



# **Universidad Nacional de La Plata**

---

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Trabajo para optar por el título de  
Doctor en Ciencias Naturales

Análisis de inestabilidad telomérica en la progenie de  
células de rata expuestas a mutágenos químicos y en un  
modelo murino de inducción tumoral

Doctorando: Lic. Natalia Soledad Paviolo

Director: Dr. Alejandro Daniel Bolzán

Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis IMBICE, La Plata

2014

A mi familia y  
abuelos

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y al Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) por el recurso físico brindado.

Al Dr. Alejandro Bolzán, quién me permitió llevar a cabo el presente trabajo de Tesis Doctoral en el IMBICE bajo su dirección y por su enorme paciencia, dedicación y empeño en brindarme las pautas a seguir en este trabajo y fundamentalmente por su buena predisposición para orientarme en los momentos más difíciles del trabajo

Al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable de Montevideo, Uruguay (IIBCE), especialmente al Dr. Gustavo Folle y el Lic. Federico Santiñaque por la colaboración brindada en el desarrollo de la técnica de Tel-Flow-FISH para realizar las mediciones de longitudes teloméricas.

A Daniel Castrogiovanni del Sector de Cultivos Celulares del IMBICE por haberme cedido la línea celular utilizada en la presente Tesis Doctoral y haberme orientado con las tareas de cultivo celular *in vitro*.

Al Laboratorio de Cronobiología de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) por la colaboración en el desarrollo de las actividades realizadas con la línea B16 de melanoma murino.

A la Lic. Julieta Parisi por su apoyo y colaboración en el desarrollo de los cultivos celulares.

A mi familia por su apoyo, comprensión y aliento en los momentos más difíciles de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí estos años, por el esfuerzo diario y charlas compartidas y finalmente, a mis amigas, Cristina, Daniela y Pamela por todos estos años en los que me brindaron su apoyo, colaboración y comprensión a lo largo de este camino.

## **Publicaciones derivadas del presente trabajo de Tesis Doctoral:**

### **En Revistas indexadas:**

-Paviolo N.S., Quiroga I.Y., Castrogiovanni D.C., Bianchi M.S. y Bolzán A.D. Telomere instability is present in the progeny of mammalian cells exposed to bleomycin. *Mutat. Res.* (734) 5-11, 2012.

-Paviolo N.S., Castrogiovanni D.C y Bolzán A.D. The radiomimetic compound streptonigrin induces persistent telomere dysfunction in mammalian cells. *Mutat. Res.* (760): 16-23, 2014.

## RESUMEN

Los telómeros son complejos nucleoproteicos localizados en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Están involucrados en la preservación de la integridad de los mismos, protegiéndolos de la degradación por nucleasas y de la recombinación y fusión con otros cromosomas. Por lo tanto, el mantenimiento de la función telomérica resulta fundamental para la estabilidad genómica y la viabilidad celular. Dado que una cantidad importante de mutágenos químicos son utilizados como agentes antitumorales, el estudio del daño inducido a nivel genético por estos compuestos reviste gran interés. El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral consistió en obtener nuevos conocimientos para lograr una mejor comprensión de los efectos de los mutágenos químicos sobre los telómeros de los cromosomas eucarióticos y estudiar la inestabilidad telomérica en un modelo murino de inducción tumoral. De este modo, se pretende establecer si los mutágenos químicos inducen inestabilidad telomérica retardada o persistente y si el desarrollo tumoral se relaciona o asocia con alteraciones específicas en el patrón de expresión de los genes ligados al mantenimiento telomérico. Para tal fin, en primer término se abordó el estudio de la inestabilidad telomérica (IT). Este comprende el análisis del daño cromosómico a nivel telomérico, los eventuales cambios en la longitud telomérica y en la actividad de la enzima telomerasa en la progenie de las células de rata ADIPO-P2, que fueron expuestas inicialmente a los mutágenos químicos bleomicina (BLM), estreptonigrina (EN) y estreptozotocina (EZ). Si bien se conocen parcialmente los efectos inmediatos o a corto plazo de algunos mutágenos químicos sobre los telómeros, se desconoce qué es lo que ocurre a largo plazo con los telómeros de las células que sobreviven al tratamiento con un mutágeno dado y si los mutágenos químicos inducen inestabilidad telomérica retardada tal como ocurre con las radiaciones ionizantes.

El análisis de las aberraciones cromosómicas se llevó a cabo aplicando la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica. Asimismo, se estudió la actividad de la enzima telomerasa, utilizando un kit comercial específico y la longitud telomérica se determinó mediante la técnica de Flow-FISH por citometría de flujo. Nuestros resultados demuestran que los mutágenos químicos BLM, EN y EZ pueden inducir inestabilidad telomérica hasta al menos 15 días después del tratamiento con los mismos. Asimismo, se evidenció que los llamados cromosomas incompletos (CI), a pesar de carecer de un extremo cromosómico, pueden ser transmitidos a la progenie de las células que fueron originalmente expuestas a dichos mutágenos. Además, se

determinó que las células expuestas a los mutágenos químicos mencionados son cromosómicamente inestables desde la primera división mitótica luego del tratamiento.

Por otro lado, se observó que en las células ADIPO-P2 expuestas a los mutágenos, BLM, EN y EZ, la actividad de la enzima telomerasa depende de la presencia de telómeros cortos y no se correlaciona directamente con la inestabilidad telomérica registrada citogenéticamente. De esta manera, los resultados de la presente investigación permitieron obtener un mejor conocimiento de los efectos de los mutágenos químicos antitumorales sobre el genoma a largo plazo y por lo tanto, contribuirán a una mejor comprensión de su modo de acción sobre las células, lo cual resulta de fundamental importancia al momento de evaluar la eficacia y uso terapéutico de dichos compuestos.

En segundo término, para determinar si el desarrollo tumoral *in vivo* se relaciona con alteraciones en el perfil de expresión de genes teloméricos (complejo shelterina), se estudió la actividad transcripcional de los genes responsables del mantenimiento telomérico. Para ello, se empleó la técnica de PCR en tiempo real en un modelo murino de inducción tumoral. Nuestros datos indican una disminución significativa de la actividad transcripcional en 2 de los 6 genes integrantes del complejo telomérico en mamíferos (*trf1* y *rap1*). Esta alteración en la expresión de los mismos, podría considerarse como un posible marcador de inestabilidad genómica en melanoma murino.

De este modo, mediante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se lograron aportes significativos en relación a la inestabilidad telomérica existente a largo plazo a nivel telomérico, en células de mamífero (rata) expuestas *in vitro* a antibióticos antitumorales y la inestabilidad telomérica presente en un modelo *in vivo* de inducción tumoral (melanoma murino).

## ABSTRACT

Telomeres are nucleus protein complexes localized at the very end of the eukaryotic chromosomes. They are involved in the preservation of the chromosome integrity, protecting them against nuclease degradation, recombination and fusion with other chromosomes. Therefore, the maintenance of the telomeric function is fundamental to genomic stability and cell viability. Since a significant amount of chemical mutagens are used as antitumoral agents, the study of the damage induced by these compounds at the genetic level, is of great interest. The general aim of this study was to produce both, novel knowledge to obtain a better understanding of chemical mutagens on the telomeres of eukaryotic chromosomes and study the telomeric instability in a murine model of tumoral induction. Therefore, we intend to establish whether chemical mutagens induce delayed or persistent telomeric instability and if tumor growth is related or associated with specific alterations in the pattern of expression of the genes linked to the telomeric maintenance.

Firstly, the study of telomeric instability (TI) was addressed. TI involves the analysis of chromosome damage at a telomeric level, the eventual changes in telomeric length and the activity of the enzyme telomerase in the progeny of the rat cells ADIPO-P2, initially exposed to the mutagens bleomycin (BLM), streptonigrin (SN) and streptozotocin (STZ). Even when the immediate short-term effects of some chemical mutagens on telomeres are partially known, the effects which may take place in the long term on the telomeres of the surviving cells remains to be determined, and also if the chemical mutagens induce delayed telomeric instability, as it is the case with ionizing radiation.

This study was achieved applying the PNA-FISH assay with a telomeric probe. Consequently, the activity of the enzyme telomerase was studied applying a specific commercial *kit* and the telomeric length was determined using flow cytometry. Results show that the chemical mutagens BLM, SN and STZ could induce telomeric instability at least 15 days after treatment. Accordingly, it was demonstrated that incomplete chromosomes (IC), despite lacking one end, could be transmitted to the progeny of those cells originally exposed to these mutagens. Moreover, those cells exposed to antitumoral chemical agents are unstable at a chromosomal level since the first mitotic division after treatment.

On the other hand, the activity of the enzyme telomerase observed in ADIPO-P2 cells exposed to these compounds depends on the presence of short telomeres and

it does not directly correlate with the telomeric instability which was cytogenetically detected in these cells. The results of the current research allow us to obtain a better knowledge of the effects of antitumoral chemical mutagens on the genome in the long term, thus, contributing to a better understanding of their mode of action on cells, which is of fundamental importance to assess the efficiency and therapeutic use of such compounds.

Secondly, in order to determine whether *in vivo* tumor growth is related to alterations in the profile of expression of the telomeric genes (shelterin complex), the transcriptional activity of the genes responsible of telomeric maintenance was evaluated. To this end, real time PCR was applied in an experimental murine model of tumoral induction. Consequently, it was demonstrated that the transcriptional activity in 2 out of 6 gene members of the mammalian telomeric complex significantly decrease (trf1 and rap1). Such alteration could be considered a possible marker of genomic instability in a murine melanoma.

