre TCs colindantes (Chen y col., 2018). La disposición de los TCs es específica de tipo celular y existe una fuerte correlación entre esta característica y la formación de translocaciones particulares de tejido (Crosetto y Bienko, 2020).

Los primeros estudios sobre la disposición de los TCs en humanos y otras especies utilizaron 2D o 3D FISH en células fijadas. Estos estudios mostraron que la densidad génica define la posición radial de los TCs dentro del núcleo: los TCs con una mayor densidad génica adoptan una posición central dentro del núcleo, mientras que aquellos con una menor densidad génica se localizan en la periferia nuclear. Esto fue demostrado por primera vez por Croft en 1999 al evaluar el posicionamiento de los TCs 18 y 19 en linfocitos. Ambos cromosomas tienen un contenido de DNA similar, pero diferente densidad génica, el TC 18 cuyo contenido génico es escaso se localizó en la periferia nuclear, mientras que el TC 19 considerado con alta densidad génica fue encontrado en el interior nuclear. Este posicionamiento fue confirmado por los hermanos Cremer por una evaluación tridimensional (3D) en núcleos esféricos de linfocitos conservados morfológicamente (Misteli, 2020).

Sin embargo, la posición radial de la cromatina relacionada con la densidad génica no se aplica a todos los tipos de células. En los núcleos de fibroblastos diploides humanos, los TCs pequeños se encontraron en el centro nuclear independientemente de la densidad génica, mientras que los cromosomas grandes se colocaron hacia la periferia nuclear. En su trabajo, Kemeny y col., mostraron que

la posición de los TCs en núcleos de las células de las vellosidades coriónicas, con una morfología nuclear elipsoide, se correlaciona con tamaño cromosómico en lugar de densidad génica. Además, se sugiere que en los núcleos de la trisomía 21, el HSA21 (cromosoma humano 21) adicional induce un desplazamiento de los TCs de HSA1 y HSA3 hacia una posición más periférica en el espacio nuclear y una mayor compactación de los TCs de HSA1 y HSA17, postulando que la presencia de un cromosoma 21 supernumerario altera la compactación cromosómica y da como resultado el desplazamiento de otros territorios cromosómicos (Figura 4). Se ha demostrado entonces que, la disposición de los TCs varía dependiendo del tipo celular y que incluso se correlaciona con la forma nuclear (Kemeny y col., 2018).

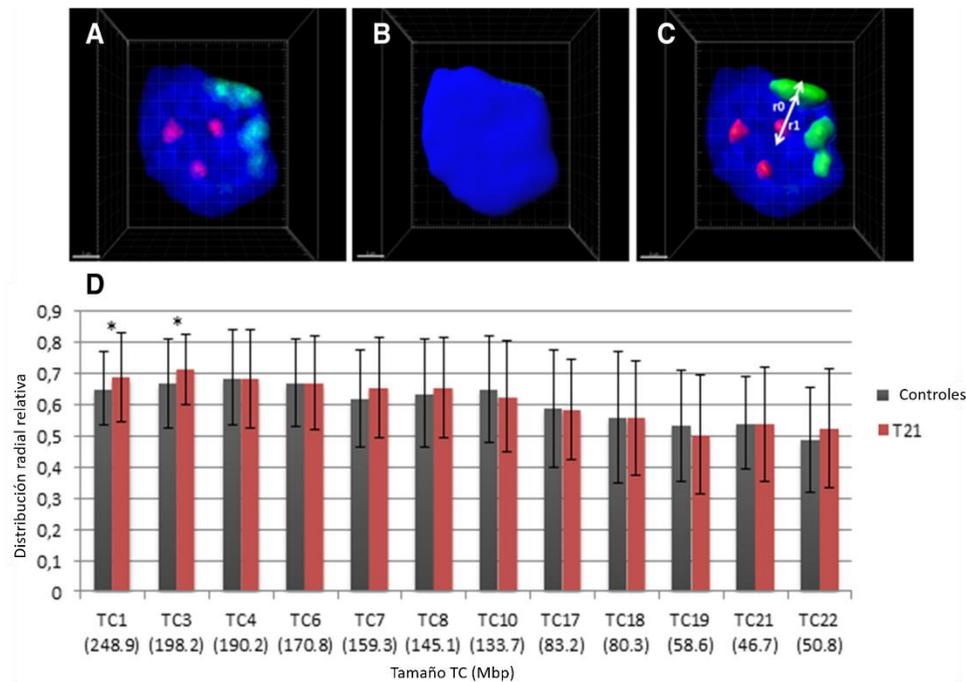


Figura 4. Reconstrucción 3D de núcleos y distribución radial relativa de TC. (Reconstrucción 3D de núcleos y TC mediante el software IMARIS Bitplane). Núcleos disómicos en 3D-FISH utilizando sondas HSA21 (rojo) y HSA4 (verde) en: A) Imagen sin procesar de un núcleo T21 después de 3D-FISH. B) Volumen nuclear obtenido de DAPI después de la segmentación 3D. C) TCs reconstruidos y posición radial de HSA21 y HSA4 TC. r_0 : distancia entre el límite de tinción DAPI y el centro geométrico del núcleo. r_1 : distancia entre el centro TC y el centro geométrico del núcleo. D)

Valores medios \pm desviación estándar de las distribuciones radiales relativas (r_1 / r_0) de 12 TCs para núcleos disómicos (gris oscuro) y T21 (rojizo). Se indican (*) las alteraciones significativas de TC (Kemeny y col., 2018).

Las observaciones correlativas anteriores de los TCs y el posicionamiento de genes han establecido el concepto de organización no aleatoria y resaltan enfáticamente la cuestión de si existe un vínculo entre la posición y la función del genoma. Otra característica emergente de la organización del genoma que puede desempeñar un papel importante en el control de la expresión génica es la intraorganización de los cromosomas dentro de los TCs en el espacio 3D. Esto se refiere a las asas que se están formando para que las regiones de los cromosomas interactúen en cis o trans. Asimismo, la posición territorial relativa de los cromosomas influye en su frecuencia de intercambio para la formación de aberraciones después de la inducción de daño a la cromatina. La movilidad de la cromatina dañada está limitada por su organización topológica dentro del núcleo, lo que influye en la probabilidad de que el daño pueda participar en 'eventos de reincorporación' que están más allá de una 'distancia de interacción' de $\sim > 1 \mu\text{m}$. Foster y col. identificaron cinco asociaciones no aleatorias entre pares particulares de cromosomas inducidos por radiación, t(1;13), t(9;17), t(9;18), t(12;18) y t(16;21), que ocurren con más frecuencia mediante una matriz triangular de pares de intercambio de cromosomas observados en células epiteliales bronquiales humanas normales (NHBE) de 1a división celular y datos de análisis SCHIP (estadísticas para posicionamiento en interfase de cromosomas basado en datos de intercambio). El análisis de FISH 2D en tres de las comparaciones no aleatorias identificadas; (1;13), (9;17) y (16;21), y las mediciones entre los límites del borde de cada par de cromosomas muestran que, en promedio, al menos un cromosoma se encontraba dentro de $< 1 \mu\text{m}$ de otro, de hecho, los TCs se tocaban visiblemente en $\sim 60\%$ de núcleos de cada par analizado. Estos datos son consistentes con la expectativa de que la proximidad espacial de los TCs influye en la formación preferencial de intercambios cromosómicos particulares (Foster y col., 2013).

1.2.3 Implicación de los TCs en la regulación transcripcional

Cabe señalar que las organizaciones espaciales de los TCs están ampliamente relacionadas con la regulación de la expresión génica, y esto en la conformación y los arreglos de la cromatina (Ghavi-Helm y col., 2019). Adicionalmente, la actividad génica que converge en una misma fábrica transcripcional, aumenta la proximidad de las regiones cromosómicas y por tanto la probabilidad de intercambio entre ellas (Brickner, 2017).

Varios estudios respaldan la hipótesis de que el estado transcripcional de los genes se ve afectado por su topología nuclear. Lichter y colaboradores señalaron que varios genes activos e inactivos se ubicaban preferentemente en la periferia de los TCs. En otro estudio se encontró que, las posiciones 3D de los genes translocasas de nucleótidos de adenina, ANT 2 y ANT 3, se localizaron en los TCs de los cromosomas X activos e inactivos (Xa y Xi, respectivamente) en núcleos de células humanas ANT2 es transcripcionalmente activo en Xa, pero es inactivo en Xi, mientras que ANT3 se localizó en la región pseudoautosómica y escapa a la inactivación de X. Además de que los genes ANT2 y ANT3 transcripcionalmente activos se colocaron en la periferia dentro ambos territorios cromosómicos del cromosoma X. Por el contrario, el gen ANT2 inactivo en Xi mostró un cambio hacia el interior del territorio (Galupa y Heard, 2018). Este estudio apoya la hipótesis de una estructura 3D no aleatoria de territorios del cromosoma X y el posicionamiento preferencial de genes activos en la periferia del territorio cromosómico dada la correlación observada entre el posicionamiento 3D de genes ANT y su estado de expresión (Galupa y Heard, 2018).

Asimismo, se han observado que las grandes asas de cromatina que contienen varias megabases de DNA se extienden hacia afuera desde la superficie del territorio del cromosoma 6 y hacia el exterior. La regulación positiva de la transcripción condujo a un aumento en la frecuencia con la que los genes activos (pero no los inactivos) se encontraron en un asa externa de cromatina. También se ha observado una asociación espacial de varios genes transcritos activamente. Estos dominios se

encontraron preferentemente en la periferia de TCs (Figura 5). Por otra parte, David Spector y colaboradores enfatizaron una topología específica de genes activos con respecto a los puntos de estudio en células vivas utilizando factores de empalme etiquetados con GFP. Al activarse un gen cercano, los puntos formaron asas que protruían hacia el nuevo sitio de transcripción (Wang y col., 2017).

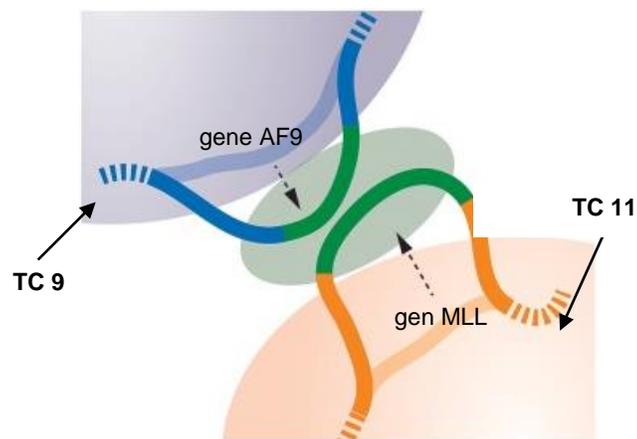


Figura 5. Genes de diferentes TCs pueden compartir una fábrica transcripcional, lo que conlleva una proximidad más cercana entre ellos, aumentando la probabilidad de intercambios cromosómicos ante un daño que provoque ruptura de doble hebra (Brickner, 2017, editado).

Se ha demostrado que los territorios cromosómicos están compartimentalizados en dominios de cromatina de replicación temprana y tardía; los dominios de cromatina de replicación temprana se encuentran en todo el núcleo, excepto en el límite de la periferia nuclear y el espacio perinucleolar, mientras que los dominios de cromatina de replicación media forman bordes a lo largo de la periferia nuclear y alrededor de los nucléolos (Mirny y col., 2019; Shaban y Seeber, 2020).

La heterocromatina juega un papel muy importante en el silenciamiento génico. Se sugiere que el silenciamiento génico podría requerir eventos de reubicación de TCs, en el que el gen deba cambiar de un compartimento transcripcionalmente activo a

un compartimento transcripcionalmente inactivo (van Steensel y Furlong, 2019). En apoyo de esto, Torabi y colaboradores encontraron que dos genes sobreexpresados, *MYC* en el cromosoma 8 y *CCND1* en el cromosoma 11, se localizaban significativamente más lejos del centro del TC en comparación con los genes subexpresados en los mismos cromosomas, en las líneas celulares de cáncer colorrectal DLD-1 y LoVo. Cuando se redujo la expresión de *CCND1* al silenciar su factor de transcripción principal, el gen se repositó y se detectó principalmente en el interior del TC (Torabi y col., 2017).

1.3. Epigenética en la organización de los TCs

Las propiedades de los TCs están directamente relacionadas con la conformación y los arreglos de la cromatina, por tanto, están estrechamente relacionadas también con elementos epigenéticos como las modificaciones pos-transduccionales de histonas. La trimetilación de H3K9, H3K27 y H4K20 (H3K9me3, H3K27me3, H4K20me3, respectivamente) son marcas represivas de histonas para la transcripción y el acondicionamiento de una cromatina cercana, característica de la conformación de heterocromatina. Mientras que otros, como la acetilación de la lisina 14 de la histona H3 (H3K14Ac), la acetilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3K27Ac) y la trimetilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4me3), se encuentran en transcripción activa de promotores o potenciadores activos y características de la cromatina abierta llamada eucromatina. Se ha demostrado que estas marcas conducen a la descondensación y a la formación de bucles de cromatina, responsables de la interacción entre los TCs (Satta y col., 2017).