Therefore, through the development of the current Doctoral Thesis, significant contributions were made in relation to the telomeric instability observed in the long term in rat cells *in vitro* cultures exposed to antitumoral antibiotics as well as in a murine *in vivo* model of tumoral induction.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	13
1. INTRODUCCIÓN .....	15
1.1 Telómeros: Estructura, composición y función .....	15
1.1.1 Complejo Shelterina: Proteínas asociadas al ADN telomérico de mamíferos .	17
1.2 Inestabilidad y disfunción telomérica .....	19
1.3 Mutágenos químicos e inestabilidad telomérica.....	22
1.3.1 Mutágenos químicos antitumorales utilizados en la presente Tesis Doctoral para inducir inestabilidad telomérica. ....	23
1.3.1.1 Compuestos Radiomiméticos: Bleomicina (BLM) y Estreptonigrina (EN).....	23
1.3.1.1.1 Mecanismo de acción de la BLM .....	25
1.3.1.1.2 Mecanismo de acción de la EN .....	26
1.3.1.2 Estreptozotocina (EZ) .....	27
1.3.1.2.1 Mecanismo de acción de la EZ.....	27
1.4 Estudios moleculares del comportamiento telomérico en células tumorales.....	28
1.4.1 Expresión de genes involucrados en el mantenimiento telomérico en un modelo de melanoma murino .....	28
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo General .....	31
3.1.2 Objetivos específicos.....	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
4.1 Estudios <i>In Vitro</i> .....	32
4.1.1 Obtención de células, tratamientos con mutágenos químicos y sacrificio celular .....	32
4.1.1.1 Cultivos celulares .....	32
4.1.1.2 Tratamiento con mutágenos químicos y sacrificio celular .....	32
4.1.1.3 Obtención de metafases y extendidos cromosómicos de células ADIPO-P234	

4.1.1.4 Determinación del índice mitótico .....	34
4.1.1.5 Análisis del cariotipo .....	35
4.1.1.6 Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente con sonda pantelomérica de tipo PNA (PNA-FISH).....	36
4.1.1.7 Identificación y análisis de aberraciones cromosómicas.....	37
4.1.1.8 Análisis estadístico de los datos citogenéticos obtenidos .....	41
4.1.2 Determinación de la longitud telomérica mediante Tel-Flow-FISH por citometría de flujo .....	41
4.1.2.1 Células control utilizadas en las mediciones de longitud telomérica por Tel-Flow-FISH .....	43
4.1.2.2 Determinación de la longitud telomérica .....	43
4.1.2.3 Análisis estadístico de los datos obtenidos de longitud telomérica .....	44
4.1.3 Evaluación de la actividad de la enzima telomerasa.....	44
4.1.3.1 Análisis estadístico de los datos de actividad telomerasica .....	46
4.2 Estudios <i>In Vivo</i> .....	47
4.2.1 Evaluación de la expresión de genes vinculados al complejo telomérico en un modelo murino de inducción tumoral mediante PCR cuantitativa (qPCR) .....	47
4.2.1.1 Modelo experimental de inducción tumoral murino <i>in vivo</i> .....	47
4.2.1.2 Extracción y procesamiento del ARN mensajero (ARNm) obtenido a partir de tejido tumoral.....	47
4.2.1.3 Determinación de la actividad transcripcional de los genes <i>trf1</i> , <i>trf2</i> , <i>pot1a</i> , <i>tin2</i> y <i>rap1</i> y análisis estadístico de los datos .....	48
5. RESULTADOS .....	51
5.1 Análisis del cariotipo de células ADIPO-P2 y determinación de las características cromosómicas .....	51
5.1.1 Características generales de las células ADIPO-P2 .....	51
5.1.2 Longitudes de los cromosomas de las células ADIPO-P2 .....	51
5.1.3 Evaluación de la frecuencia del número cromosómico en células ADIPO-P2 control y tratadas con mutágenos químicos .....	55
5.2 Análisis del índice mitótico y viabilidad celular.....	57
5.3 Patrón de distribución de las secuencias teloméricas en células ADIPO-P2 .....	59

5.4 Evaluación de la inestabilidad telomérica en la progenie de las células ADIPO-P2 que sobrevivieron al tratamiento con mutágenos químicos de diferente modo de acción.....	61
5.4.1 Evaluación de la inestabilidad telomérica en la progenie de las células ADIPO-P2 que sobrevivieron al tratamiento con BLM .....	61
5.4.1.1 Análisis de daño cromosómico inducido por BLM en células ADIPO-P2 .....	61
5.4.1.2 Efecto a corto y largo plazo de la BLM sobre las secuencias teloméricas ...	61
5.4.2 Evaluación de la inestabilidad telomérica en la progenie de las células ADIPO-P2 que sobrevivieron al tratamiento con EN.....	70
5.4.2.1 Análisis del daño cromosómico inducido por EN en células ADIPO-P2 .....	70
5.4.2.2 Efecto a corto y largo plazo de la EN sobre las secuencias teloméricas .....	70
5.4.3 Evaluación de la inestabilidad telomérica en la progenie de las células ADIPO-P2 que sobrevivieron al tratamiento con EZ .....	77
5.4.3.1 Análisis de daño cromosómico inducido por EZ en células ADIPO-P2 .....	77
5.4.3.2 Efecto a corto y largo plazo de la EZ sobre las secuencias teloméricas .....	77
5.5 Evaluación de las modificaciones en la longitud telomérica mediante Tel-Flow-FISH en la progenie de células que sobrevivieron al tratamiento <i>in vitro</i> con mutágenos químicos de diferente modo de acción.....	82
5.5.1 Verificación de las longitudes teloméricas de células Jurkat y células de bazo de ratón utilizadas en la puesta a punto de la técnica de Tel-Flow-FISH.....	82
5.5.2 Determinación del efecto a largo plazo de la BLM sobre la longitud telomérica en células ADIPO-P2 .....	86
5.5.3 Determinación del efecto a largo plazo de la EN sobre la longitud telomérica en células ADIPO-P2 .....	87
5.5.4 Determinación del efecto a largo plazo de la EZ sobre la longitud telomérica en células ADIPO-P2 .....	88
5.6 Detección de la actividad de la enzima telomerasa a corto y largo plazo en células de mamífero ADIPO-P2 expuestas a BLM, EN y EZ y sacrificadas a diferentes tiempos postratamiento.....	89
5.6.1 Efecto retardado de la BLM (2,5 µg/ml) sobre la actividad telomérica en células ADIPO-P2 .....	89
5.6.2 Inhibición de la actividad de la enzima telomerasa luego del tratamiento de las células ADIPO-P2 con EN (100 ng/ml).....	90

5.6.3 Efecto de la EZ (2 mM) sobre la actividad de la enzima telomerasa en células ADIPO-P2 .....	91
5.7 Estudios de inestabilidad telomérica a nivel molecular en un modelo <i>in vivo</i> de melanoma murino .....	94
5.7.1 Evaluación de la expresión de genes vinculados al complejo telomérico mediante PCR (qPCR) en tiempo real.....	94
5.7.1.1 Variación en el patrón de expresión de los genes trf 1 y trf2 en tejido de melanoma murino .....	94
5.7.1.2 Patrón de expresión de los genes pot1a, tpp1 y tin2 en tejido de melanoma murino.....	99
5.7.1.3 Patrón de expresión del gen rap1 en tejido de melanoma murino. ....	105
6. DISCUSIÓN.....	108
6. 1 Consideraciones generales.....	108
6.1.1 Análisis de la inestabilidad telomérica inducida por BLM.....	109
6.1.2 Análisis de la inestabilidad telomérica inducida por EN .....	114
6.1.3 Análisis de la inestabilidad telomérica inducida por EZ.....	118
6.1.4 Análisis de la expresión de genes teloméricos en un modelo murino .....	121
7. CONCLUSIONES .....	123
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
ANEXO I: Resultados .....	137
A1) Tabla 1 complementaria de la sección 5.1.2 de Resultados.....	137
A2) Figuras complementarias de las secciones 5.3.1.2, 5.3.1.3 y 5.3.1.4 de Resultados. ....	139
ANEXO II: Materiales y Métodos .....	145
A1) Protocolo de <i>Harvesting</i> o Sacrificio de Cultivos Celulares que crecen en monocapa. ....	145
A2) Protocolo de Hibridación <i>in situ</i> con sonda pantelomérica de PNA (PNA-FISH) .....	146
A3) Protocolo de Tel-Flow-FISH:.....	147
A4) Obtención de esplenocitos de <i>Mus musculus</i> .....	148

A5) Detección de la actividad de la enzima telomerasa mediante el <i>Kit</i> TRAPeze-RT™ ( <i>Telomeric repeat amplification protocol</i> ) de Chemicon (EE.UU). .....	149
A6) Determinación de la concentración de proteínas .....	149
A7) Protocolo de extracción de ARN a partir de tejidos. ....	150
A8) Protocolo de síntesis de ADN copia (ADNc) a partir de ARN, utilizando la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (RT) (Thermo Fisher Scientific, West Palm Beach, FL, EE.UU.).....	150
A9) Detección de los productos de amplificación utilizando 5x HOT FIREPol®, Evagreen®, qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Estonia). ....	151

## ABREVIATURAS

AC: Acrocéntrico

BFB: *Breakage- Fusion- Bridge*

BLM: Bleomicina

BSA: Seroalbúmina Bovina

CHE: Chinese Hamster Embryo Cells

CHO: Chinese Hamster Ovary Cells

CI: Cromosoma Incompleto

CPC: Células de Piel de Conejo Doméstico

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DIC: Cromosoma Dicéntrico.

D-MEM: Medio de cultivo *Mínimo Esencial Eagle* de *Dulbecco* modificado

ECl: Elementos cromosómicos incompletos

EDTA: Ácido Etilendiaminotetracético.

EN: Estreptonigrina

EZ: Estreptozotocina

FA: Fragmentos Acéntricos

FC: Fragmentos Compuestos

FI: Fragmentos Intersticiales

FISH: *Fluorescence in situ Hybridization*

FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato

FT: Fragmentos terminales

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa

GlcNAc: N- acetil glucosamina

Glu: Glucosa

Ib: Índice Braquial

IC: Índice Centromérico

ICR: Inestabilidad Cromosómica Retardada

IM: Índice Mitótico

IP: Ioduro de Propidio

LR: Longitud Relativa

LRPC: Longitud Relativa Promedio de los cromosomas

LT: Longitud Total del cromosoma

LTG: Longitud Total del genoma

M: Metacéntrico  
MNU: *N-metil-N-nitrosourea*  
NF: Número Fundamental  
PCR: *Polimerase Chain Reaction*  
PNA: *Peptide Nucleic Acide*  
RDC: Ruptura de doble cadena.  
RIC: Ruptura de Isocromátida  
RMC: Ruptura de monocromátida  
SBF: Suero Bovino Fetal  
SM: Submetacéntrico  
ST: Subtelocéntrico  
STEC: Señales Teloméricas Extra-Cromosómicas  
STIN: Señales teloméricas Intra-Cromosómicas  
TBE: Tris-Ácido Bórico-EDTA  
TBP: *Telomere Binding Protein*  
TPG: Total de Producto Generado

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Telómeros: Estructura, composición y función

Los telómeros son complejos nucleoproteicos localizados en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Están involucrados en la preservación de la integridad de los mismos, protegiéndolos de la degradación por nucleasas, de la recombinación, y de la fusión con otros cromosomas [1–7]. Por lo tanto, el mantenimiento de la función telomérica es fundamental para la estabilidad genómica y la viabilidad celular. La pérdida de funcionalidad de los telómeros produce la activación de la respuesta que habitualmente desarrolla una célula ante la inducción de daño en el ADN [6], [8], [9]. Es decir, que la respuesta celular al daño inducido en el ADN y el mantenimiento de los telómeros están estrechamente relacionados.

En los vertebrados, las secuencias teloméricas constituyen el extremo de la cadena de ADN del cromosoma lineal. Generalmente, esta secuencia telomérica es más rica en guaninas en la hebra que forma el extremo 3' (llamado 3' *overhang* o sobreextensión) y que sobresale unos 12-16 nucleótidos sobre la hebra que aporta el extremo 5'. El extremo 3' *overhang* es reconocido por proteínas específicas de unión al telómero (TBP, del inglés, *Telomere Binding Proteins*), que actúan a modo de caperuza protectora de dicho ADN terminal [10]. Además, existen secuencias ricas en GC, adyacentes al ADN telomérico que se encuentran en sentido 5' hacia el centrómero, llamadas secuencias subteloméricas. Éstas, poseen un número reducido de repeticiones hexaméricas y no participan en la homeostasis del telómero. Es importante señalar que aunque las secuencias teloméricas se encuentran conservadas en muchos organismos, el tamaño de la sobreextensión del extremo 3' terminal u *overhang* es especie específico, así como también lo son muchas de las proteínas encargadas de la elongación del telómero [11]. Diferentes estudios realizados en diversas especies de eucariotas demostraron que el ADN telomérico está formado por una secuencia variable de entre 5 y 8 pares de bases, que se encuentra repetida en tándem un determinado número de veces en el extremo de cada cromosoma. En vertebrados, los telómeros están constituidos por repetidos en tándem (TTAGGG)<sub>n</sub> y su longitud es variable. Así, por ejemplo en ratones (*Mus musculus*) varía entre 50 y 200kb dependiendo del tipo celular [12]. Asimismo, en humanos, estas repeticiones terminales tienen una longitud variable de entre 5 y 25 kb. En recién nacidos el promedio es de 20kb [13]. Dichas secuencias, en humanos se encuentran repetidas

entre 150 y 2000 veces, encontrándose el mayor número de repeticiones sobre el extremo 3' terminal, el cual finaliza en repetidos hexaméricos de cadena simple, haciendo a esta porción más larga que la del extremo 5' terminal [14]. La longitud de los telómeros también varía en cada brazo cromosómico y esta heterogeneidad inherente se conserva durante toda la vida del individuo [15], [16]. Para ser funcional, el telómero requiere un mínimo de longitud de ADN de 5 a 15kb y la presencia de una caperuza protectora, conocida como complejo shelterina, que está constituida por proteínas, muchas de las cuales ya han sido identificadas y caracterizadas [17]. Esas proteínas se expresan constitutivamente y son necesarias para la protección, estabilidad, replicación y/o elongación de los telómeros [17–19].

La longitud de los telómeros en mamíferos es parcialmente controlada por un mecanismo de retroalimentación, en el cual la elongación del telómero por la acción de la enzima denominada telomerasa es limitada por la acumulación del complejo TRF1 (*Telomere Repeat Factors*) en el extremo del cromosoma [20–22]. El complejo telomerasa está formado por la subunidad catalítica hTERT asociada con el templado de ARN llamado hTR o TERC, que sirve como molde para la síntesis de ADN y Diskerina (Dkc1), que se encarga del ensamblaje de hTERT y hTR o TERC (Figura 1). La telomerasa tiene actividad transcriptasa reversa y la capacidad de compensar el acortamiento telomérico. En ausencia de telomerasa, los telómeros se acortan gradualmente luego de cada ciclo celular [23]. La actividad enzimática de la telomerasa es capaz de compensar la pérdida de repeticiones teloméricas asociadas a la división celular, mediante la adición *de novo* de repetidos teloméricos TTAGGG a los extremos de los cromosomas utilizando a hTR como molde [24].

La longitud telomérica constituye una de los factores más importantes en el mantenimiento de la integridad cromosómica y la viabilidad celular. En la mayoría de las células somáticas la longitud del telómero se va acortando en forma progresiva, luego de cada división celular, debido a la incapacidad del ADN de replicar la cadena rezagada conocida como el “problema de replicación del extremo”, que ocurre a nivel telomérico [25], [26]. Debido a esto, luego de varias divisiones celulares, en células normales, los telómeros se desgastan, volviéndose muy cortos y disfuncionales. El acortamiento telomérico puede ser acelerado por la acción de nucleasas o ciertos agentes que dañan el ADN [27]. Sin embargo, la actividad de la telomerasa en estos tejidos no es suficiente para prevenir el acortamiento telomérico que ocurre con la edad. En cambio, las células cancerígenas son capaces de mantener sus telómeros y proliferar indefinidamente [28]. Durante la hiperproliferación, los telómeros están

sujetos a un proceso de erosión, lo que eventualmente resulta en disfunción telomérica. Estas células con telómeros disfuncionales no pueden continuar con su ciclo celular. Las células que saltean el *checkpoint* o punto de control del ciclo celular, entran en mitosis con cromosomas fusionados a nivel telomérico, dando lugar a inestabilidad genómica. Para contrarrestar esta inestabilidad, se produce la reactivación de la actividad de la enzima telomerasa sobre los telómeros cortos y esto da lugar a la proliferación indiscriminada de células cancerosas [29].

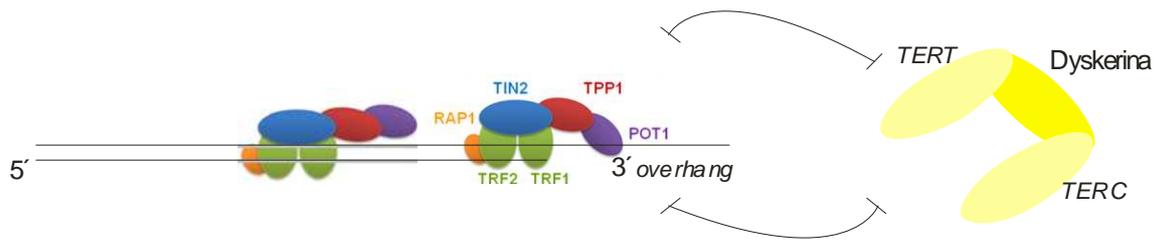
### 1.1.1 Complejo Shelterina: Proteínas asociadas al ADN telomérico de mamíferos

Una de las funciones teloméricas más importantes es la de servir como sitio de unión a proteínas específicas que actúan a modo de caperuza protectora del ADN telomérico.

La estructura y función de los telómeros depende de dos factores principales: la enzima telomerasa (constituida por dos subunidades catalíticas, hTERT y la proteína Dyskerina) que permite la elongación telomérica y el complejo shelterina (formado por seis proteínas POT1, TRF1, TRF2, RAP1, TPP1 y TIN2), que regula la longitud telomérica y protege los extremos cromosómicos de la degradación y fusión telomérica (Figura 1). Además, existe una serie de factores multifuncionales (RPA1, h EST1A, KU70/KU80, RAD50) que también están involucrados en el mantenimiento telomérico [17]. Por otro lado, los repetidos de hexámeros que se encuentran en la cadena simple del ADN telomérico, le permiten al telómero adoptar estructuras secundarias muy particulares, debido a la interacción de grupos de guaninas a través de enlaces de hidrógeno. Estas estructuras se denominan cuartetos de guaninas o G cuádruplex (G4), debido a que están conformados por grupos de 4 guaninas, los cuales pueden interaccionar en forma intra o intercatenaria [6], [30]–[32]. La conformación de G4 dificulta la entrada de la enzima telomerasa [33] para la elongación telomérica, ya que se forma preferentemente próxima al extremo 3' terminal del telómero. Asimismo, las proteínas del complejo shelterina facilitan la formación de un *loop* o bucle dentro del ADN telomérico de cadena doble a partir del extremo 3' *overhang*, llamado Telomeric Loop o T-Loop. El T-loop enmascara al ADN terminal de la maquinaria de reparación de la ruptura de doble cadena (RDC) y limita también el acceso de la telomerasa. Es importante destacar que el extremo "3' *overhang* o sobreextensión" puede encontrarse formando al mismo tiempo una estructura en forma de horquilla, así como también la conformación G4 [33].

La disfunción telomérica puede producirse como consecuencia de alteraciones que involucren a las proteínas que forman parte del complejo telomérico, desencadenando inestabilidad genómica y el desarrollo de células tumorales [5], [6], [34]. Recientemente, el estudio de proteínas teloméricas específicas de unión al ADN, ha llevado a pensar que TRF1 y TRF2 son las responsables de la modificación de la actividad de la telomerasa, por lo que juegan un papel importante en el mantenimiento de la función telomérica [35], [36]. TRF1 y TRF2 son proteínas estructurales que se encuentran asociadas a la región de doble cadena del ADN telomérico. La pérdida de función de TRF2 origina anomalías cromosómicas, la detención del ciclo celular y la activación de la respuesta del ATM-p53, que juega un papel importante en el control de la respuesta al daño en el ADN. Se sugiere que TRF1 actuaría *in cis* sobre la regulación de la longitud del telómero, bloqueando así el acceso de la telomerasa al extremo 3'-terminal de la cadena sencilla del cromosoma [37], mientras que TRF2 juega un papel clave en la homeostasis del telómero, ya que modificaciones en su patrón de expresión producen cambios en la regulación y síntesis del telómero. Asimismo, POT1 constituye una proteína de unión a la cadena simple de ADN telomérico, cuya función principal es la proteger a los telómeros y garantizar la estabilidad cromosómica. La familia de POT1 ha sido identificada en diversas especies: en *S. pombe* (SpPot1), en *Saccharomyces cerevisiae*, en humanos (hPot1) y en ratones [38–40]. Estos últimos presentan dos tipos de proteínas POT1 (POT1a y POT1b), que resultan esenciales para evitar fusiones teloméricas, fenómenos de endoreduplicación y de senescencia [41]. TIN2 por su parte, participa en la regulación, elongación y mantenimiento telomérico. Permite la formación de una estructura telomérica lineal y más abierta, facilitando el acceso de la telomerasa al extremo 3' *overhang*, interacciona en forma directa con TRF1 y TRF2 e indirectamente con POT1 vía TPP1. El heterodímero TPP1-POT1 está asociado a la simple cadena del extremo telomérico y es el responsable de activar la síntesis telomérica a cargo de la telomerasa [42]; (Figura 1).