La estructuración física de la cromatina es altamente dinámica y está regulada por un gran número de modificaciones epigenéticas en respuesta a diversas exposiciones ambientales, tanto en el desarrollo normal como en procesos patológicos como el envejecimiento y el cáncer. Un ejemplo claro de las implicaciones epigenéticas en la organización del genoma y su actividad transcripcional lo encontramos en el síndrome de inmunodeficiencia, inestabilidad

centromérica y anomalías faciales (ICF), el cual implica que mutaciones de DNMT3B den como resultado la pérdida de metilación del DNA en sitios particulares, incluidas las islas CpG en el cromosoma X inactivo (Xi) Esto permite examinar los efectos específicos de la metilación del DNA en los TC (Yagi y col., 2020).

Matarazzo y colaboradores observaron una organización diferencial de los genes de la región pseudoautosomal humana (*PAR*) 2 entre los TCs de X e Y en células masculinas normales y en los TCs del cromosoma X activo (Xa) y el Xi en células femeninas (Matarazzo y col., 2007). En las células ICF masculinas, hay una relocalización hacia el exterior del TC del gen *PAR2 SYBL1*, que está hipometilado y activado transcripcionalmente. El *PAR2 SPRY3* adyacente ligado a Y, que permanece en silencio, no se altera en su organización nuclear en ICF. Esta reorganización diferencial se refleja en una mayor separación en interfase entre los alelos *SYBL1* y *SPRY3* ligados a Y en las células. Esto indicaría que los efectos de la hipometilación del DNA sobre la organización del cromosoma Y están restringidos a la vecindad inmediata del gen *SYBL1* activado. Por el contrario, en las células ICF femeninas, tanto *SYBL1* y *SPRY3* se relocalizan fuera del territorio del Xi, aunque, como en los machos, solo *SYBL1* está sujeto a hipometilación y activación transcripcional (Gatto y col., 2017). Por lo tanto, en este caso, la hipometilación del DNA provoca cambios en la organización en interfase del Xi que se extienden mucho más allá de los genes que están inmediatamente sujetos a hipometilación y activación transcripcional. El alelo Xi de *SPRY3* parece moverse hacia la periferia de su TC en ausencia de activación real de la expresión génica, reafirmando que la posición intra-TC de un gen no es solo una consecuencia pasiva de su activación transcripcional (Matarazzo y col., 2007).

El análisis de otras regiones del genoma humano ha sugerido que la organización de un gen respecto a su TC es un reflejo de su potencial transcripcional y no de activación *per se* y también depende de la actividad de sus regiones genómicas circundantes. En el caso de *PAR2* en Xi y en Y, los diferentes efectos de la hipometilación inducida por ICF sobre la reorganización de TCs podrían deberse a

la naturaleza de las secuencias específicas de X y de Y justo proximales de esta PAR. Aunque el PAR2 ligado a X colinda inmediatamente con la región Xq28 rica en genes, el PAR2 ligado a Y es adyacente al bloque de heterocromatina en Yq12, y esto podría restringir la reorganización de TC. En otras partes del genoma, la organización de TCs alterada que abarca regiones extendidas alrededor de secuencias hipometiladas puede permitir la activación transcripcional inapropiada de genes reubicados si el entorno del factor de transcripción correcto está disponible (Satta y col., 2017).

1.4 Organización de la cromatina y los TCs durante el envejecimiento celular

Las células están expuestas de forma persistente a señales ambientales tanto intrínsecas como extrínsecas que podrían definir el destino celular a la proliferación, diferenciación, quiescencia, envejecimiento, senescencia o malignidad. Todos estos procesos están acompañados y regidos por la reorganización dinámica de la cromatina (Gorbunova y Seluanov, 2016).

El envejecimiento es un proceso biológico complejo durante el cual los organismos experimentan pérdida de la reserva funcional de múltiples sistemas de órganos y una mayor susceptibilidad de estrés asociado a enfermedades asociadas a la edad como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y diabetes. Los estudios funcionales en organismos modelo y humanos indican que los cambios epigenéticos en la arquitectura nuclear, y por tanto en la topología de los TCs comprendida por heterocromatina, asas de cromatina y otras fibras de cromatina de orden superior, y dominios intercromosómicos, tienen una gran influencia en el proceso de envejecimiento. Estos cambios epigenéticos incluyen niveles reducidos de las histonas centrales, patrones alterados de modificaciones postraduccionales de histonas y metilación del DNA, reemplazo de histonas canónicas con variantes de histonas y expresión alterada de RNA no codificante, tanto durante el envejecimiento del organismo como durante la senescencia replicativa (Figura 6) (Chandra y col., 2015; Yu y col., 2020; Georgieva y col., 2016).

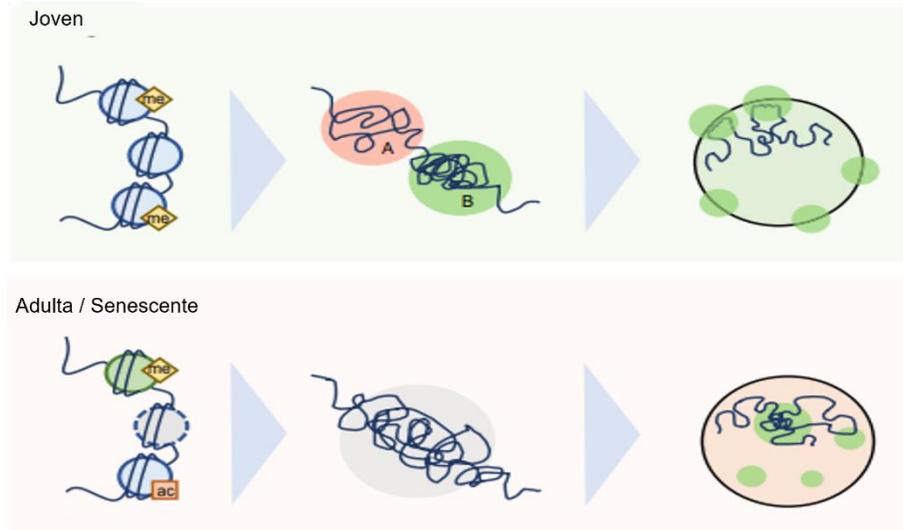


Figura 6. Cambios de la cromatina que ocurren durante el envejecimiento. Reducción del nivel de proteínas histonas, cambios en la modificación de las histonas y en la composición de las variantes, lo que puede conducir a un cambio en la interacción de la cromatina (Yu y col., 2020).

Gran parte del trabajo inicial que vincula la cromatina con el envejecimiento se realizó en la levadura *S. cerevisiae* analizando su vida útil replicativa. En experimentos realizados en la década de 1990, se observó que el envejecimiento y la consiguiente esterilidad en la levadura se correlacionaron con una pérdida del silenciamiento heterocromático característico en los telómeros, el locus del tipo de apareamiento y las repeticiones del DNA ribosómico (rDNA). La relación entre el movimiento de la cromatina y envejecimiento se reforzó cuando se descubrió que Sir2 (histona desacetilasa) estaba asociado con un fenotipo de longevidad en *S. cerevisiae* (Yu y col., 2020).

En estudios posteriores que vinculan la estructura de la cromatina y el envejecimiento, se presenta como modelo el síndrome de envejecimiento prematuro, llamado síndrome de progeria de Hutchison-Gilford (HGPS) (Wang y col., 2020). El HGPS es un trastorno poco común que causa envejecimiento prematuro y una vida media 12 a 15 años. Durante esta vida útil reducida, acumulan progresivamente

características que se asemejan a las de un individuo anciano. Generalmente es causado por una mutación puntual de novo en el gen LMNA que codifica dos proteínas, lámina A/C (expresada por empalme alternativo), componentes estructurales principales de la lámina nuclear. En las células HGPS, la expresión de progerina interfiere con la lámina A que a su vez anula la funcionalidad de la lámina nuclear y trae numerosos fenotipos, que incluyen alteraciones epigenéticas (reducción de la marca de histona represiva H3K27me3 en la heterocromatina), desorganización de la cromatina, morfología nuclear anormal. Normalmente, los TCs presentan numerosos contactos con la lámina nuclear (Figura 7) (Karoutas y Akhtar, 2021; Kang y col., 2021).

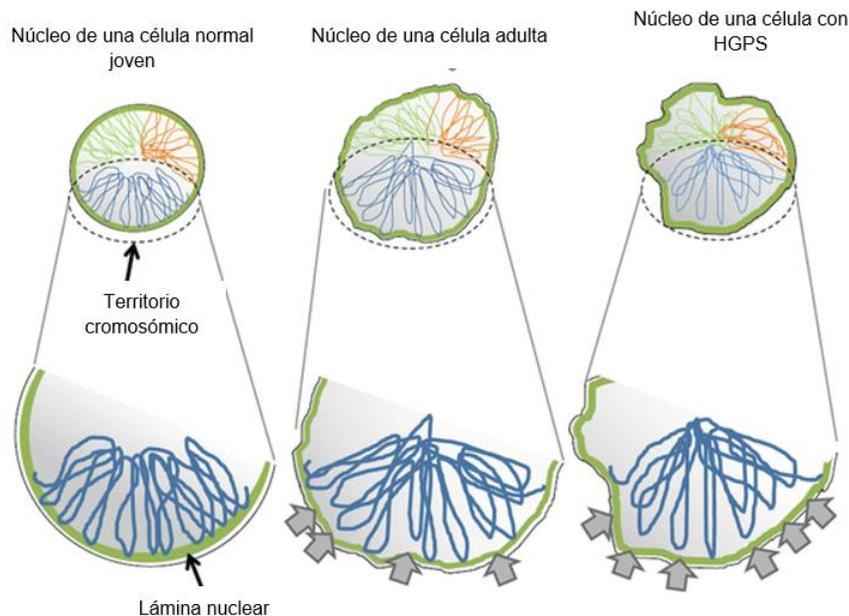


Figura 7. Representación esquemática de la organización de las asas de cromatina de orden superior en tres condiciones celulares: una célula joven normal, una célula envejecida y una célula alterada patológicamente de un paciente con síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) (Georgieva y col., 2016).

Durante el desarrollo de HGPS se detectaron mayores niveles de daño del DNA no reparado, inestabilidad del genoma y acortamiento de los telómeros, expresión génica alterada y homeostasis defectuosa de las células madre. Esto conduce a la formación de asas de cromatina más extensas, a la reorganización de los TCs y a la

pérdida de heterocromatina en el núcleo (Gordon y col., 2014). En las células de fibroblastos de una paciente con HGPS, la marca H3K27me3 se pierde en el cromosoma X inactivo con una regulación a la baja concomitante de EZH2 (potenciador del homólogo zeste) que conduce a cierta descondensación de este cromosoma. Las células de individuos de edad avanzada y pacientes con HGPS muestran similitudes con respecto a los cambios en el epigenoma y la organización de la cromatina, aunque en las células HGPS estos cambios de cromatina parecen ser más pronunciados (Cuadro 1) (Pegoraro y Misteli, 2019; Pal y Tyler, 2016).

Cuadro 1. Cambios en el patrón de metilación del DNA y en los niveles de DNMT en el envejecimiento, HGPS (síndrome de progeria de Hutchison-Gilford) y cáncer (Georgieva y col., 2016).

	Función	Envejecimiento	HGPS	Cáncer
Metilación del DNA				
Hipo-metilación del DNA	Activación	Aumento: en regiones ricas en repeticiones	Aumento: en islas CpG hiper-metiladas	Aumento: en regiones ricas en repeticiones
Hiper-metilación del DNA	Silenciar	Incremento: en los CGI de los promotores	Aumento: en sitios CpG no metilados	Incremento: en los CGI de los promotores
DNMT				
DNMT1	Mantenimiento de la metilación del DNA	Disminución	DN	Aumento
DNMT3a	Metilación de DNA de <i>novo</i>	Disminución	DN	Aumento
DNMT3b	Metilación de DNA de <i>novo</i>	Aumento	DN	Aumento

Asimismo, se ha encontrado que los cambios globales en la organización de la cromatina asociados con el envejecimiento incluyen la formación de focos de

heterocromatina asociados a la senescencia (SAHF) y una pérdida gradual de heterocromatina perinuclear, que modifican la arquitectura nuclear en células envejecidas (Yu y col., 2020).