Por otro lado, alteraciones en el patrón de expresión del ARN mensajero de otros genes del complejo shelterina como rap1 (que interacciona con TRF2 evitando las fusiones teloméricas), fueron descritas como posibles marcadores clínicos de progresión tumoral en tejidos pulmonares y gástricos en humanos [34], [36]. Asimismo, los cambios en el patrón de expresión de genes del complejo shelterina, han sido correlacionados con el estadio y el grado de desarrollo del tumor en cáncer gástrico y de pulmón en humanos [34], [39].



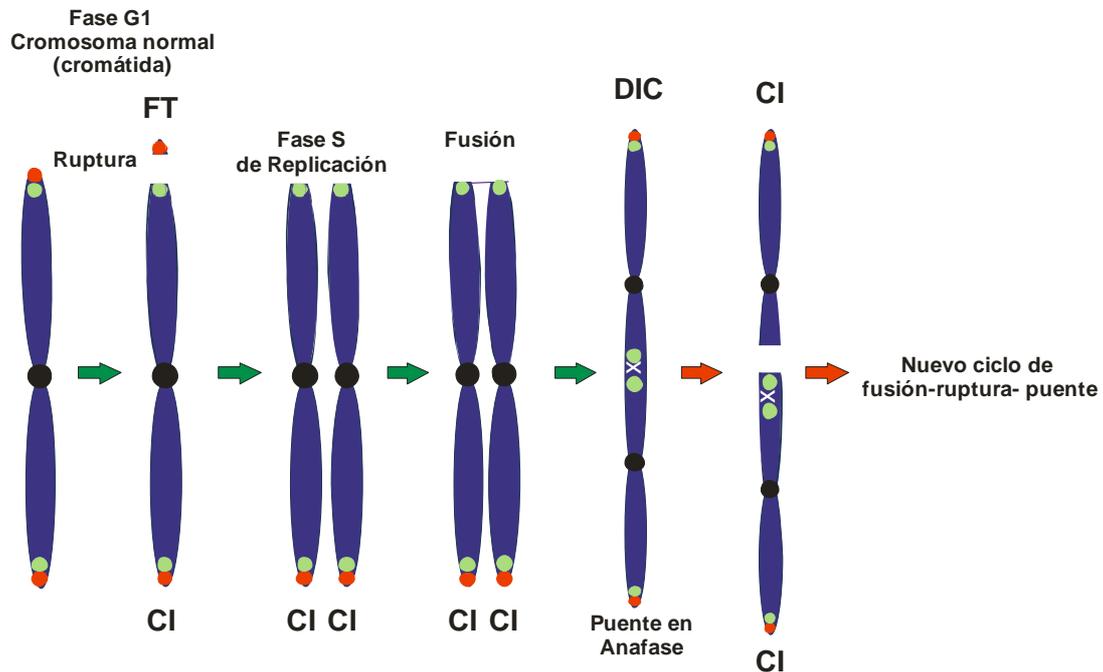
**Figura 1: Representación esquemática de la estructura del telómero en mamíferos.** El complejo shelterina está conformado por seis proteínas: TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1 y RAP1. La especificidad del complejo shelterina por el ADN telomérico se debe al reconocimiento de las repeticiones TTAGGG por parte de TRF 1 y TRF 2, que se unen a la región bicatenaria del ADN telomérico, mientras que POT1 interacciona con la región del 3' *overhang* o sobreextensión. Los complejos POT1-TPP1 se unen preferentemente a las regiones de cadena sencilla. TIN2 y RAP1 no presentan dominios de unión a ADN, por lo que ejercen su influencia sobre el telómero mediante la interacción con otras shelterinas: TIN2 une a TRF1 y TRF2, y, mediante un dominio distinto a los anteriores, es capaz de unirse a los complejos TPP1-POT1; RAP1 se une exclusivamente a TRF2. La enzima telomerasa está conformada por 3 componentes principales: un polipéptido catalítico donde radica la actividad de polimerasa en reverso (TERT), un molde de ARN para la adición de las repeticiones de ADN telomérico (TERC) y la proteína dyskerina (Dsk) que estabiliza el componente de ARN.

## 1.2 Inestabilidad y disfunción telomérica

La pérdida de secuencias teloméricas puede desencadenar inestabilidad cromosómica a partir de la formación de ciclos de ruptura-fusión-puente (RFP o BFB, del inglés; *Breakage Fusion Bridge*); generando diferentes tipos de rearrreglos cromosómicos, incluyendo deleciones, duplicaciones, translocaciones, amplificaciones de ADN telomérico y cromosomas dicéntricos (Figura 2). Todos ellos han sido asociados con el desarrollo de cáncer en humanos [43], [44]. De manera que, cuando un cromosoma pierde un telómero como consecuencia de una ruptura, el extremo cromosómico queda expuesto y luego de la replicación, es probable que se fusione con su cromátida hermana o bien con otra cromátida de otro cromosoma que haya perdido también su extremo, dando lugar a un cromosoma dicéntrico. Durante la anafase, las cromátidas fusionadas forman un “puente” que se quiebra como consecuencia de la migración de ambos centrómeros del cromosoma dicéntrico hacia los polos opuestos de la célula. Debido a que las rupturas cromosómicas ocurren casi

siempre en un sitio diferente al lugar de la fusión, una de las células hijas recibe un cromosoma con una duplicación en un extremo, mientras que la otra célula recibe a un cromosoma que carece de un extremo. Al perder dicho cromosoma uno de sus extremos, el siguiente ciclo de replicación va a presentar fusiones de cromátidas hermanas y así los BFB pueden continuar por múltiples generaciones, llevando a rearrreglos cromosómicos extensos. El ciclo finaliza cuando eventualmente algún cromosoma inestable adquiere un nuevo telómero y se vuelve estable [43]. La aparición de un nuevo telómero puede darse por varios mecanismos, incluyendo translocaciones no-recíprocas, translocaciones subteloméricas o bien duplicaciones u adiciones directas de telómeros [44], [45] (Figura 2).

Los telómeros disfuncionales son aquellos que han perdido su función protectora y, por lo tanto, constituyen una fuente de inestabilidad genómica y cáncer. Asimismo, los telómeros disfuncionales son un sustrato potencial para la recombinación homóloga. Como se explicó anteriormente, cualquier alteración en alguna de las proteínas integrantes del complejo shelterina, la pérdida de secuencias teloméricas, o cambios en la actividad de la enzima telomerasa pueden desencadenar la disfunción telomérica. Todos estos factores están involucrados en la formación de aberraciones cromosómicas a nivel telomérico [7].



**Figura 2: Representación esquemática de los ciclos de ruptura fusión puente (RFP o BFB, en inglés).** Los círculos negros representan los centrómeros de los cromosomas. Los puntos rojos señalan a los extremos teloméricos y los verdes a las regiones subtelo méricas de cada cromosoma. (CI) Cromosoma incompleto (constituido por una cromátida), acompañado por su correspondiente fragmento terminal (FT). Las flechas rojas indican los sitios de ruptura cromosómica y las X los sitios donde ocurrió la fusión. Los ciclos BFB se inician cuando una cromátida pierde un extremo telomérico, como consecuencia de una ruptura cromosómica dando lugar a un FT. Cuando un cromosoma pierde un telómero como consecuencia de una ruptura, el extremo cromosómico queda expuesto y luego de la replicación, es probable que se fusione con su cromátida hermana o bien con otra cromátida de otro cromosoma que haya perdido también el extremo telomérico, dando lugar a un cromosoma dicéntrico (DIC). Debido a la presencia de los dos centrómeros, las cromátidas fusionadas forman un puente durante la anafase, el cual se rompe cuando cada centrómero migra hacia los polos opuestos de la célula. Dado que las rupturas cromosómicas ocurren casi siempre en un sitio diferente al lugar de la fusión, una de las células hijas recibe un cromosoma con una duplicación en un extremo, mientras que la otra célula recibe un cromosoma que carece de un extremo. Luego de la replicación del ADN en el próximo ciclo celular, las cromátidas hermanas se fusionan nuevamente y el ciclo continúa, resultando en la amplificación de secuencias de ADN cerca del extremo telomérico y en sitios intersticiales así como también la acumulación en forma progresiva de deleciones terminales o FT.

### 1.3 Mutágenos químicos e inestabilidad telomérica

Existe una gran variedad de mutágenos químicos que son utilizados como agentes antitumorales. Es por ello, que el estudio del daño genético inducido por estos compuestos resulta de gran interés clínico. El conocimiento del espectro total de los efectos de los mutágenos químicos sobre el genoma es fundamental para lograr un conocimiento acabado de su modo de acción sobre las células y por ende, un uso óptimo de los mismos como agentes antitumorales. Uno de los aspectos relacionados con los efectos genotóxicos de los mutágenos químicos que no ha sido suficientemente estudiado, es su efecto sobre los telómeros. Previamente nuestro grupo de trabajo del Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE realizó varios trabajos sobre el efecto a corto plazo de diversos mutágenos químicos sobre los telómeros de células de mamíferos. Así, por ejemplo, se observó que el antibiótico antitumoral bleomicina (BLM) induce la formación de elementos cromosómicos incompletos (ECI), es decir elementos con uno o ambos extremos abiertos (sin telómeros) y de fragmentos intersticiales (FI) de tamaño variable, luego de aplicar la técnica de FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) con sonda telomérica. Los FI constituyen elementos cromosómicos que carecen de señales teloméricas, e incluyen a fragmentos acéntricos típicos, donde las cromátidas se ubican en paralelo y no presentan una constricción centromérica. Este fenómeno fue registrado en el 20%-30% de metafases pertenecientes a la primera división mitótica en células CHE (*Chinese Hamster Embryo Cells*); [46]. Asimismo, la inducción de ECI fue registrada a las 18 horas luego del tratamiento con estreptonigrina (EN). En este caso, el 33%-68% de las metafases analizadas presentó uno o más pares de ECI, dependiendo de la concentración de EN utilizada [46]. Por otro lado, en cultivos de células CHE tratadas con estreptozotocina (EZ), el 40% de las metafases estudiadas en la primera división mitótica presentó también uno o más pares de ECI. Además, todos los fragmentos acéntricos inducidos por EZ resultaron fragmentos terminales (FT); [47]. Esto demuestra que la inducción de cromosomas incompletos y sus correspondientes fragmentos terminales constituyen un evento a corto plazo muy frecuente, luego de la exposición a mutágenos químicos como la BLM, la EN y la EZ.