1.5 Relevancia del estudio de los territorios cromosómicos 9 y 22 y los genes *BCR* y *ABL1*

1.5.1 Translocación cromosómica t(9;22)

Una translocación cromosómica se define como una alteración en la que un cromosoma se rompe y se une a otro cromosoma diferente. Este tipo de aberraciones cromosómicas es un evento que a menudo juega un papel muy importante en la carcinogénesis, sin embargo, su etiología es poco conocida (Roukos y Misteli, 2014). Dado que los genomas no están organizados aleatoriamente en el espacio tridimensional, la organización espacial del genoma contribuye a la propensión de dos cromosomas dados a formar translocaciones. Los primeros estudios que utilizaron hibridación in situ con fluorescencia (FISH) para mapear la posición espacial de translocaciones comunes, indicaron una fuerte correlación entre la proximidad espacial de los cromosomas o genes y la frecuencia en la que la translocación está presente. Se observó que los cromosomas involucrados en una translocación se encontraban a menudo en una proximidad espacial más cercana que los cromosomas que no translocaban (Roukos y col., 2013).

La mayoría de estos reordenamientos pueden resultar de la reparación ilegítima de las rupturas de doble hebra (DSB) del DNA, un proceso que requiere la localización espacial de los puntos de ruptura cromosómica. La hipótesis de “primer contacto” sugiere que los cromosomas involucrados en una translocación se localizan en núcleos de células normales, antes de la reorganización, es decir, la proximidad física de los cromosomas en el núcleo antes de la translocación contribuye a la aparición de translocaciones específicas (Mehta y col., 2014; Adam y col., 2016; Balajee y col., 2018; Hanscom y McVey, 2020).

La frecuencia de translocación también se correlacionó positivamente con el grado de entrecruzamiento de los cromosomas adyacentes en los linfocitos. Estas observaciones en cromosomas completos se extendieron a genes individuales. Por ejemplo, en linfoma de Burkitt, la distancia entre el gen MYC con sus tres parejas de translocación más común, IGH, IGK y IGL, es directamente proporcional a la frecuencia de translocación observada en los pacientes (Dekker y col., 2017).

Adicionalmente, se ha establecido que la organización del genoma no es aleatoria y que es específica de tipo celular y tejidos (Cremer y Cremer, 2010). Por lo cual, podemos encontrar una correlación entre la presencia de translocaciones y los tejidos en los que se encuentran. Tomando en cuenta que el genoma de una célula no está dispuesto de manera azarosa en el espacio tridimensional, parece evidente que los arreglos espaciales del genoma determinados por territorios cromosómicos (TCs), contribuyan a la propensión de dos cromosomas determinados a la formación de translocaciones (Meaburn y col., 2016; Cremer y Cremer, 2010).

Un ejemplo clásico de reordenamientos genómicos recurrentes en el cáncer es la translocación t(9;22), observada en más del 90% de los casos de leucemia mieloide crónica (LMC) y entre el 10% y el 15% en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Kang y col., 2016), la cual produce la fusión entre los genes BCR (localizado en el cromosoma 22q) y ABL1 (localizado en el cromosoma 9q) (Wang y Chang, 2018). Dos proteínas de fusión, p190 y p210, son frecuentemente el resultado de la translocación t(9;22), debido a diferentes puntos de rompimiento en la región 5' del gen BCR. La proteína p190 es la forma menor, típicamente asociada con LLA, y la proteína p210 es la forma principal, típicamente asociada con LMC (Sundaram y col., 2019).

Se ha evidenciado que la mayoría de los genes ABL1 y BCR (75%) están ubicados a una distancia de 20-65% del centro del núcleo. El gen de fusión BCR-ABL1, así como los genes intactos ABL1 y BCR de pacientes que padecen LMC, también se localiza principalmente en esta región. Al evaluar la redistribución de estos genes en

linfocitos después de haber sido irradiados con 5 Gy de rayos gamma, se encontró que se produce un desplazamiento de ambos genes a la región central del núcleo (0-20% del radio distante del centro nuclear) en aproximadamente el 15% de las células. La distancia mínima entre un gen ABL1 y un gen BCR es inferior a 1µm en el 47.5% de las células de la médula ósea de donantes sanos.

Estos transcritos de BCR-ABL1 en la sangre periférica a niveles muy bajos (1 a 10 de 108 leucocitos de sangre periférica) se pueden detectar en aproximadamente el 30% de los individuos normales, y la incidencia de esto aumenta con la edad (Deininger y col., 2020).

1.5.2 Presencia de la t(9;22) en individuos sanos

El sello distintivo citogenético de la leucemia mieloide crónica (LMC) es el cromosoma Filadelfia (Ph) resultado de la translocación cromosómica t(9;22). Como se mencionó anteriormente, estudios de posición de los TCs demuestran una mayor probabilidad de formación de translocación cuando los TCs están próximos en su distribución tridimensional dentro el núcleo interfásico.

La prevalencia de las transcripciones de p210 BCR / ABL1 asociadas a LMC en individuos sanos varía con la edad y los valores informados varían del 10% al 30% de los adultos evaluados. Estos datos relacionados con la edad fueron confirmados recientemente por Ismail y col., quienes notaron que el transcrito p210 BCR/ABL se detectó en el 10% de las muestras de sangre periférica de 189 voluntarios sanos en su cohorte. En este estudio, los adultos tenían 6 veces más probabilidades que los niños de tener positividad del transcrito BCR/ABL1 (Cuadro 2). Los autores propusieron que esta diferencia de probabilidad se debía a la acumulación de daño en el DNA con el aumento de la edad. Por lo tanto, la variación observada en los resultados positivos de la translocación BCR y ABL1 se deba a diferencias poblacionales e individuales en la posición relativa y distancia de los TCs 9 y 22 dentro del núcleo (Ismali y col., 2014).

Cuadro 2. Comparación de estudios sobre la presencia del transcrito bcr-abl en muestras de individuos sanos. Sangre periférica (SP) (Ismali y col., 2014).

Estudio	Tipo de prueba	Resultados positivos (%)	Método
Biernaux (1995)	Adultos SP (73) Niños SP (22) Cordón umbilical (22)	30 (p210) 4.5 (p210) 0 (p210)	RT-PCR
Bose (1998)	Adultos SP (16) Líneas celulares que no son CML (7)NIH3T3 Fibroblasto murino	25 (p210); 69 (p190) 43 (p210); 100 (p190)0	RT-PCR
Song (2011)	Adultos SP (46, p210) (53, p190) Niños SP (28, p210) (27, p190) Cordón umbilical (50)	54(p210) 77 (p190) 32(p210) 67(p190) 16(p210) 42(p190)	RT-PCR
Ismali 2014	Adultos SP (145) Niños (44)	10.3(p210) 9.1 (p190) 9.1(p210) 0 (p190)	RT-PCR

Cambios en la organización de la cromatina debido al envejecimiento celular se han observado en diferentes sistemas celulares mencionados anteriormente, sin embargo, no se ha evaluado directamente la organización espacial de los TCs involucrados en la t(9;22) cuando se presenta este proceso biológico (Fabian-Morales y col., 2021). Analizar la disposición espacial y características topológicas de los TCs 9 y 22 y los genes *BCR* y *ABL1* en el proceso de envejecimiento nos

permitirá evaluar si existen cambios significativos en dichas características que nos permitan asociarlas con una mayor predisposición a la formación de la translocación t(9;22) en células hematopoyéticas.

2. HIPÓTESIS

Existen diferencias en las características topológicas de los genes BCR y ABL1 y sus respectivos territorios cromosómicos (TC9 y TC22) y asociadas a envejecimiento de células hematopoyéticas entre los individuos sanos analizados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar la distribución y características topológicas de los genes *BCR* y *ABL1* y de los TCs 9 y 22 en muestras de sangre periférica movilizada de individuos sanos de diferentes edades.

3.2 Objetivos específicos

- Obtener muestras de sangre periférica movilizada (SPM) de individuos sanos
- Aislar células CD34+ a partir de las muestras SPM
- Estandarizar la técnica de Hibridación *in situ* con Fluorescencia Tridimensional en SPM
- Capturar imágenes por microscopía de alta resolución SIM
- Analizar la organización espacial de los TCs 9 y 22 y de los genes *BCR* y *ABL1* mediante software de análisis de imagen
- Analizar estadísticamente las características analizadas por imagen

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales y métodos

4.1.1 Obtención de células CD34+ y la línea celular PrEC

Los experimentos fueron llevados a cabo en células CD34+ de sangre periférica movilizada y en células PrEC.

4.1.1.1 Obtención de muestras de sangre periférica movilizada (SPM) y aislamiento de células CD34+

Las células madre hematopoyéticas (HSC) son células que poseen, bajo ciertas condiciones, la capacidad de reproducirse a sí mismas por largos periodos. Producen células progenitoras hematopoyéticas que se diferencian en cada tipo de célula sanguínea madura dentro de una jerarquía bien definida. Entre los marcadores de células madre y progenitoras hematopoyéticas (HSPC) se encuentra CD34. El antígeno CD34 es una glicoproteína transmembranal de cadena única expresada en células progenitoras hematopoyéticas humanas, células progenitoras endoteliales, células endoteliales vasculares, fibroblastos embrionarios y algunas células en tejido nervioso fetal y adulto (AbuSamra y col., 2017).

Las HSPC, presentes con una frecuencia de aproximadamente 0,05 a 0,2% en sangre periférica, 0,1 a 0,5% en sangre de cordón y 0,5 a 3% en médula ósea, pueden enriquecerse rápida y eficazmente. En el presente estudio, las células fueron obtenidas a partir de sangre periférica movilizada de donadores sanos que cumplieron con los criterios de inclusión: personas sanas y firma del consentimiento informado.

El procesamiento de selección de células CD34+ comienza con la separación de fases mediante gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich). Posteriormente, las

células CD34+ son purificadas a partir de selección positiva utilizando microperlas anti-CD34 y separación de columnas Midi-Macs (Miltenyi, Biotec). Dicho procesamiento es realizado por personal capacitado del INCan dadas las políticas internas del Instituto (HIMFG, 2011).

4.1.1.2. Análisis de la línea celular PrEC como modelo comparativo

La línea celular PrEC fue elegida como un modelo comparativo dado que se trata de un cultivo primario de células 'normales' epiteliales de próstata. En dicho tejido no se ha observado la presencia de la t(9;22), por lo que, dados nuestros antecedentes previamente argumentados, hipotetizamos que la disposición tanto de los TCs 9 y 22, como de sus respectivos genes *BCR* y *ABL1* sea diferente de la que podamos encontrar en células hematopoyéticas.

Las células epiteliales de próstata primarias (PrEC), conforman una línea celular adherente que fue obtenida de la compañía ATCC (Núm Cat. PCS-440-010). La línea celular fue cultivada en un medio de cultivo enriquecido con suero y factores de crecimiento y suplementos. Se mantuvo en crecimiento y después fue sincronizada mediante privación de suero con la finalidad de que las células se detuviesen en fase G₀, es decir, que entraran en interfase y poder hacer los análisis comparativos entre la línea celular PrEC y la SPM (Langan y col., 2017).

4.1.1.2.1 Protocolo de crecimiento y sincronización de la línea celular PrEC.

Se descongeló un kit de crecimiento de células epiteliales de próstata (ATCC PCS-440-0409). Se calentó el componente de L-glutamina (15 mL) en un baño de agua a 37 °C, se agitó y se agregó al medio basal (485 mL) (PCs-440-030). Posteriormente se transfirió el volumen indicado de cada componente del kit de crecimiento: extracto P (2 mL), epinefrina (0.5 mL), rh TGF- α (0,5 mL), hidrocortisona (0,5 mL), insulina rh (0,5 mL) y apotransferrina (0,5 mL). Se selló herméticamente la botella de medio de

crecimiento completo, se agitó suavemente el contenido para asegurar una solución homogénea y se almacenó en la oscuridad entre 2 °C y 8 °C.

Cuando el cultivo alcanzó aproximadamente una confluencia del 80% al 90% se realizó el pase. Se calentó el medio de cultivo completo a 37 °C para después lavar la capa de células una vez con 3 mL de D-PBS (ATCC 30-2200). Posteriormente se agregó la solución de tripsina-EDTA precalentada a temperatura ambiente (ATCC PCS-999-003) (1 a 2 mL por cada 25 cm²). Movimos lentamente la botella de cultivo para asegurar una cobertura completa de la solución de tripsina- EDTA sobre las células y luego retiramos el exceso de líquido de la monocapa. Se observó las células en el microscopio, y después que las células se hubieran separado de unas de otras y se redondearán, se golpeó suavemente desde varios lados para desprender las células de la superficie de la botella de cultivo. Se agregó rápidamente un volumen igual de solución neutralizante de tripsina (ATCC PCS-999-004). Se agitó suavemente el cultivo para asegurarse de que toda la solución de tripsina-EDTA se había neutralizado. Se transfirieron las células disociadas a un tubo de centrifuga estéril y se dejaron a un lado mientras procesaron las células restantes. Agregamos 3 a 5 ml de D-PBS (ATCC 30-2200) a la botella de cultivo para recolectar cualquier célula adicional que se encontrará en la botella. Centrifugamos las células a 150 xg durante 5 minutos, aspiramos la solución de disociación neutralizada del sedimento celular y resuspendimos en 5 mL de medio de crecimiento fresco y precalentado. Se contaron las células y sembramos nuevos frascos de cultivo a una densidad de 5000 células viables por cm². Se colocaron los frascos /botellas recién sembrados en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante al menos 24 a 48 horas antes de seguir procesando las células.

Cuando el cultivo alcanzó una confluencia de 30-50% se inició con la sincronización de las células. Retiramos el medio de nuestro cultivo y enjuagamos con PBS a 37° C. Cubrimos las células con suero fetal bovino al 0.1 % en DMEM e incubamos a 37° C con 5% de CO₂/ 95% de aire humidificado aproximadamente 48h antes de la fijación. Al final del proceso de privación/sincronización de suero de 48 h, se lavaron

con PBS 1x 3 veces por 2 min. cada lavado. Posteriormente, se fijaron 10 min. con PFA al 4% para después volver a lavar con PBS 1x, 2 veces por 2 min. cada lavado para continuar con el FISH 3D.

4.1.2 Hibridación *in situ* con fluorescencia tridimensional (FISH-3D)

Para el 3D-FISH se utilizaron las sondas específicas para los genes *BCR* y *ABL1* y sondas de cromosoma completo (WCP, por sus siglas en inglés) 9 y 22 de la compañía Vysis y Methasystems, respectivamente, para la detección de las señales correspondientes a cada *loci* y TC.

Se utilizaron células CD34+ de individuos sanos de diferentes edades obtenidas a partir de SPM se colocaron sobre un cubreobjetos tratado con Poly-L-Lisina (18x18 Zeiss) dentro de una caja petri p60. La fijación de las células se llevó a cabo utilizando paraformaldehído al 4% por 15 min. a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS 1X por dos minutos, se lavaron con solución de 0,05 % de Tritón X-100 a temperatura ambiente tres veces por 10 minutos cada lavado. Los portaobjetos con las células fijadas se incubaron en una solución de 0,5% de Tritón X-100 por 30 minutos, para posteriormente mantenerlas glicerol al 20% a temperatura ambiente por dos días.

Las laminillas se sometieron a congelación con nitrógeno líquido por 20 s y una vez descongeladas se le agregaron gotas de glicerol, para un total de 4 ciclos de congelación-descongelación. Se hizo un enjuague inmediato con PBS 1X.

Posteriormente las células se lavaron en solución al 0,05% de Triton X-100 a temperatura ambiente 3 veces por 10 minutos en un agitador. Se incubaron las células en 0,1 N HCl a temperatura ambiente por 5 minutos y después se incubó con RNAsa a 37°C por 15 minutos. Se lavó en 2x SSC y se colocaron en 50% formamida a un pH de 7,2 a temperatura ambiente durante 2 días hasta su hibridación.

Transcurridos los dos días, se inició la etapa de hibridación, para ello se utilizaron las sondas: WCP 9 (1,5 μL) y WCP22 (1,5 μL), y se preparó la sonda *BCR/ABL* de la siguiente forma: Buffer (3,15 μL), H_2O (0,9 μL) y Sonda (0,45 μL). El cubreobjetos con las células se retiró de la formamida y se colocó la sonda que finalmente se selló con adhesivo. Posteriormente se continuó con el paso de desnaturalización donde las células y sondas de TCs se cohibridaron a 78°C por 5 min., y las células y sondas de *BCR/ABL* se cohibridaron a 80°C por 3 min., se dejaron hibridando por 1 día a 37°C en cámara húmeda.

Para el proceso de post-hibridación, se removió el cubreobjetos del portaobjetos y enjuagó con 2x SSC. Posteriormente se realizaron lavados con 2x SSC en 0,1% IGEPAL a temperatura ambiente, 0,4x SSC en 0,3% IGEPAL a 72 °C y finalmente con 2x SSC en 0,1% IGEPAL a temperatura ambiente. Se realizó un último lavado con PBS 1x y se coloca DAPI diluido en PBS durante 10 min. Se realizó un último lavado en PBS por dos minutos y el cubreobjetos se colocó en un portaobjetos con 8 μl de medio de montaje Vectashield (Boyle, 1969).

4.1.3 Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM) como herramienta de análisis en la dinámica de los TCs

La microscopía de iluminación estructurada es un tipo de microscopía de súper resolución, llegando a una resolución lateral de ~100–130 nm y de ~280–350 nm en el plano axial. En este procedimiento, la muestra se ilumina con un láser que atraviesa por una serie de rejillas en movimiento. Este procedimiento evita iluminar por completo la muestra y disminuye ruido de la señal fluorescente. Todas las imágenes capturadas son procesadas con algoritmos informáticos. Estos algoritmos usan los datos para estimar los parámetros experimentales e identificar los componentes superpuestos en la muestra. Finalmente, genera una imagen de alta resolución de las estructuras en la muestra (Schermelel y col., 2010).

4.1.4 Obtención y análisis de imágenes de la organización espacial.

Las señales fluorescentes de las sondas específicas para *BCR*, *ABL1*, TC9 y TC2 fueron detectadas por microscopía de súper resolución utilizando un microscopio Zeiss Elyra PS1 equipado con la tecnología SIM. Posteriormente se hizo la reconstrucción tridimensional del núcleo en interfase de la cual se analizaron todos los parámetros para determinar la organización de los elementos de interés dentro del núcleo, los cuales se describen en las subsecuentes secciones. Para el análisis de imagen tridimensional se usó el software IMARIS (Bitplane) y para el análisis estadístico se usó el programa Prism 7.

4.1.4.1 Volumen Normalizado de TCs

Primero calculamos el volumen absoluto de TC sumando el número de vóxeles dentro de la imagen segmentada en 3D de cada TC. El volumen cromosómico normalizado se calculó dividiendo el volumen cromosómico absoluto por el volumen nuclear. Posteriormente, en una tabla de datos en columna se registraron los resultados para obtener gráficos de cajas/bigotes. Se eligió el análisis de Kruskal-Wallis (prueba no paramétrica) y comparaciones múltiples: ANOVA unidireccional para comparar los resultados de cada grupo (muestra) (Figura 10).

4.1.4.2 Factor de descompactación de la cromatina (FDC)

Para estimar el factor de descompactación cromosómica, obtuvimos la longitud de la secuencia para todos los cromosomas de la base de datos NCBI (cromosoma 9 = 138.4 Mbp) (cromosoma 22 = 50.82 Mbp). El factor de descompactación se determinó mediante la operación siguiente,

$$FDC = \frac{\text{volumen normalizado de los TCs}}{\text{Longitud del cromosoma en Mbp}}$$

4.1.4.3 Posición radial relativa

La posición radial relativa se calculó desde el centro de masa del núcleo, que se definió como 0, y la distancia entre 0 y cada señal de los genes y centros de masa de TCs se definieron como r_a . La relación nuclear (r_b) se definió como la distancia entre 0 y la periferia nuclear (1) pasando por el centro de señales de los genes y centros de masa de TCs. La posición radial relativa (r) con respecto al centro nuclear se calculó como una fracción r_b ($r=r_a/r_b$).

4.1.4.4 Distancia mínima entre TCs heterólogos y genes heterólogos

La distancia entre los centros de gravedad de cada uno de los TCs y de los genes fueron establecidos por IMARIS. Estos centros se utilizaron para estimar las distancias entre los elementos mencionados anteriormente, y las distancias más cortas se definieron después de haber hecho todas las distancias entre los compartimientos identificados (Figura 12).

4.1.4.5 Cálculo de colocación de TCs heterólogos

La colocación de TCs se estimó considerando los volúmenes detectados de los TCs9 y TCs22, a partir de las imágenes 3D segmentadas. Por lo tanto, la región de colocación se definió como la relación entre la intersección y la unión de ambos volúmenes. Este volumen de colocación se divide por el volumen total del núcleo para obtener el volumen de colocación normalizado.

4.1.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. El valor de p de .01 a .05 se consideró significativo (*), los valores de p de .001 a .01 se consideraron muy significativos (**), y los valores de $p < .001$ se consideraron extremadamente significativos (***, ****). Cuando el coeficiente de correlación de Spearman no paramétrico (r_s), tiene un valor de 1 es considerada una correlación perfecta, un valor de r_s de 0 a 1 se interpreta que las dos variables tienden a

aumentar o disminuir juntas, un valor de r_s igual a 0 se considera que las dos variables no varían juntas en absoluto, un valor de r_s de -1 a 0 se interpreta que una variable aumenta a medida que la otra disminuye y los valores de r_s de -1 se considera una correlación inversa o negativa perfecta. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 7.0.

5. RESULTADOS

5.1 Obtención de imágenes

Por cada muestra, codificada como MOS seguido por un número, se prepararon 10 laminillas para después procesarlas para 3D FISH, la metodología se describió en la sección anterior (las características de la población se detallan en Cuadro 3). A partir de estas laminillas se tomaron imágenes, mediante Microscopía de Iluminación Estructurada (Structured Illumination Microscopy, SIM), de núcleos aislados utilizando 3 diferentes canales: DAPI usando un láser de excitación de 405 nm, FITC con 488 nm y Cy3 con 561 nm. Se capturó las imágenes en Z-Stack, que consta en dividir cada núcleo en una serie secuencial de planos dando como resultado una compilación de fotos de principio a fin de núcleo, lo que nos permite tener un resultado tridimensional de los núcleos. Las imágenes fueron tomadas con intervalo de 200nm por plano en el caso de las imágenes para TCs y 85nm en el caso de los genes. Posteriormente, cada una de las imágenes fue procesada por el algoritmo SIM, el cual disminuye el ruido de fondo y delimita las señales, aumentando la capacidad de resolución, y a partir de esta información se generaron las reconstrucciones tridimensionales.

Cuadro 3. Descripción de la población de estudio. Género y edad de individuos sanos.

Muestra Analizada	Género	Edad
MOS 1	M	26
MOS 2	F	29
MOS 3	F	30
MOS 4	M	34
MOS 5	M	36
MOS 6	F	38

MOS 7	M	46
MOS 8	M	60

5.2 Reconstrucción Tridimensional de las imágenes

A partir de las imágenes en SIM, realizamos una reconstrucción tridimensional de cada una de las células analizadas y de sus respectivas señales hibridadas mediante la metodología 3D FISH (DAPI, FITC y Cy3). Se utilizó el programa para análisis de imagen Imaris Versión 9.7.2, Bitplane. Este software nos permitió reconstruir cada una de las señales de forma independiente y sobreponerlas para formar una sola reconstrucción tridimensional (Figura 8) a partir de las cuales se realizaron los análisis que se describen más adelante.

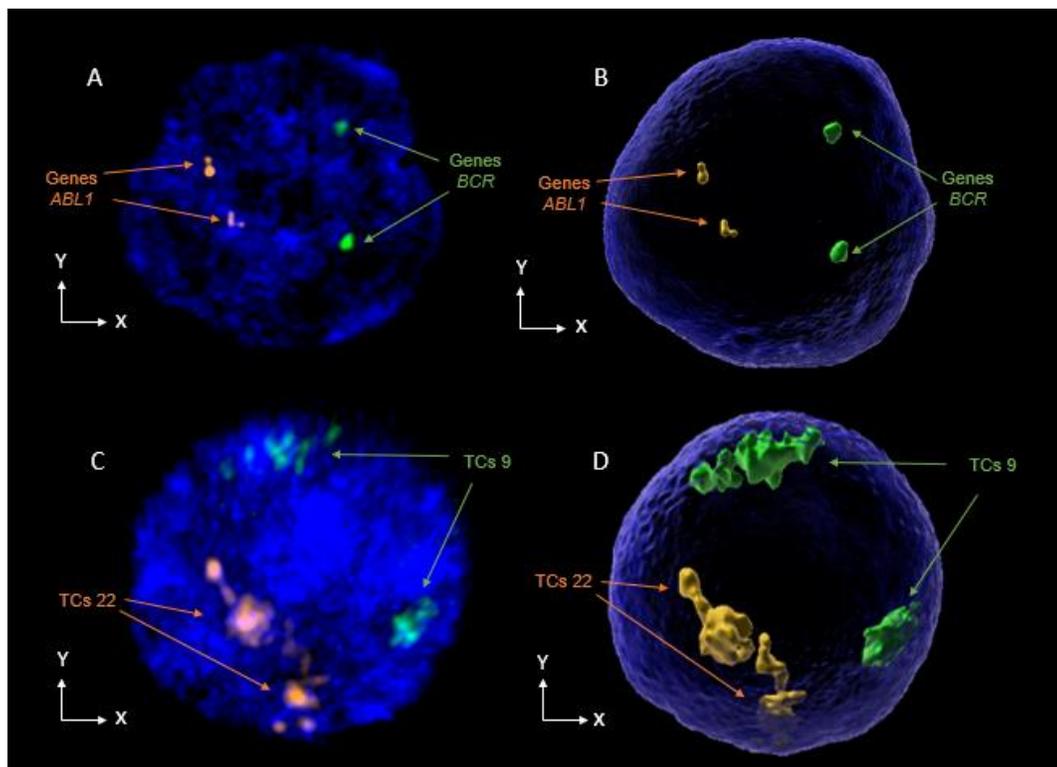


Figura 8. Reconstrucción tridimensional de imágenes SIM. Imágenes SIM (vista lateral X/Y) (A y C) y reconstrucción 3D (vista lateral X/Y) (B y D) de células CD34+.