Poco se conoce acerca del daño genético y el efecto residual a largo plazo inducido por mutágenos químicos sobre los telómeros de las células eucariotas [48]. A pesar de que se ha reportado que, al igual que la radiación ionizante, algunos mutágenos químicos ejercen un efecto a largo plazo sobre los cromosomas

(induciendo inestabilidad cromosómica persistente o retardada) [49]–[54], una cuestión importante que queda por resolver es qué ocurre a largo plazo con aquellos telómeros de las células que sobreviven a tratamiento con un mutágeno dado. En particular, si los mutágenos químicos pueden inducir inestabilidad cromosómica retardada (ICR) a nivel telomérico. Los únicos datos disponibles hasta la fecha sobre la inducción de la inestabilidad telomérica por mutágenos químicos provienen de estudios realizados para evaluar sus efectos corto plazo [4], [7], [53].

La ICR ha sido descrita como la formación de aberraciones cromosómicas en alta frecuencia varias generaciones después de que las células hayan sido expuestas a un determinado mutágeno físico o químico. Luego de la exposición inicial, las células con el fenotipo de ICR son capaces de proliferar, manifestándose la inestabilidad genómica en la progenie de las células que sobrevivieron a la exposición al mutágeno. Este fenómeno ha sido observado en células expuestas a radiaciones ionizantes, tanto a nivel cromosómico en general, como a nivel de los telómeros en particular [55]–[58]. La inestabilidad telomérica retardada ha sido registrada 14 días luego de la exposición, en células humanas expuestas *in vitro* a radiación ionizante [57]. Del mismo modo, se observó la persistencia de cromosomas incompletos, con un solo extremo telomérico, en la progenie de linfocitos humanos irradiados con radiación de alta energía, 6 días después de haber sido expuestos [58]. Sin embargo, no existen datos publicados acerca de si los mutágenos químicos antitumorales inducen ICR o persistente a nivel telomérico. Por lo tanto, el presente trabajo de Tesis se realizó utilizando 3 mutágenos químicos de diferente modo de acción: bleomicina (BLM), estreptonigrina (EN) y estreptozotocina (EZ) y se estudió si éstos agentes inducen ICR o persistente sobre los telómeros de células de mamífero.

### **1.3.1 Mutágenos químicos antitumorales utilizados en la presente Tesis Doctoral para inducir inestabilidad telomérica.**

#### **1.3.1.1 Compuestos Radiomiméticos: Bleomicina (BLM) y Estreptonigrina (EN)**

La BLM y la EN son compuestos considerados radiomiméticos, ya que actúan al igual que la radiación ionizante, induciendo daño directo en el ADN por liberación de radicales libres y en forma S-independiente [59]–[61]. El mecanismo de acción principal de la BLM involucra rupturas de doble cadena (RDC) en el ADN. Recientemente, se determinó que uno de los principales sitios de acción de la BLM

son los sitios ricos en GT y dado que las secuencias teloméricas consisten en repetidos TTAGGG, éstas constituyen el blanco principal sobre el que actúa la BLM [62], [63].

La BLM es un antibiótico aislado de *Streptomyces verticillus* que ha sido utilizado para el tratamiento de varios tipos de cánceres, incluyendo tumores de la línea germinal así como también ciertos tipos de linfomas y carcinomas de células escamosas [64], [65]. La eficacia terapéutica de la BLM depende mayormente de su capacidad de inducción de rupturas de doble y simple cadena del ADN, siendo las de doble cadena la mayor fuente de citotoxicidad debida a esta droga [61], [66]. La BLM tiene actividad clastogénica S-independiente, es decir actúa induciendo aberraciones cromosómicas estructurales durante todo el ciclo celular. Induce aberraciones de tipo cromosoma cuando las células son tratadas en las fases G<sub>0</sub> o G<sub>1</sub> o fase S temprana, o aberraciones de tipo cromátida en las fases S tardía o G<sub>2</sub> [67].

Por otro lado, la EN es un metalo-antibiótico que contiene grupos de quinonas y es producido por *Streptomyces flocculus* [68]. Se ha observado que tiene una actividad inhibitoria sobre varios tipos de tumores como linfomas, melanomas, cáncer de mama y cérvix, así como también en estadios tempranos de los virus del Sarcoma Murino y el virus de Leucemia Murina o Rauscher (MLVs) en ratones [69]. Sin embargo, la alta toxicidad y los efectos secundarios de esta droga limitan su uso como agente antitumoral [70], [71]. A pesar de sus efectos secundarios, la potencia antitumoral y estructura única de la EN, han facilitado su uso como uno de los principales compuestos antitumorales debido a sus características estructurales. La EN posee una estructura molecular semejante a la de otros grupos quinonas que están presentes en antibióticos, como las antraciclinas, que desempeñan una función importante en la inhibición del crecimiento tumoral [71]–[73]. Asimismo, la EN fue identificada como un inhibidor irreversible de las proteínas PADs 1-4 (*Protein Arginines deisminases*) y PAD6 en humanos, cuya desregulación en su actividad está asociada a varias enfermedades tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoidea y colitis [73].

Por otro lado, la mayoría de las aberraciones cromosómicas que produce son de tipo cromátida (S-independiente), así como el intercambio de cromátidas hermanas [74].

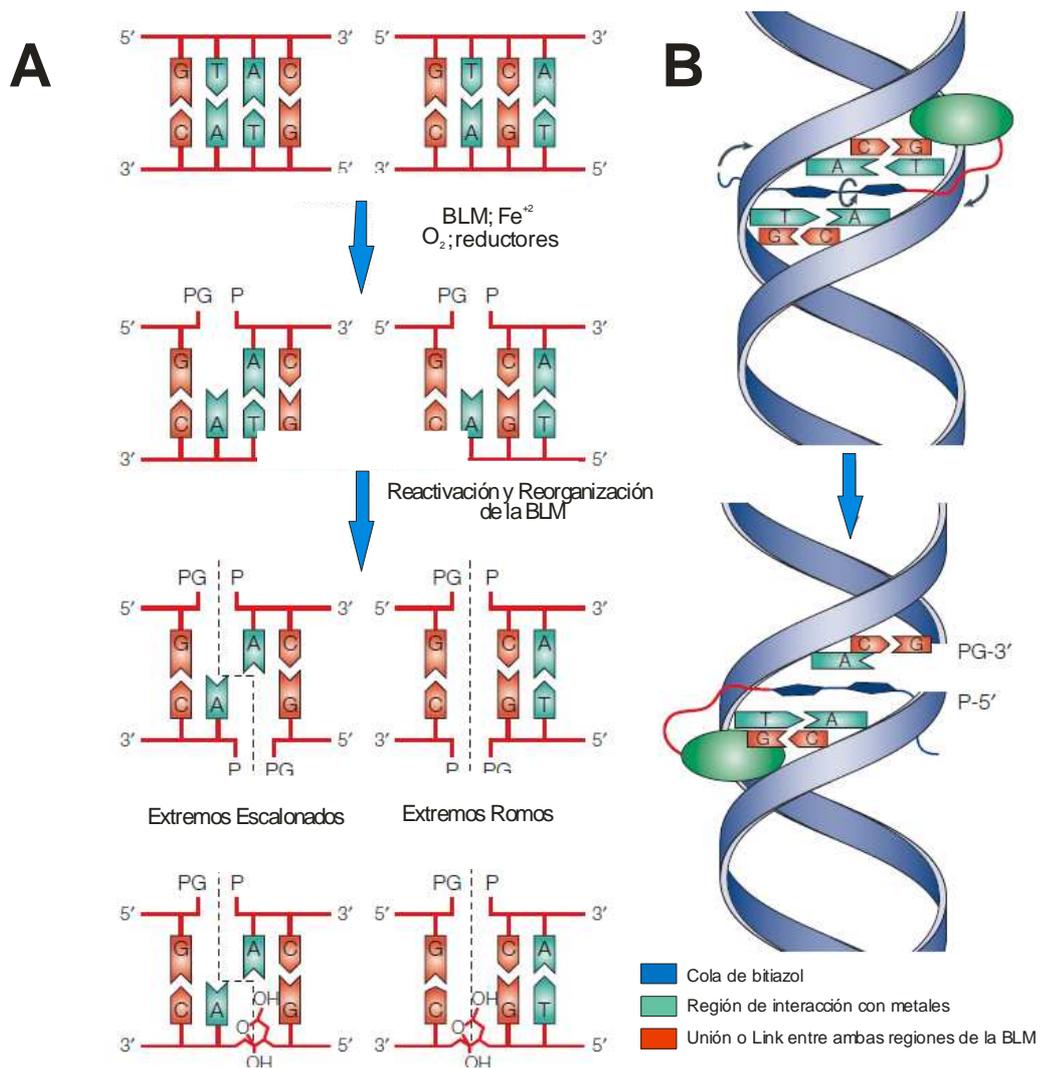
### 1.3.1.1.1 Mecanismo de acción de la BLM

La BLM se intercala al ADN y se une a iones metálicos divalentes, y debe activarse para causar daño en el ADN. Se administra vía intravenosa en su forma libre de iones metálicos. Una vez en el plasma sanguíneo, interacciona rápidamente con  $\text{Cu}^{+2}$  de forma irreversible. Diversas publicaciones señalan que ciertos transportadores presentes en la membrana celular son determinantes en la sensibilidad celular a la BLM, ya que se ha demostrado que la membrana celular limita el ingreso de la droga al interior de la célula [75], [76]. Por ello, la toxicidad de la droga en ciertos tipos celulares puede ser atribuida a la presencia de transportadores de BLM presentes en la superficie celular [75]–[77].

Se cree que  $\text{Cu}^{+2}$ -BLM es la forma en la que la BLM es transportada hacia el interior de las células. Intracelularmente, el complejo  $\text{Cu}^{+2}$ -BLM se reduce a  $\text{Cu}^{+1}$  y de esta forma puede ingresar al núcleo o bien ser reemplazado por el ion  $\text{Fe}^{+2}$  para formar el complejo  $\text{Fe}^{+2}$ -BLM, el cual constituye la forma activa de la BLM [60], [61], [78]. Esta activación ocurre a través de la adición de  $\text{O}_2$  a  $\text{Fe}^{+2}$ -BLM (o de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al  $\text{Fe}^{+3}$ -BLM), seguida de la reducción de un electrón, dando lugar a la especie  $\text{HOO-Fe}^{+3}$ -BLM, que es la última especie de BLM detectable antes de la unión al ADN.