Se muestran imágenes representativas de la hibridación para los genes BCR (verde) y ABL1 (naranja) (A, B), así como de los TCs 9 (verde) y 22 (naranja) (C, D).

5.3 Reconocimiento y cuantificación de compartimientos por cada TC

Las reconstrucciones tridimensionales de los TCs9 y TCs 22, a su vez, mostraron diferentes números de compartimientos por TCs y de los cuales se distinguieron patrones que se denominaron 'variantes'. Estas variantes fueron previamente reconocidas en un estudio reciente en el que también se evaluaron los TCs 9 y 22, describiendo un total de 14 variantes organizacionales en pacientes con LMC, de las cuales se reconocieron 10 variantes en individuos sanos (Fabian-Morales y col., 2021).

Basados en este antecedente, se analizó el número de compartimientos de cada TC9 y 22 y se reconocieron un total de 5 de las variantes previamente descritas por Fabian-Morales y colaboradores, todas correspondientes a población sana (Figura 9A). Las variantes más comunes fueron la 1 y 2 (Ver Figura 9A), caracterizada por la presencia de dos compartimientos para el TC 9 y al menos un compartimiento para el TC 22. En el análisis del paciente MOS 1, se encontró un 83% de la variante 1 (2 TCs 22 y 2 TCs 9) y un 17 % de la variante 10 (3 TCs 9 y 2 TCs 22). El paciente MOS 2 presento 3 variantes, 62% de la variante 1, 25% de la variante 2 (2 TCs 9 y 1 TC 22) y un 13% de la variante 3 (1 TC 9 y 2 TCs 22). En los pacientes MOS 3 y MOS 6 se observaron dos variantes (1 y 2), donde la variante 1 se encontró con mayor porcentaje, con un 67% y un 75% sucesivamente. Por su parte, los pacientes MOS 4 y MOS 5 mostraron un 100% de la variante 1 de todas las pruebas analizadas y pertenecientes a cada paciente, así como también, las células PrEC, que mostraron un 100% de la variante 1. El paciente MOS 7 presentó el 75% de la variante 1 y el 25 % de la variante 3. El paciente MOS 8, resultó ser la muestra con más variantes, 62% de la variante 2, 25 % de la variante 3 y 13% de la variante 4 (1 TC 9 y 1 TC 22).

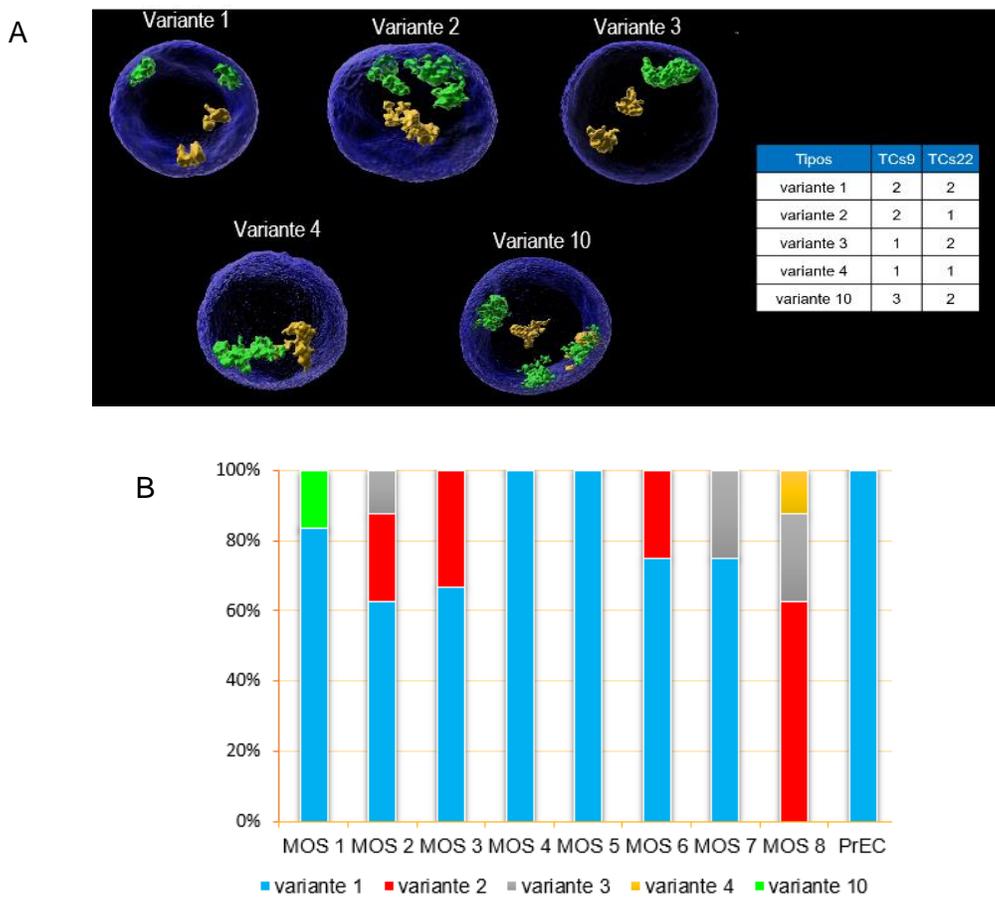


Figura 9. Reconstrucciones tridimensionales de los TCs 9 y TCs 22. A) Se identificaron 5 variantes en la cuantificación de los compartimientos de los TCs. En el cuadro se muestra la variante y el número de compartimientos identificados por variante (Imagen modificada de Fabian-Morales, et al. 2021) B) Porcentaje de las variantes identificadas en cada individuo, siendo MOS 4 y MOS 5 las muestras que presentaron un 100% de células analizadas con la variante 1.

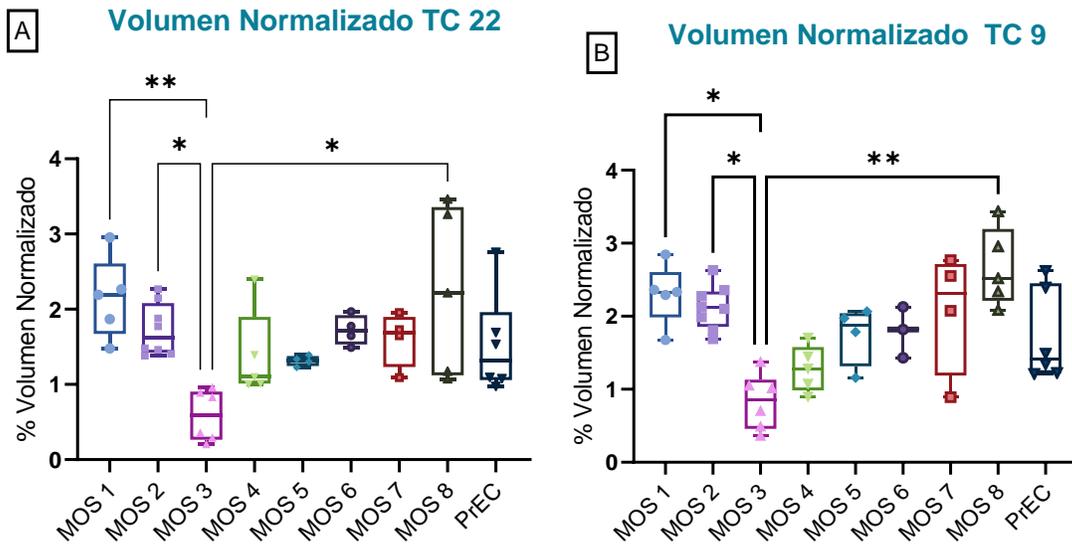
5.4 Volumen normalizado de TCs en individuos sanos

Como se mencionó en la Introducción, el tamaño de los territorios puede caracterizar y posicionar a los TCs en el núcleo. Asimismo, el tamaño de los cromosomas se identifica como un factor determinante de la frecuencia de translocación. Al normalizar los volúmenes de los TCs en todos los individuos, nos permitió automáticamente eliminar la redundancia y la dependencia incoherente de los datos

para las comparaciones entre los individuos sanos. Los resultados se muestran en la Figura 10.

El TC 9 tuvo en promedio mayor volumen que el TC 22 dentro del núcleo de las células; con excepción del caso de MOS 4, en el que el TC 22 representa mayor porcentaje de volumen que TC9. Así mismo, observamos los volúmenes más altos de ambos TCs en la muestra MOS 8 y los volúmenes bajos en MOS 3. Específicamente, se observó que MOS 3 presentó diferencia estadísticamente significativa respecto a MOS 1, MOS 2 y MOS 8 (Figura 10 A y B).

Estimando el factor de descompactación de cromatina (FDC), definido como el volumen normalizado de 1 mega par de bases (Mbp) de la secuencia de DNA encontramos que el TC 22 fue el territorio que en general presentó mayor descompactación comparado con el TC9 en todos los grupos. El FDC máximo para ambos TCs se observó en las muestras MOS 1 Y MOS 8. Asimismo, el análisis de FDC mostró que MOS 3 fue la muestra con la menor descompactación (Figura 10C).



C Factor de descompactación de la cromatina

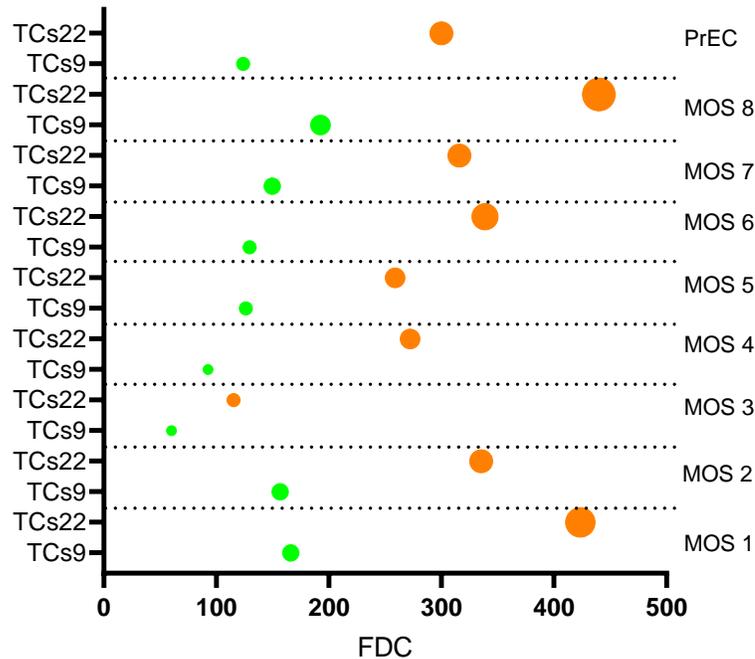
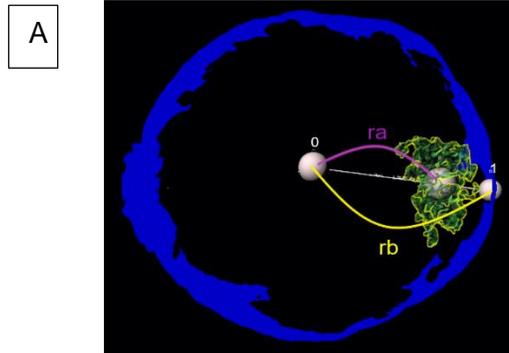


Figura 10. Volumen Normalizado de TCs. A) La comparación múltiple de los volúmenes de TC 22 normalizados entre los diferentes individuos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en MOS 1, MOS 2 y MOS 8, todos respecto a MOS 3. B) Los resultados del análisis de comparación múltiple de los volúmenes TC9 normalizados entre los individuos demostraron diferencias estadísticamente significativas en MOS 1, MOS 2 y MOS 8, todos respecto a MOS 3. C) Comparación de FDC entre los TCs 9 (verde) y 22 (naranja). En todos los casos el TC que se observa más descompactado es el TC22.

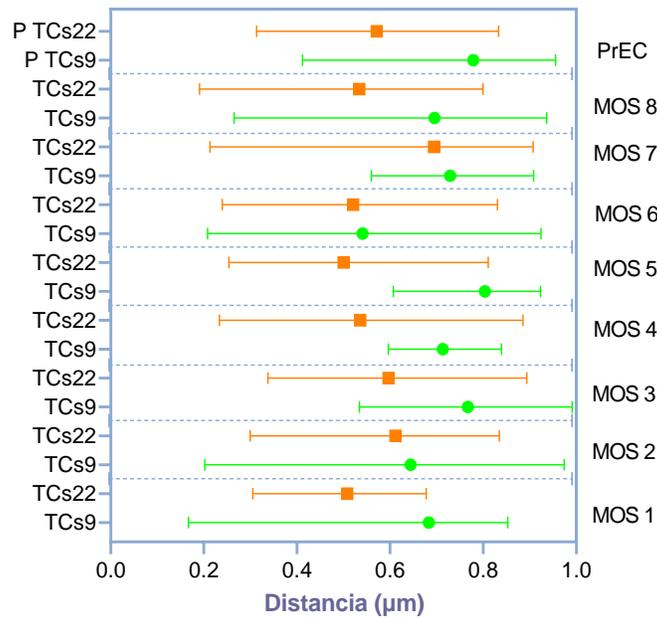
5.5 Posición radial relativa de los genes ABL1 y BCR, y TCs.

De acuerdo con lo descrito previamente en la metodología, la posición relativa de los genes *ABL1* y *BCR*, y TCs se determinó dividiendo la relación nuclear (rb) entre la distancia del centro de masa del núcleo a los centros de gravedad de los genes y TCs (ra) (Figura 11 A). Estudios anteriores caracterizaron la posición del gen *BCR* y TC 9 y, en una posición preferentemente periférica y el gen *ABL1* y el TC 22 en una posición central en núcleos relativamente esféricos (Fabian-Morales y col., 2021).

Nuestros resultados indicaron que la posición radial relativa del TC 9 tiende a ubicarse más hacia la periferia nuclear que TC 22 en todas las muestras evaluadas (Figura 11B). Por el contrario, el gen *ABL1* se ubica más a la periferia que *BCR* en MOS 3, MOS 4, MOS 7 y MOS 8. (Figura 11C).



B **Posición Radial Relativa de TCs**



C Posición Radial Relativa de genes *ABL1* y *BCR*

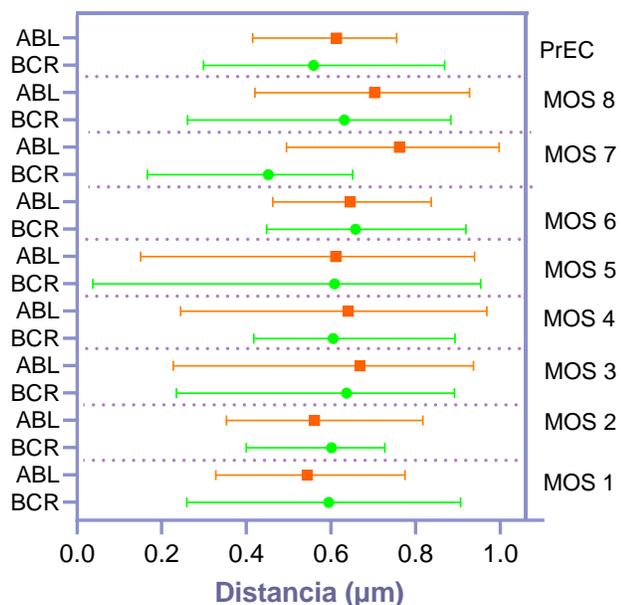
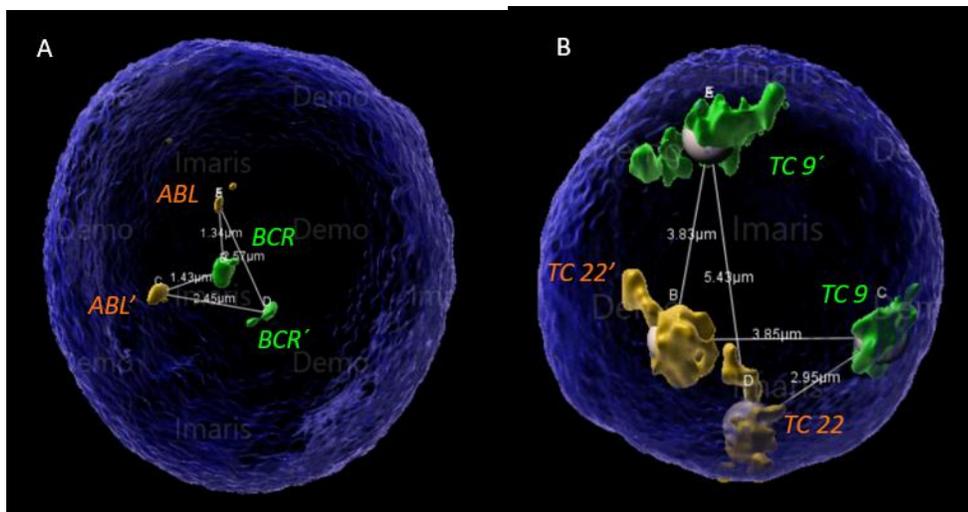


Figura 11. Posiciones radiales relativas de los genes *ABL1* y *BCR* y de TCs 9 y 22. (A) Esquema representativo de cómo se tomaron las medidas para calcular la posición relativa de los TCs. El centro del núcleo se definió como 0, y la distancia entre 0 y cada señal alélica se definió como rA . La relación nuclear (rB) se definió como la distancia entre 0 y la periferia nuclear (1) que pasa por el centro de la señal. B) Posiciones radiales relativas de TC9 y TC22. En el diagrama de bosque se representó el rango de los valores de las posiciones de los TCs9 (verde) y TCs22 (naranja), donde una tendencia a 0 indica proximidad al centro nuclear, mientras que una tendencia a 1 indica proximidad a la periferia. C) Posiciones relativas de los genes *ABL1* y *BCR*. El diagrama de bosque se representó el rango de los valores de las posiciones de los genes *BCR* (verde) y *ABL1* (naranja), donde una tendencia a 0 indica proximidad al centro nuclear, mientras que una tendencia a 1 indica proximidad a la periferia.

5.6 Distancias mínimas entre TC9 y TC22 y entre los genes *BCR* y *ABL1*

Las distancias entre los genes heterólogos (Figura 12 A) y entre TCs heterólogos (Figura 12 B), en función de centros de gravedad de más cercanos, revelaron que las distancias correspondientes son muy variables. La muestra de MOS 5 (individuo de 36 años) mostró la distancia más larga y la muestra MOS 8 (individuo de 60 años) mostró la distancia más corta, ambas mediciones entre genes (Figura 12 C). La distancia más corta entre TCs la mostró MOS 1 (individuo de 26 años) y MOS 7 (individuo de 46 años) la más larga (Figura 12 D). Al analizar globalmente el comportamiento de las distancias entre TCs 22 y TCs 9 y entre los genes *ABL1* y *BCR*, se puede apreciar que su comportamiento es irregular, tiene intervalos de crecimiento y decrecimiento, es decir, las distancias varían en células sanas de individuos de diferente edad. Las distancias entre los genes de MOS 1 a MOS 3 fue aumentando, hasta MOS 4, que presenta una disminución de casi 2 μm , y que posteriormente vuelve a aumentar las distancias. Los datos de las distancias entre los TCs muestran una disminución a partir de MOS 2 hasta MOS 5, donde MOS 6 tiene un aumento en las distancias y posteriormente las siguientes muestras tienden a tener distancias similares a esta.



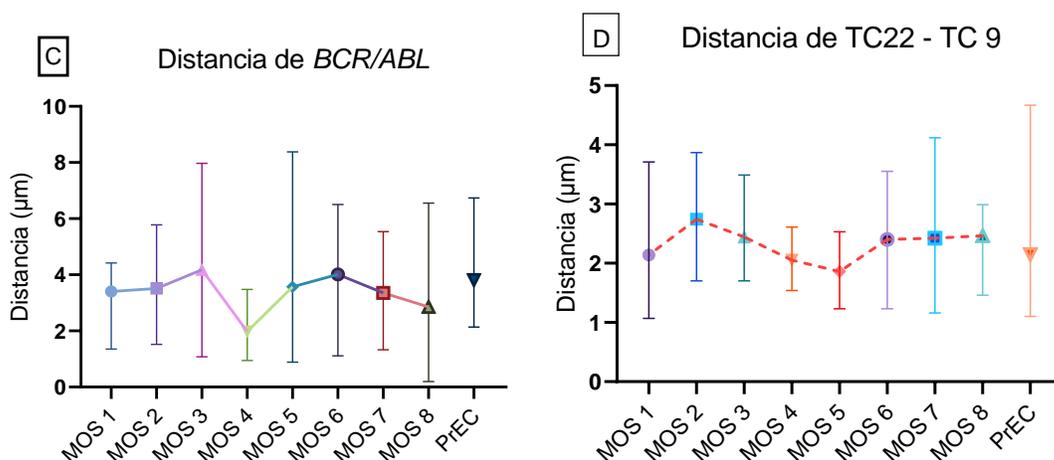


Figura 12. Distancia mínima entre *BCR* y *ABL1* y distancia mínima entre TCs heterólogos. Las reconstrucciones 3D de los genes (A) y TCs (B) permitieron medir las distancias través de su centro de gravedad reconocido automáticamente por IMARIS. C) Las distancias mínimas entre los genes *BCR* y *ABL1*. D) Las distancias mínimas entre los TCs22 y TC.

5.7 Grado de colocación de los TCs heterólogos

El descubrimiento del posicionamiento radial no aleatorio de los TC sugirió la intrigante posibilidad de que pudiera haber patrones de interacciones no aleatorias entre los TCs. Las asociaciones inter cromosómicas se pueden definir en función al grado de entremezclado de TCs, y este fue determinado a partir del volumen de colocación de los TCs 9 y 22, correspondientes a células CD34+ de individuos sanos fueron de >0.3 %.

Además, observamos volúmenes bajos similares entre todas las muestras analizadas. El porcentaje más alto de mezclado de TCs 9-22 se presentó en la muestra MOS 6, aunque particularmente, no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto, existe un menor o ningún rango de variabilidad entre los individuos.

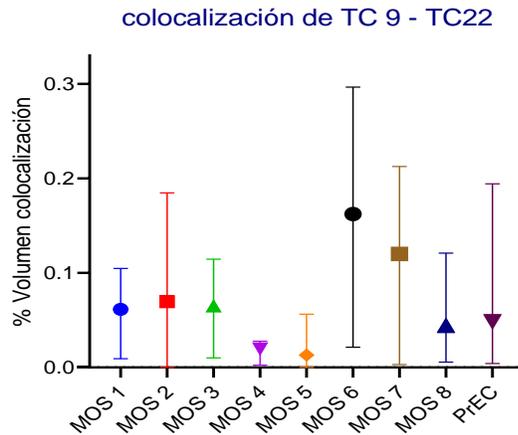


Figura 13. Volumen de colocalización normalizado entre TC9 y TC22. El volumen de colocalización normalizado más alto se presentó en MOS 6.

5.8 Correlación entre edad y número de compartimientos

Las células analizadas de las muestras MOS 4 y MOS 5 mostraron su totalidad la variante 1, siendo la media geométrica de las edades de las muestras, por lo cual evaluamos la asociación de la edad y el porcentaje de presencia de la variante 1. El coeficiente de correlación de Spearman no paramétrico, $r = -0.2169$, indico una variable aumenta a medida que la otra disminuye, sin embargo, al obtener el valor de P (0.6046), no se tiene evidencia convincente de que la correlación sea real y no se deba al azar (Figura 14).

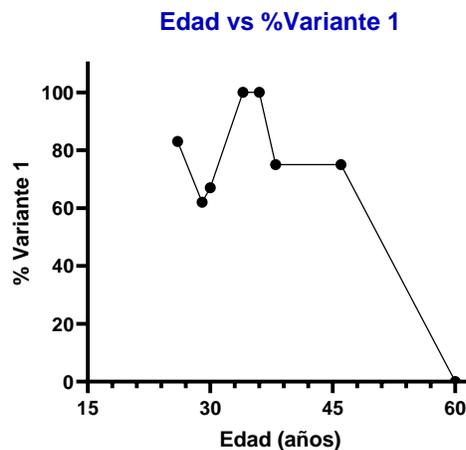


Figura 14. Porcentaje de la variante 1 en las muestras con relación a la edad.

6. DISCUSIÓN

Los TCs son compartimentos estructurales y funcionales que están directamente implicados en la actividad transcripcional de la célula; esta característica, junto con modificaciones estructurales de la cromatina tienen un impacto en la estabilidad del genoma. Los mecanismos que determinan la estructuración y posicionamiento de los TCs no están bien determinados, sin embargo, se sabe que una desregulación en estos mecanismos conlleva a alteraciones a nivel transcripcional y la posibilidad de la generación de aberraciones cromosómicas estructurales que podría desencadenar un proceso carcinogénico.

El uso de las tecnologías de imágenes de alta resolución, 3D-SIM, para analizar la organización topológica de la cromatina en el núcleo y la reconstrucción de imágenes, son herramientas poderosas que permiten analizar diferencias en la organización y distribución espacial de los TCs. El presente estudio se enfocó al análisis topológico de los TCs 9 y 22, así como de los genes *BCR* y *ABL1*, en individuos sanos de diferente edad.