La BLM inicia el clivaje de ADN de cadena simple en las bases pirimidínicas (T o C) 3' hacia una G (5'-G-Py-3' donde es el sitio de escisión). El sitio primario de escisión es siempre de cadena simple, mientras que el sitio secundario depende del residuo 3' del sitio primario. Para las secuencias 5'-G-Py-Pu-3', la BLM genera extremos 5' escalonados, y para las secuencias 5'-G-Py-Py-3', genera extremos romos (Figura 3A).

El modelo de clivaje de la cadena doble de ADN por una sola molécula de BLM, requiere de la reactivación y la reorganización de la misma antes o durante de la escisión de la primera cadena de ADN. Esto le permite a la droga interactuar con la segunda cadena complementaria, sin disociarse del ADN. La reorganización de la BLM depende de la flexibilidad de la cola de bitiazol que se une a partir de una interacción parcial con el ADN. La rotación del enlace de esta cola hace que el grupo peróxido de la droga activada esté disponible para su interacción con la segunda cadena de ADN [60]; (Figura 3B).



**Figura 3: Mecanismo de acción de la BLM sobre el ADN. (Modificada de Chen y cols; 2005). (A)** Clivaje de la cadena de ADN por la BLM. El sitio primario de escisión es siempre de cadena simple, mientras que el sitio secundario depende del residuo 3' del sitio primario. Para las secuencias 5'-G-Py-Pu-3', la BLM genera extremos 5' escalonados, y para las secuencias 5'-G-Py-Py-3', la BLM, genera extremos romos. **(B)** El modelo de clivaje de la cadena doble de ADN por una sola molécula de BLM, requiere de la reactivación y la reorganización de la misma antes o durante la escisión de la primera cadena de ADN.

### 1.3.1.1.2 Mecanismo de acción de la EN

La EN es capaz de unirse a diferentes iones metálicos y estas uniones son necesarias para que la droga pueda desarrollar su actividad de agente antitumoral. La EN induce el efecto antitumoral a través de dos mecanismos en el interior celular: (1)

interfiriendo en la respiración celular y (2) a partir de la disrupción del proceso de replicación del ADN [79]. Se ha observado que la EN no se intercala al ADN y puede interactuar con el mismo tanto de manera reversible como irreversible [79], [80].

La ruptura de ADN mediada por EN requiere de NADH y de los iones de transición  $\text{Cu}^{+2}$  and  $\text{Fe}^{+2}$  que potencian la actividad antitumoral de este antibiótico. El complejo que forma el ión metálico con la EN es reducido a la forma de semiquinona por la acción del NADH para inducir la escisión del ADN. Este proceso de reducción es inhibido por superóxido dismutasa y catalasa [81]. La EN también inhibe la acción de la enzima topoisomerasa II, aumentando el efecto del daño ocasionado por la EN sobre el ADN [73].

### **1.3.1.2 Estreptozotocina (EZ)**

La EZ es un agente diabetogénico, que produce la inhibición de la secreción de insulina y causa un estado insulino-dependiente (*diabetes mellitus*). Es un análogo citotóxico de la glucosa (Glu) ya que produce la necrosis selectiva de las células  $\beta$ -pancreáticas a partir de su absorción, por medio del transportador de glucosa GLUT2 [82]. Actúa como inhibidor de la síntesis de ADN tanto en bacterias como en células de mamíferos [83]. La EZ causa daño en el tejido adiposo y cardíaco, y aumenta el estrés oxidativo [84]. Es un agente mutagénico que produce daño a partir de la liberación de radicales libres y la metilación del ADN [83]. Al igual que otros agentes S-dependientes, la EZ induce intercambio de cromátidas hermanas, e induce aberraciones de tipo cromátida [74].

#### **1.3.1.2.1 Mecanismo de acción de la EZ**

Los compuestos de nitrosoureas como la EZ, son generalmente lipofílicos y esto facilita su llegada al interior de las células. Sin embargo, la EZ es un compuesto hidrofílico debido a la sustitución de una hexosa, lo que limita la absorción de la droga hacia el interior celular. La toxicidad selectiva de las células  $\beta$ -pancreáticas por parte de la EZ, está relacionada con su estructura química, que está conformada por un grupo de Glu [83]. Dado que las células  $\beta$ -pancreáticas son más activas en la absorción de Glu que otras células del organismo, resultan mucho más sensibles a la absorción de EZ que otras células. Del mismo modo, aquellas células productoras de insulina que no expresan al transportador de Glu (GLUT2), son resistentes al efecto

tóxico de la EZ [85]. La importancia de GLUT2 en este proceso también se observa en el daño que causa la EZ en otros órganos que expresan GLUT2, como el hígado y el riñón [86].

Como se mencionó anteriormente, la EZ es un análogo de la Glu y de la N-acetil glucosamina (GlcNAc). La EZ es absorbida por las células pancreáticas a través de GLUT2, causando la muerte de las mismas, debido a la fragmentación del ADN producida por el grupo de nitrosourea, dando lugar a la diabetes dependiente de insulina [82].

Los tres principales mecanismos asociados a la muerte celular por EZ son: (1) la metilación del ADN a través de la formación del ión de carbonio ( $\text{CH}_3$ ), lo que genera la activación de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), como parte del mecanismo de reparación celular y posteriormente, la depleción de  $\text{NAD}^+$ , (2) la producción de óxido nítrico y (3) la liberación de radicales libres [83].

## **1.4 Estudios moleculares del comportamiento telomérico en células tumorales**

### **1.4.1 Expresión de genes involucrados en el mantenimiento telomérico en un modelo de melanoma murino**

El melanoma es una forma agresiva del cáncer de piel que se caracteriza principalmente por el crecimiento indiscriminado de los melanocitos. Se desarrolla generalmente en la superficie del epitelio o piel; y se puede observar a simple vista. El melanoma tiene una tasa de crecimiento rápido [87] y puede crecer de diferentes formas: (I) hacia arriba de la capa basal de la piel, llamado melanoma *in situ*. Este tipo de melanoma no realiza metástasis luego de ser removido. (II) horizontalmente, conocido como melanoma superficial horizontal con potencial de metástasis y (III) de crecimiento vertical, debajo de la capa basal, que puede resultar en una forma nodular agresiva de melanoma.

Por otro lado, estudios recientes en melanoma, han demostrado que la variación genética en TERT, la subunidad catalítica de la enzima telomerasa, está asociada al riesgo de desarrollar melanoma en humanos [88]. Se han informado dos mutaciones específicas que afectan la región del promotor del gen *tert*, produciendo la amplificación del mismo [89], [90]. Estas mutaciones generan un nuevo dominio de unión para los factores de transcripción Ets, que participan en la regulación de la diferenciación celular, el control del ciclo celular, la migración, la proliferación y la

apoptosis celular. Dado que el nuevo dominio de unión de los factores de transcripción Ets se genera cerca del sitio de inicio de la transcripción de *tert*, se produce un incremento de 2 a 4 veces en la transcripción del mismo [89], [90]. Estas mutaciones en la región promotora de TERT también se detectaron en alta frecuencia (33%) en tejidos primarios de melanoma, sugiriendo que la desregulación de TERT juega un papel importante en la génesis del melanoma [89], [90]. Asimismo, los estudios realizados por Nan y cols. en 2011 [91] señalaron que en contraste con lo que sucede en otro tipo de tumores, los telómeros cortos están asociados a una disminución en la probabilidad del riesgo de desarrollar melanoma. Estos estudios sugieren un rol particular de los telómeros en la génesis del melanoma en humanos [91].

En razón de lo expuesto en la sección 1.1.1 sobre el funcionamiento de los telómeros, y los estudios recientes realizados sobre el papel que juegan las secuencias teloméricas en melanoma [88]–[91], en la presente Tesis Doctoral se evaluó el perfil de expresión de los genes responsables del mantenimiento telomérico en un modelo experimental *in vivo* de inducción tumoral. De este modo, se obtuvieron datos acerca de la relación entre niveles de expresión de los genes ligados al mantenimiento telomérico y el desarrollo tumoral *in vivo*, lo que permitió determinar si dichos fenómenos están relacionados entre sí.

## 2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- Al igual que la radiación ionizante, los mutágenos químicos pueden inducir inestabilidad cromosómica retardada a nivel telomérico.
- El desarrollo de células tumorales se asocia a modificaciones en el patrón de expresión de genes del complejo shelterina.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Estudiar la inestabilidad telomérica: 1) a nivel citogenético y molecular, en la progenie de células de mamífero expuestas *in vitro* a mutágenos químicos que poseen propiedades antitumorales y diferente modo de acción y 2) a nivel molecular en un modelo *in vivo* de inducción tumoral. De este modo, se pretende establecer si los mutágenos químicos inducen inestabilidad telomérica retardada o persistente, y si el desarrollo tumoral se relaciona o asocia con alteraciones específicas en el patrón de expresión de los genes ligados al mantenimiento telomérico.

#### **3.1.2 Objetivos específicos**

1) Analizar el daño cromosómico inducido a nivel telomérico y su persistencia en el tiempo en la progenie de células de mamífero que sobrevivieron al tratamiento *in vitro* con mutágenos químicos BLM, EN y EZ.

2) Analizar las eventuales variaciones en la actividad de la enzima telomerasa en la progenie de células de mamífero que sobrevivieron al tratamiento *in vitro* con los mutágenos.

3) Analizar las eventuales modificaciones de la longitud telomérica en la progenie de células de mamífero que sobrevivieron al tratamiento *in vitro* con mutágenos químicos.

4) Analizar el patrón de expresión de los principales genes integrantes del complejo telomérico shelterina en un modelo *in vivo* de melanoma murino de inducción tumoral.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Estudios *In Vitro***

#### **4.1.1 Obtención de células, tratamientos con mutágenos químicos y sacrificio celular**

##### **4.1.1.1 Cultivos celulares**

Para el desarrollo de los estudios *in vitro*, se utilizó la línea celular de fibroblastos ADIPO-P2 disponible en el Banco de Células del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, La Plata), establecida por el Qco. Daniel Castrogiovanni en el año 2009. Se trata de células de tipo fibroblasto desdiferenciadas, obtenidas a partir de tejido adiposo de ratas de la cepa Sprague-Dawley. Dado que esta línea celular no se encontraba caracterizada cromosómicamente, se realizaron los estudios citogenéticos correspondientes (secciones 5.1; 5.11; 5.1.2; y 5.1.3 de resultados de la presente Tesis Doctoral). Dichos estudios indicaron que esta línea celular es diploide y sus células poseen  $2n=42$  cromosomas. Asimismo, estudios previos no publicados realizados en esta línea celular, indicaron que los repetidos teloméricos sólo se encuentran en los extremos cromosómicos propiamente dichos (telómeros) y que sus cromosomas no poseen secuencias teloméricas intersticiales (Paviolo, N.S., no publicado). De este modo, mediante el uso de esta línea celular, las aberraciones que involucran a los telómeros pueden ser fácilmente identificadas, sin interferencia de señales teloméricas intersticiales, y la inestabilidad cromosómica observada a nivel de las secuencias teloméricas puede ser atribuída específicamente a la de los telómeros de la célula en estudio.

##### **4.1.1.2 Tratamiento con mutágenos químicos y sacrificio celular**

Las células ADIPO-P2 fueron cultivadas en medio de cultivo *Mínimo Esencial Eagle* de *Dulbecco* (D-MEM) modificado, con alto contenido en glucosa (Gibco®, Grand Island, NY, USA) suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF), 25 mM de HEPES, *free acid* (J.T Baker, CAS No. 7365-45-9), penicilina (10 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml) a 37°C y a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron cultivadas en monocapa en frascos de cultivo TC25 *Corning* conteniendo  $1,5 \times 10^5$  células por mililitro. Los cultivos fueron expuestos durante la fase logarítmica de

crecimiento a las concentraciones de 2,5 µg/ml de BLM (Blocamicina®, Laboratorios Gador, Argentina, CAS No. 9041-93-4), disuelta en NaCl 0,9% estéril, 100 ng/ml de EN (Sigma, CAS No. 3930-19-6), disuelta en solución salina de Hank's estéril y 2 mM de EZ (Sigma, CAS No. 18883-66-4), disuelta en *buffer* de citrato de sodio 0,02 N a pH 4, durante 30 (BLM y EZ) o 20 minutos (EN). Para cada experimento, se cultivaron dos frascos, uno para las células tratadas con el mutágeno en estudio y el otro con el control correspondiente sin tratamiento, con un volumen final de 10 ml. En el caso particular de la EZ, se cultivó también un segundo control conteniendo el solvente de la misma (citrato de sodio), para determinar si dicha sustancia induce por sí misma daño cito- y/o genotóxico en las células ADIPO-P2. El medio de cultivo fue reemplazado todos los días para garantizar que la detención del crecimiento celular fuera producida por la confluencia celular y no por la ausencia de nutrientes.

El tiempo de exposición y la concentración de los mutágenos utilizados fueron elegidos de acuerdo a estudios previos llevados a cabo en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE con células de mamífero expuestas a los compuestos antemencionados [46], [47], [51], [92]–[95]. Al finalizar el tratamiento con cada mutágeno, los cultivos fueron lavados dos veces con solución salina de Hank's para eliminar al mutágeno del medio de cultivo. Las células fueron mantenidas en medio de cultivo fresco hasta el momento del sacrificio. Los cultivos fueron mantenidos mediante sucesivos pasajes o subcultivos hasta los 15 días postratamiento. Los pasajes (7 en total) se llevaron a cabo cada vez que las células llegaban a un 90-100% de confluencia (aproximadamente  $4 \times 10^5$  células/ml). Por otro lado, para estimar el crecimiento celular, se recolectaron alícuotas de 30 µl de células mediante tripsinización con una solución de tripsina-EDTA (Gibco®, Grand Island, NY, USA) y teñidas con 0.4% de azul de tripán para determinar el número total de células viables (sin teñir) en cada caso. Para continuar con el crecimiento de las células en cultivo luego del tratamiento, se tomaron  $1.5 \times 10^5$  células/ml de cada tratamiento y se resuspendieron en medio de cultivo D-MEM fresco. Las células restantes (aproximadamente 4 ml del cultivo celular) fueron utilizadas para el análisis citogenético, la determinación de la longitud telomérica y el análisis de la actividad de la telomerasa.

#### **4.1.1.3 Obtención de metafases y extendidos cromosómicos de células ADIPO-P2**

Para analizar el daño cromosómico inducido por los compuestos BLM, EN y EZ, se tomaron aproximadamente 4 ml de cada uno de los cultivos celulares de ADIPO-P2 tratados y sin tratar, y se los incubó con 0,1 µg/ml de colchicina (Sigma, CAS No. 64-86-8) durante las últimas 3 horas de cultivo para detener la formación de los microtúbulos del huso mitótico durante la división celular y obtener así cromosomas en metafase.

El sacrificio de los cultivos celulares se realizó mediante un shock hipotónico con agua destilada/medio de cultivo (3:1), tal como se describe en el Anexo II (A1). Posteriormente, las células fueron fijadas con metanol/ácido acético (3:1). Los extendidos cromosómicos se realizaron colocando 2 o 3 gotas de la suspensión celular sobre un portaobjetos congelado y posteriormente secados al calor de la llama. Los experimentos fueron realizados en duplicado.

El análisis citogenético fue realizado en muestras provenientes de cultivos celulares sacrificados a las 18 horas, 10 días y 15 días postratamiento. El tiempo de 18 horas corresponde al análisis citogenético de las células que sobreviven en primera instancia al tratamiento (primera división postratamiento), mientras que los tiempos restantes corresponden a la progenie de dichas células. Los tiempos postratamiento fueron elegidos teniendo en cuenta los trabajos previos de Ojima y cols. [57] y Durante y cols. [58], quienes demostraron la inducción *in vitro* de inestabilidad telomérica retardada (14 días) en células humanas por la acción de la radiación ionizante [57] y la persistencia de cromosomas incompletos en la progenie de linfocitos humanos irradiados con radiación de alta energía 6 días después de producida la irradiación [58].

#### **4.1.1.4 Determinación del índice mitótico**

Como medida adicional de la citotoxicidad inducida por los mutágenos químicos, además de la viabilidad celular (4.1.1.2), se determinó el índice mitótico (IM) de cada uno de los tratamientos con los mutágenos en los diferentes tiempos postratamiento estudiados. Para ello, se contaron un total de 1000 células y se registró el número de células que se encontraban en división mitótica. El IM se calculó como el cociente entre las células que se encontraban en mitosis y el número total de células,

multiplicado por 100. En todos los casos, los conteos se realizaron por duplicado. Se utilizó ANOVA de una sola vía junto con el test de Tukey para comparar las distintas muestras entre sí. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para el valor  $p < 0.05$ .

#### **4.1.1.5 Análisis del cariotipo**

Para determinar si el cariotipo de la línea celular ADIPO-P2 se correspondía con el de la rata parda (*Rattus norvegicus*), a la cual pertenece la cepa de laboratorio de donde derivan estas células (Sprague-Dawley), se procedió a realizar el cariotipado de las células ADIPO-P2. La evaluación de las metafases se realizó a partir de los preparados obtenidos y procesados según lo indicado en la sección 4.1.1.3 y teñidos con colorante Giemsa (Merck). Los preparados se observaron y analizaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse 50i. Se registraron 15 metafases de células ADIPO-P2 provenientes de cultivos controles y teñidas con Giemsa. El ordenamiento y clasificación de los cromosomas según el tamaño y localización del centrómero se realizó a partir de la medición de la longitud de los brazos de cada cromosoma, utilizando el software MicroMeasure 3.3 [96]. Las imágenes fueron analizadas con una magnificación de 1000x y una resolución de 28,34 píxeles por cm. Para la clasificación de cada uno de los cromosomas se estableció la longitud total de cada cromosoma (LT), la longitud del brazo corto (p) y el brazo largo (q); el índice braquial (Ib) y el índice centromérico (IC), el cual se calculó midiendo la relación del brazo corto de cada cromosoma sobre la longitud total del mismo y, finalmente, la longitud relativa promedio de los cromosomas (LRPC), que se obtuvo estableciendo la relación entre la longitud total de cada cromosoma sobre la longitud total del genoma. Estos datos fueron obtenidos a partir de las imágenes de metafases analizadas con el software MicroMeasure 3.3 [96].

El ordenamiento y clasificación de los cromosomas según el tamaño y localización del centrómero se realizó de acuerdo a los cálculos de: Longitud total del genoma (LTG), Longitud relativa (LR), Índice centromérico (IC) e Índice braquial (Ib), los cuales permitieron identificar los brazos largo (q) y corto (p) de cada cromosoma y además clasificarlos como metacéntrico (M), submetacéntrico (SM), acrocéntrico (AC) y subtelocéntrico (ST), según la nomenclatura propuesta por Levan y cols. (1964); [97], de acuerdo a la ubicación del centrómero (Tabla 1). El número de brazos

cromosómicos (número fundamental o NF) fue calculado teniendo en cuenta el número de brazos contenidos en el genoma sin considerar el cromosoma Y.

Índice Centromérico p/(p+q)	Índice Braquial (q/p)	Clasificación
50-37,5	1,0-1,7	Metacéntrico (M)
37,5-25	1,7-3,0	Submetacéntrico (SM)
25-12,5	3,0-7,0	Acrocéntrico (AC)
<12,5	>7,0	Subtelocéntrico (ST)

**Tabla 1: Clasificación de cromosomas de acuerdo a la ubicación del centrómero utilizada para la caracterización citogenética de las células ADIPO-P2 según la nomenclatura propuesta por Levan y cols. (1964).**

#### **4.1.1.6 Hibridación *in situ* Fluorescente con sonda pantelomérica de tipo PNA (PNA-FISH)**

Para la localización y observación de las secuencias teloméricas en los cromosomas de las células ADIPO-P2, se utilizó una sonda telomérica conjugada con Cy3 [Cy3-(CCCTAA)<sub>3</sub>] de tipo PNA (*Peptide Nucleic Acid*), (PNABio Inc., EE.UU), cuya intensidad de señal es proporcional al número de repetidos teloméricos presentes en la célula bajo estudio. Se aplicó la técnica de FISH siguiendo el protocolo propuesto por el proveedor, detallado en el Anexo II (A2) de la presente Tesis Doctoral. Para su observación, los cromosomas fueron teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Los preparados se observaron y analizaron mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 50i, equipado con una lámpara de mercurio HBO 100W y filtros para DAPI y Cy3 (Chroma Technology Corp., Rockingham, VT), utilizando el objetivo de 100x con aceite de inmersión. Se registraron entre 62 y 119 metafases por tratamiento con cada mutágeno por cada experimento, utilizando para la captura de imágenes, una cámara digital de alta resolución marca Nikon (modelo DS-Ri-U3). Para un análisis más detallado y preciso de las imágenes obtenidas, se solaparon las fotografías tomadas con el filtro DAPI y las capturadas con el filtro Cy3, utilizando el programa *NIS-Element Imaging Software 3.22* (Nikon Corporation, Japón). De esta forma, para cada metafase a analizar se obtuvieron por separado las imágenes

correspondientes a la sonda telomérica con Cy3 y a la contratinción con DAPI de todos los cromosomas, lo cual permitió alcanzar un contraste óptimo en cada imagen y facilitó la detección e identificación de todas las aberraciones presentes, incluyendo los fragmentos acéntricos de pequeño tamaño.