Los resultados del presente trabajo corroboran los datos ya reportados sobre la existencia de diferentes tipos de variantes respecto al número de compartimentos identificados en los TCs22 y TCs 9 (Fabian-Morales y col., 2020). Las reconstrucciones tridimensionales muestran una organización topológica de los TCs 9 y 22 reflejada en cinco tipos de variantes en las células CD34+ de individuos sanos (Figura 9). Particularmente, se identificó la variante 1 (2 compartimentos del TC9 y 2 compartimentos del TC22) como la más representativa en la población, exceptuando la muestra MOS 8 en la que esta variante no se identificó en ninguna de las células analizadas, lo cual coincide con la diferencia de edad, más longeva, que presenta el individuo donador (60 años). En este último caso encontramos que las variantes observadas fueron aquellas en la que se observaba un compartimento ya sea de TC9 o de TC22. Aunque más estudios son necesarios, nuestras observaciones sugieren una asociación entre las propiedades topológicas de

estructura de los TC9 y TC 22 y la edad. Dado que la dinámica de la cromatina juega un papel preponderante en la estructuración de los TCs, es posible que factores epigenéticos como las modificaciones postraduccionales de histonas y proteínas de estructuración involucrados en dicha dinámica también se encuentren alterados (Karoutas y Akhtar, 2021; Kang y col., 2021).

Así mismo, el papel que desempeña el envejecimiento en la organización nuclear se enfatizan aún más por los hallazgos que vinculan este proceso con las modificaciones postraduccionales, responsables de la descondensación y formación de bucles de cromatina, suficiente para reconstruir la organización de la cromatina y ser los responsables de la interacción entre los TCs. Nuestros resultados amplían los hallazgos que vinculan la estructura de la cromatina y la edad, proponiendo que los TCs 9 y TCs 22 se organizan en el núcleo formando variantes en el número de compartimientos de TCs e inclusive que los TCs homólogos se unen y entrecruzan la cromatina como segmentos de polímero formando un solo TC (Baile y col., 2016; Chen y Kerr, 2019; Huang, 2019).

El tamaño de cada TC se ha sugerido como un factor importante en la determinación de su posición dentro del núcleo (Cremer y Cremer, 2010). Como parte de la caracterización topológica de los TCs 9 y 22, la cuantificación del tamaño reflejado en el volumen de los TCs fue crucial para evaluar posibles diferencias entre cada núcleo y entre cada individuo. Las reconstrucciones tridimensionales nos permitieron determinar el volumen de los TCs de los diferentes individuos, el cual fue importante normalizar con el objetivo de poder hacer comparaciones múltiples eliminando los efectos de influencias y discrepancia debidas a diferencias en el tamaño nuclear. Interesantemente encontramos que el individuo de mayor edad, MOS 8, el cual había reportado menores porcentajes totales de número de compartimientos de TCs, presentó el volumen normalizado más alto en ambos territorios comparados con los demás individuos. En contraparte, los resultados indicaron diferencias estadísticamente significativas en el caso de la muestra MOS 3, la cual presentó el volumen más pequeño en ambos TCs en comparación que las demás muestras.

Estos hallazgos, puntualizan una vez más las diferencias encontradas en una muestra de un individuo con mayor edad en comparación con los más jóvenes. En este sentido, resalta el hecho de que a pesar de que todas las variantes observadas en la muestra MOS 8 incluían la presencia de solo un compartimiento de alguno de los TCs, el volumen se vio incrementado.

Así mismo y dado que la condensación de la cromatina se caracteriza por una reducción del volumen debido a una organización espacial en estructuras densamente empaquetadas de orden superior (Cremer y Cremer, 2010) evaluamos cualitativamente los volúmenes de los TCs utilizando un factor de condensación (FDC), que considera tanto el volumen del TC como la longitud de la molécula de DNA correspondiente a cada cromosoma (Wang y col., 2017). En todos los casos el TC22 fue el que mostro el mayor FDC en comparación con el TC9, lo cual correlaciona con los resultados presentados por Fabian-Morales y colaboradores, así como los resultados expuestos por Sathitruangsak y colaboradores, en las que, al analizar células hematopoyéticas, se observó que tanto las poblaciones de individuos sanos como los pacientes presentaron un FDC mayor en el TC22. Al ser una observación constante, se podría asumir que el TC22 presenta una descondensación de la cromatina mayor que el TC9 como parte de una característica topológica normal al comparar estos dos TCs, en células hematopoyéticas. Para corroborar dicha aseveración, se requieren más estudios que además analicen otra estirpe celular con la finalidad de corroborar si se trata de una característica particular de la estirpe hematopoyética o es una característica generalizada en otras estirpes. De igual forma, si esta característica se ve modificada a lo largo del tiempo como parte de un proceso de envejecimiento celular es una cuestión que se sugiere en el presente estudio, pero requiere ser corroborada (Sathitruangsak y col., 2017; Fabian-Morales y col., 2021).

Los análisis de secciones de tejido o células aisladas mediante el uso de sondas de hibridación *in situ* con fluorescencia 3D de cromosomas completos mostraron que en el núcleo en interfase, la posición relativa de los cromosomas dentro del espacio

nuclear 3D no es aleatoria y depende de muchos factores, incluido el tipo de célula, la diferenciación, estadio, tamaño de los cromosomas y densidad rico o pobre en genes (Cremer y col., 2017). El análisis presentado en este estudio mostró las reconstrucciones 3D que caracterizaron a los TCs 9 en una posición periférica y a los TCs 22 en una posición más céntrica. Esta relación se presentó en promedio de todas las células analizadas, a excepción de las células del individuo MOS 7, que mostro TCs 22 más céntricas y más periféricas respecto a TCs 9. Estos resultados sugieren que existen cambios en el posicionamiento de los TCs y genes entre individuos que muy probablemente no estén relacionados con la edad de los mismos. No obstante, esta variabilidad podría responder a requerimientos funcionales y transcripcionales específicos de la célula. Sin embargo, mayores estudios serán necesarios para corroborar esta posible asociación.

Por otra parte, las posiciones radiales de los alelos *BCR*, adoptaron una posición periférica en un 50% de toda la población analizada, es decir, cuatro de los ocho individuos indicaron distancias medias más largas de *BCR* respecto al centro del núcleo. Lo que resulta notable resaltar de esta observación es que el locus del gen *BCR* está en 22q11, es decir, se localiza en el TC22 el cuál tiende a ubicarse más cercano al centro nuclear. Esta discrepancia en la localización refleja lo que resultaría un proceso dinámico y variable que, de acuerdo con estudios previos, está asociado a la tasa de transcripción particular de cada gen, de modo que la ubicación de los genes puede cambiar de acuerdo a su etapa de transcripción afectada por su topología nuclear (Shah y col., 2018).

En cáncer, es común encontrar alteraciones cromosómicas como las translocaciones cuya etiología está ligada a la conformación tridimensional de los TCs. La proximidad física de las regiones cromosómicas involucradas en una translocación juega un papel muy importante en la predisposición de éstas a unirse ilegítimamente produciendo las translocaciones. Evidencia de ello es observable en la frecuencia de translocaciones que resultan ser específicas de tipo celular, al igual que su configuración tridimensional (Sathitruangsak y col., 2017). En este trabajo hemos

medido las distancias entre TCs 22 y TCs 9 y entre genes *ABL1* y *BCR* en células hematopoyéticas en 3D pertenecientes a diferentes individuos de diferente edad con la finalidad de evaluar si existen cambios en dichas distancias entre individuos de diferentes edades. Nuestras observaciones revelan que las distancias más cortas entre *BCR* y *ABL1* se observan en MOS 4 (34 años) y las distancias más cortas entre los TCs heterólogos se observaron en MOS 5 (36 años), sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras por lo que se requieren mayores estudios para descartar o aseverar que realmente existen diferencias entre individuos ni que éstas estén asociadas a la edad. Por otro lado, cabe resaltar que se observó una variación mayor en la distancia entre genes en comparación con la distancia mostrada entre TCs. Esta dinámica nos habla de una mayor estabilidad en el posicionamiento de los TCs a diferencia de los genes, en cuyo caso la actividad transcripcional puede estar jugando un papel muy importante en el posicionamiento dinámico de los mismos (Lupiáñez y col., 2016; Fabian-Morales y col., 2021).

Una de las características topológicas de los TCs a la que se le han atribuido diversas propiedades, es el entremezclado entre TCs heterólogos. Las implicaciones fisiológicas de estas regiones de entremezclado o solapamiento han sido ampliamente estudiadas; y se ha sugerido que las regiones de solapamiento entre cromosomas contienen potencialmente una mayor densidad de secuencias reguladoras y podrían mediar en las interacciones entre los cromosomas. Dada la importancia fisiológica de esta propiedad, en el presente estudio hemos analizado el grado de mezclado de los TCs en cada individuo. Demostramos que, independientemente, el porcentaje más alto de mezclado de TCs 9-22 se presentó en la muestra MOS 6, no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa, indicando que existe un menor o ningún rango de variabilidad entre los individuos. Adicionalmente, esperábamos observar una asociación entre las distancias mínimas entre TCs heterólogos y el porcentaje de entremezclado en estos TCs, sin embargo, esta relación no fue observable en nuestra población.

Finalmente, y teniendo en cuenta que la edad podría estar involucrada en variabilidad de la organización y dinámica de TCs entre individuos sanos, evaluamos la correlación entre la edad y todas las variantes estudiadas en el presente trabajo. Sin embargo, no encontramos una correlación significativa entre nuestras variables y la edad de los individuos estudiados. Se presenta en cambio, una posible asociación entre el porcentaje de la presencia de la Variante 1 y la edad, que, aunque no es significativa, sugiere una posible relación entre la configuración estructural de los TCs 9 y 22 y cambios respecto a la edad de los individuos. Esta observación provee evidencia de una variación en organización de los TCs de un individuo a otro que podría estar dado por exposiciones ambientales y defectos en el mantenimiento de la estabilidad genómica que sufre la célula a consecuencia de un proceso normal de envejecimiento. Sin embargo, mayores estudios son necesarios para corroborar nuestros hallazgos y los posibles cambios a nivel estructural y mecanismos particularmente epigenéticos, que podrían estar involucrados como parte del proceso de envejecimiento celular. A pesar de las limitaciones, nuestras observaciones en el número de TCs, tamaños y distancias entre los alelos heterólogos y TCs heterólogos sugieren una heterogeneidad entre individuos sanos.

7. CONCLUSIONES

La organización del genoma tiene un papel fundamental en la regulación de las funciones celulares. Los cromosomas estructuran una red de interacciones genéticas que involucra a todo el genoma, creando así un sistema regulado por la organización nuclear tridimensional.

El presente estudio tuvo como objetivo abordar los posibles cambios estructurales y de posicionamiento a nivel de TCs, particularmente los TCs 9 y 22 en células hematopoyéticas CD34+ de individuos sanos de diferente edad, con el objetivo de corroborar una posible asociación entre el envejecimiento celular y cambios en la estructura tridimensional del genoma.

Dado que el genoma de cada individuo experimenta mutaciones y cambios inducidos por el medio ambiente que alteran los sistemas epigenéticos es factible que estos cambios puedan alterar la organización de los TCs (Tiffon, 2018). La arquitectura del núcleo y su relación con los TC representa una nueva dimensión del control regulador que se relaciona con mecanismos epigenéticos y organización de la cromatina (Dekker y Mirny, 2017, Uhler y Shivashankar, 2017). Así mismo, la participación observada de la organización de la cromatina en el control del envejecimiento es un fenómeno intrigante que necesita investigaciones adicionales para revelar los mecanismos moleculares exactos implicados en él. Y aunque los ensayos realizados en este estudio estuvieron limitados por el número de células e individuos analizados, nuestros resultados sugieren una variabilidad en la organización nuclear, y sobre todo en la configuración de la estructura de los TCs 9 y 22 en individuos sanos de diferente edad, lo cual abre nuevas perspectivas que requieren ampliar el tamaño de muestra y estudios prospectivos que puedan arrojar resultados contundentes.

Por lo cual las conclusiones de este proyecto se pueden sintetizar en los siguientes puntos:

- La variabilidad interindividual para número de TCs 9 y 22 sugiere una heterogeneidad entre personas sanas.
- El TC 22 presenta una descondensación de la cromatina mayor que el TC 9 como parte de una característica topológica normal
- Existen cambios en el posicionamiento de los TCs y genes entre individuos

6. REFERENCIAS

AbuSamra DB, Aleisa FA, Al-Amoodi AS, Jalal Ahmed HM, Chin CJ, Abuelela AF, Merzaban JS. Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44. *Blood advances* **2017**; 1(27), 2799-2816.

Adam S, Dabin J, Chevallier O, Leroy O, Baldeyron C, Corpet A, Lomonte P, Renaud O, Genevieve A, Polo SE. Real-time tracking of parental histones reveals their contribution to chromatin integrity following DNA damage. *Mol Cell* **2016**;64(1):65-78.

Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, Sengupta S, Bertrand D, Weerasinghe A, Schein JE. Comprehensive characterization of cancer driver genes and mutations. *Cell* **2018**; 173(2), 371-385.

Balajee AS, Sanders JT, Golloshi R, Shuryak I, McCord RP, Dainiak N. Investigation of Spatial Organization of Chromosome Territories in Chromosome Exchange Aberrations After Ionizing Radiation Exposure: *Health Phys.* **2018** Jul;115(1):77–89.

Boyle W, Chow A. Isolation of human lymphocytes by a Ficoll barrier method. *Transfusion* **1969**;9(3):151-155.

Brickner J. Genetic and epigenetic control of the spatial organization of the genome. *Molecular biology of the Cell* **2017**;28(3), 364-369.

Chandra T, Ewels PA, Schoenfelder S, Furlan-Magaril M, Wingett SW, Kirschner K, Thuret J, Andrews S, Fraser P, Reik W. Global reorganization of the nuclear landscape in senescent cells. *Cell Rep*, **2015**; 10(4), 471–484.

Chen D, Kerr C. The epigenetics of stem cell aging comes of age. *Trends Cell* **2019**; 29(7), 563-568.

Chen Y, Zhang Y, Wang Y, Zhang L, Brinkman EK, Adam SA, Goldman R, van Steensel B, Ma J, Belmont AS. Mapping 3D genome organization relative to nuclear compartments using TSA-Seq as a cytological ruler. *J Cell Biol* **2018**;217, 4025–4048.

Cremer M, Schmid VJ, Kraus F, Markaki Y, Hellmann I, Maiser A, Leonhardt H, John S, Stamatoyannopoulos J, Cremer T. Initial high-resolution microscopic mapping of

active and inactive regulatory sequences proves non-random 3D arrangements in chromatin domain clusters. *Epigenetics Chromatin* **2017**; 10: 39.

Cremer T, Cremer M. Chromosome territories. *Csh Perspect Biol* **2010**;2(3): a003889.

Crosetto N, Bienko M. Radial Organization in the Mammalian Nucleus. *Front Genet* **2020**;11,33.

Deininger MW, Shah NP, Altman JK, Berman E, Bhatia R, Bhatnagar B, DeAngelo DJ, Gotlib J, Hobbs G, Maness L, Mead M, Metheny L, Mohan S, Moore JO, Naqvi K, Oehler V, Pallera AM, Patnaik M, Pratz K, Pusic I, Rose MG, Smith D, Snyder DS, Sweet KL, Talpaz M, Thompson J, Yang DT, Gregory KM, Sundar H. Chronic Myeloid Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* **2020**; 18(10), 1385-1415.

Dekker J, Belmont AS, Guttman M, Leshyk VO, Lis JT, Lomvardas S, Mirny LA, O'Shea CC, Park PJ, Ren B, Ritland JC, Shendure J, Zhong S. The 4D nucleome project. *Nature* **2017**;549(7671), 219-226.

Dekker J, Mirny L. The 3D Genome as Moderator of Chromosomal Communication. *Cell* **2016**;164, 1110–1121.

Fabian-Morales E, Vallejo-Escamilla D, Gudiño A, Rodríguez A, González-Barrios R, Rodríguez Torres YL, Castro Hernández C, de la Torre-Luján AH, Oliva-Rico DA, Ornelas Guzmán EC, López Saavedra A, Frias S, Herrera LA. Large-scale topological disruption of chromosome territories 9 and 22 is associated with nonresponse to treatment in CML. *Int J Cancer* **2021**; 10.1002/ijc.33903. PMID: 34913480.

Finn EH., Misteli T. Molecular basis and biological function of variability in spatial genome organization. *Science* **2019**;365, 365.

Foster HA, Estrada-Girona G, Themis M, Garimberti E, Hill MA, Bridger JM, Anderson RM. Relative proximity of chromosome territories influences chromosome exchange partners in radiation-induced chromosome rearrangements in primary human bronchial epithelial cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* **2013**; 756(1-2), 66-77.

Galupa R, Heard E. X-chromosome inactivation: a crossroads between chromosome architecture and gene regulation. *Annu Rev Genet* **2018**;52, 535-566.

Gatto S, Gagliardi M, Franzese M, Leppert S, Papa M, Cammisa M, Grillo G, Velasco G, Francastel C, Toubiana S, D'Esposito M, Angelini C, Matarazzo MR. ICF-specific DNMT3B dysfunction interferes with intragenic regulation of mRNA transcription and alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **2017**;45(10):5739-5756.

Georgieva M, Staneva D, Miloshev G. Epigenetic Significance of Chromatin Organization During Cellular Aging and Organismal Lifespan. *Epigenetics, the Environment, and Children's Health Across Lifespans*. Springer Cham **2016**; 21-66.

Ghavi-Helm Y, Jankowski A, Meiers S, Viales RR, Korbel JO, Furlong EEM. Highly rearranged chromosomes reveal uncoupling between genome topology and gene expression. *Nat Genet* **2019**;51, 1272–1282.

Gorbunova V, Seluanov A. DNA double strand break repair, aging and the chromatin connection. *Mutat Res* **2016**;788, 2-6

Gordon LB, Rothman FG, Lopez-Otin C, Misteli T. Progeria: A paradigm for translational medicine. *Cell* **2014**;156(3).

Halfon MS. Silencers, Enhancers, and the Multifunctional Regulatory Genome. *Trends Genet* **2020**;36, 149–151.

Huang B, Wang B, Lee WYW., Leung KT, Li X, Liu Z, Jiang X. KDM3A and KDM4C regulate mesenchymal stromal cell senescence and bone aging via condensin-mediated heterochromatin reorganization. *Science*, **2019**;21, 375-390.

Hanscom T, McVey, M. Regulation of error-prone DNA double-strand break repair and its impact on genome evolution. *Cells* **2020**;9(7), 1657.

HIMFG. Hospital Infantil de México Federico Gómez. Protocolo de trasplante de células progenitora hematopoyéticas. Departamento de Oncología Pediátrica. HIMFG **2011**.

Ismail SI, Naffa RG, Yousef AMF, Ghanim MT. Incidence of bcr-abl fusion transcripts in healthy individuals. *Mol Med Rep* **2014**; 9(4), 1271-1276.

Jagannathan M, Cummings R, Yamashit, YM. The modular mechanism of chromocenter formation in *Drosophila*. *eLife* **2019**;8:e43938.

Kang SM, Yoon MH, Ahn J, Kim JE, Kim SY, Kang SY, Joo J, Park S, Cho JH, Woo TG, Oh AY, Chung KJ, An SY, Hwang TS, Lee SY, Kim JS, Ha NC, Song GY, Park BJ. Progerinin, an optimized progerin-lamin A binding inhibitor, ameliorates premature senescence phenotypes of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Commun Biol* **2021**;4(1):5.

Kang ZJ, Liu Y F, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, Liu Q. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*. **2016**;35(1):48.

Karoutas A, Akhtar A. Functional mechanisms and abnormalities of the nuclear lamina. *Nat Cell Biol* **2021**;(2):116-126.

Kemeny S, Tatout C, Salaun G, Pebrel-Richard C, Goumy C, Ollier N, Gouas L. Spatial organization of chromosome territories in the interphase nucleus of trisomy 21 cells. *Chromosoma* **2018**;127(2), 247-259.

Langan TJ, Rodgers KR, Chou RC. Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation. In *Cell cycle synchronization*. Humana Press, New York, NY **2017**; 97-105.

Lupiáñez DG, Spielmann M, Mundlos S. Breaking TADs: how alterations of chromatin domains result in disease. *Trends in Genetics* **2016**;, 32(4), 225-237.

Matarazzo MR, Boyle S, D'Esposito M, Bickmore WA. Chromosome territory reorganization in a human disease with altered DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2007** Oct 16;104(42):16546-51.

Meaburn KJ, Burman B, Misteli T. Spatial genome organization and disease. In the *Functional Nucleus*. Springer Cham **2016**;101-125.

Mehta IS, Kulshreshtha M, Chakraborty S, Kolthur-Seetharam U, Rao BJ. Chromosome Territories Reposition During DNA Damage-Repair Response. *Biophys J* **2014**;106(2):79a.

Mirny LA, Imakaev M, Abdennur N. Two major mechanisms of chromosome organization. *Curr Opin Cell Biol*; **2019**; 58, 142–152.

Misteli T. The self-organizing genome: Principles of genome architecture and function. *Cell* **2020**;183(1):28-45.

Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Science advances* **2016**; 2(7), e1600584.

Pegoraro G, Misteli T. The central role of chromatin maintenance in aging. *Aging* (Albany NY), **2019**;1(12), 1017–1022

Roukos V, Burman B, Misteli T. The cellular etiology of chromosome translocations. *Curr Opin Cell Biol* **2013**;25(3):357–364.

Roukos V, Misteli T. The biogenesis of chromosome translocations. *Nat Cell Biol* **2014**;16(4):293.

Satta Y, Katsura Y, Iwase M. Genes on X and Y Chromosomes. In *Evolution of the Human Genome I* Springer, Tokyo **2017**; p. 159-172.

Sathitruangsak C, Righolt CH, Klewes L, Tung Chang D, Kotb R, Mai S. Distinct and shared three-dimensional chromosome organization patterns in lymphocytes, monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Int J Cancer* **2017**; *140*(2), 400-410.

Shaban HA, Seeber A. Monitoring the spatio-temporal organization and dynamics of the genome. *Nucleic Acids Res* **2020**;48, 3423–3434.

Shah S, Takei Y, Zhou W, Lubeck E, Yun J, Eng CHL, Koulena N, Cronin C, Karp C, Liaw EJ, Amin M, Cai L. Dynamics and spatial genomics of the nascent transcriptome by intron seqFISH. *Cell*; **2018**;174(2), 363-376.

Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* **2010**;190(2):165–75.

Sundaram DNM, Jiang X, Brandwein JM, Valencia-Serna J, Remant KC, Uludağ H. Current outlook on drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML) and potential therapeutic options. *Drug Discov Today* **2019**;24(7):1355-1369.

Szczepińska T, Rusek AM, Plewczyński D. Intermingling of chromosome territories. *Genes Chromosomes Cancer* **2019**;58(7), 500-506.

Tiffon C. The impact of nutrition and environmental epigenetics on human health and disease. *Int J Mol Sci* **2018**; *19*(11), 3425.

Torabi K, Wangsa D, Ponsa I, Brown M, Bosch A, Vila-Casadesús M, Ried T. Transcription-dependent radial distribution of TCF7L2 regulated genes in chromosome territories. *Chromosoma* **2017**;126(5), 655-667.

Uhler C, Shivashankar GV. Chromosome intermingling: mechanical hotspots for genome regulation. *Trends Cell Biol* **2017**; *27*: 810- 819.

van Steensel B, Furlong EEM. The role of transcription in shaping the spatial organization of the genome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2019**; 20, 327–337.

Wang F, Zhang W, Yang Q, Kang Y, Fan Y, Wei J, Liu Z, Dai S, Li H, Li Z, Xu L, Chu, Qu J, Si C, Ji W, Liu G-H, Long C, Niu Y. Generation of a Hutchinson–Gilford progeria syndrome monkey model by base editing. *Protein & cell* **2020**; 11(11), 809-824.

Wang RC, Chang, CCJ. Chronic Myeloid Leukemia, BCR-ABL1 Positive. In *Precision Molecular Pathology of Myeloid Neoplasms*. Springer Cham **2018**;99-113.

Wang Y, Nagarajan M, Uhler C, Shivashankar GV. Orientation and repositioning of chromosomes correlate with cell geometry–dependent gene expression. *Molecular biology of the cell* **2017**; 28(14), 1997-2009.

Wang S, Su JH, Beliveau BJ, Bintu B, Moffitt JR, Wu CT, Zhuang X. Spatial organization of chromatin domains and compartments in single chromosomes. *Science* **2016**;353, 598–602.

Yagi M, Kabata M, Tanaka A, Ukai T, Ohta S, Nakabayashi K, Shimizu M, Hata K, Meissner A, Yamamoto T, Yamada Y. Identification of distinct loci for de novo DNA methylation by DNMT3A and DNMT3B during mammalian development. *Nat Commun* **2020**;11(1):3199.

Yu R, McCauley B, Dang W. Loss of chromatin structural integrity is a source of stress during aging. *Hum Genet* **2020**;1-10

C.U., Querétaro, junio 14, 2021
No. de oficio. CBQ21/025

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Facultad de Química
Presente

At'n. María Guadalupe Velázquez Ramírez

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado “**Análisis de la dinámica y variación de los territorios cromosómicos 9 y 22 y los genes *Bcr* y *Abl1* en células CD34+ movilizadas de sangre periférica**”, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **aprobado**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.



Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Presidente



M.I.M. David Gustavo García Gutiérrez
Representante investigador