#### **4.1.1.7 Identificación y análisis de aberraciones cromosómicas**

La forma más apropiada para determinar citogenéticamente la presencia de inestabilidad telomérica es mediante la identificación de aquellas aberraciones cromosómicas que involucran a los extremos cromosómicos (implican rupturas terminales) y a las secuencias teloméricas terminales propiamente dichas [7], [53]. En este último caso, hablamos específicamente de inestabilidad debida a la disfunción del telómero.

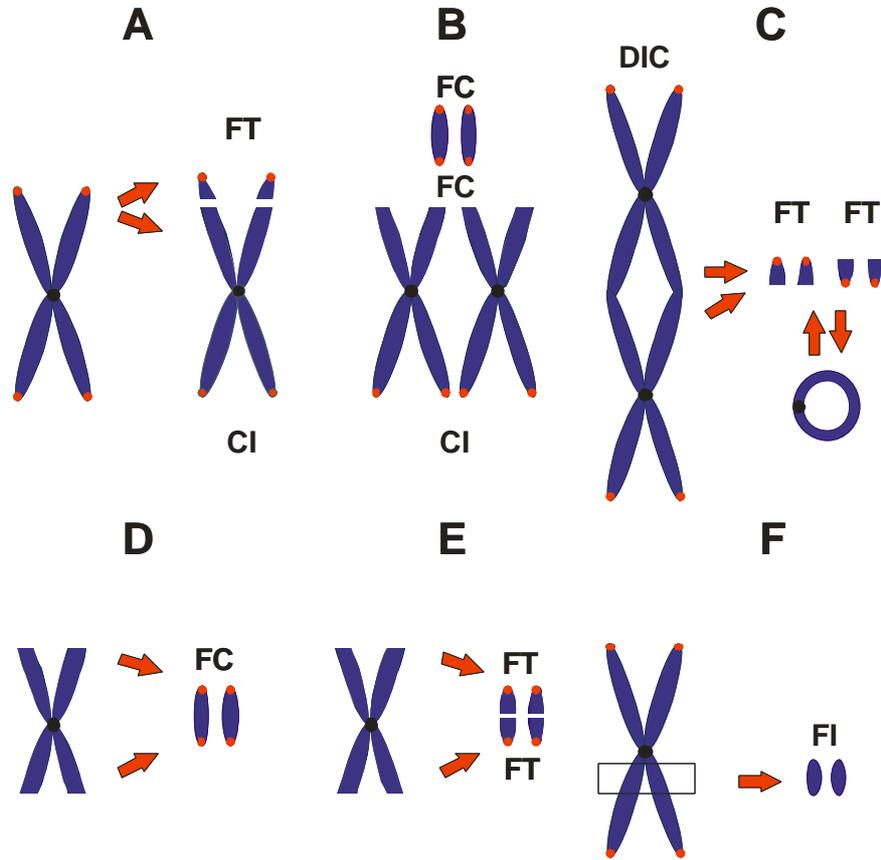
La tinción convencional con el colorante Giemsa o las técnicas de bandeos cromosómicos no permiten identificar con precisión la presencia de las aberraciones cromosómicas que implican disfunción o inestabilidad telomérica [4], [7], [53]. Por lo tanto, en el presente Trabajo de Tesis Doctoral, el análisis citogenético de la disfunción e inestabilidad telomérica en células ADIPO-P2 se llevó a cabo aplicando la técnica de FISH con sonda telomérica tipo PNA (descrita en el punto 4.1.1.6). Esta técnica, permite la identificación de las secuencias de ADN telomérico en cada uno de los cromosomas de cada metafase, y por lo tanto, un análisis preciso de los reordenamientos cromosómicos asociados a inestabilidad o disfunción telomérica. En todas las metafases analizadas, se registró el número total de cromosomas y el número de señales teloméricas terminales presentes en los mismos. La contratinción de los cromosomas con el colorante DAPI permitió detectar fácilmente el número y la posición de los centrómeros en cada uno de ellos. Asimismo, se identificaron diferentes tipos de aberraciones cromosómicas que conllevan a la formación de telómeros disfuncionales o inestables (Figuras 4 y 5) en la progenie de las células tratadas con los mutágenos. El análisis citogenético se realizó a partir de la identificación y el análisis de las siguientes aberraciones cromosómicas:

(1) Cromosomas dicéntricos, (2) multicéntricos (cromosomas que presentan tres o más centrómeros); (3) anillos; (4) fragmentos intersticiales de tamaño variable (elementos cromosómicos que carecen de señales teloméricas), los cuales incluyen tanto a fragmentos acéntricos típicos, donde las cromátidas se ubican en paralelo y no presentan una constricción centromérica como los cromosomas llamados “doble

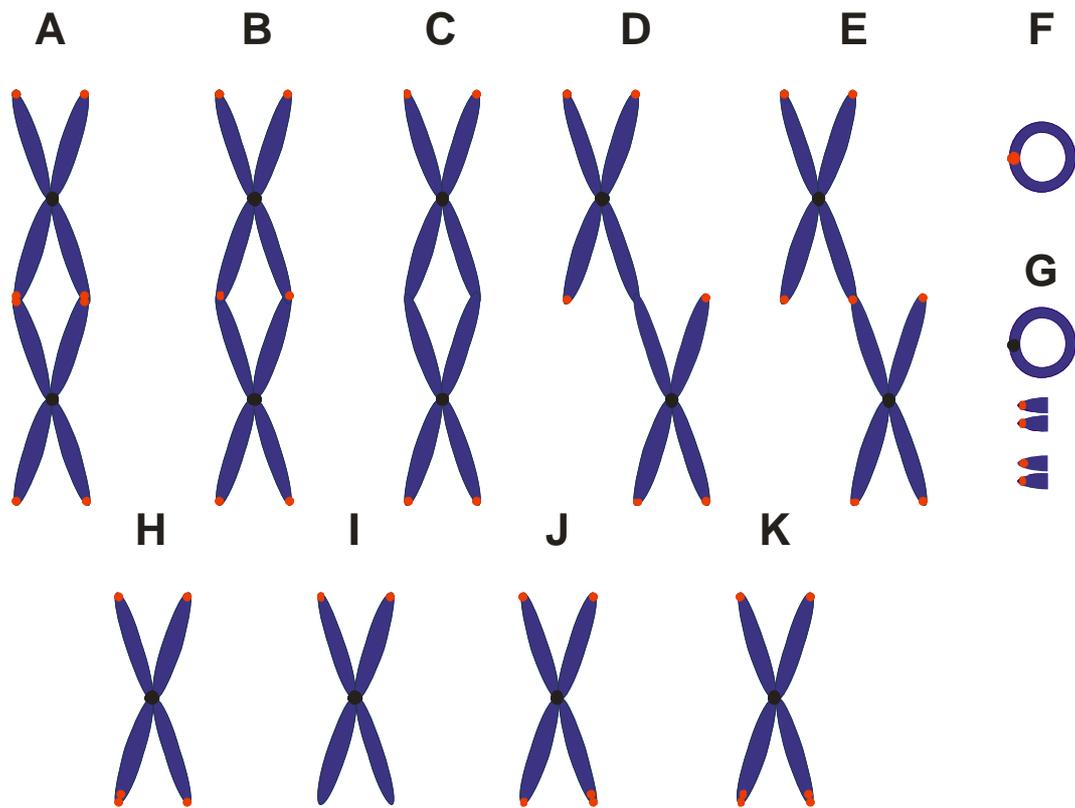
diminutos”, (5) elementos cromosómicos incompletos, tanto céntricos (cromosomas que carecen de señales teloméricas en uno u ambos extremos) como acéntricos (fragmentos cromosómicos terminales); (6) fragmentos compuestos, es decir fragmentos acéntricos con señales en ambos extremos, presentando así cuatro señales teloméricas (Figura 4 A-F).

Para realizar la cuantificación, en el análisis citogenético se consideró a los cromosomas policéntricos como equivalentes de cromosomas dicéntricos, donde el número de dicéntricos es igual a  $n-1$ , siendo  $n$  el número total de centrómeros presentes en el cromosoma multicéntrico en cuestión. Asimismo, se registraron como rupturas de cromátidas (mono- o isocromátida, afectando a una o ambas cromátidas del cromosoma, respectivamente) a toda ruptura cuyo tamaño fuera igual o mayor que el diámetro de la cromátida. Además de las aberraciones mencionadas anteriormente, se registraron aquellas que involucran directamente a las secuencias teloméricas terminales, dando lugar a disfunción telomérica, como es el caso de las fusiones entre telómeros. Este tipo de aberraciones dan lugar a cromosomas dicéntricos o en forma de anillo sin el fragmento acompañante correspondiente. Otro tipo de aberraciones teloméricas registradas fueron las asociaciones entre telómeros de diferentes cromosomas, translocaciones, señales teloméricas de FISH (que implican translocaciones y/o amplificaciones teloméricas), señales de FISH extra-cromosómicas y duplicaciones o pérdidas de señales teloméricas. La pérdida o duplicación de señales teloméricas de FISH señala la pérdida o duplicación de bloques de secuencias teloméricas, pero no así del extremo (telómero) cromosómico en sí [4], [53]. La discriminación, clasificación y el registro entre las fusiones y asociaciones teloméricas se realizó siguiendo el criterio de Bolzán y cols. [4], [53]. Las asociaciones teloméricas son aberraciones en donde los telómeros de dos cromosomas diferentes están muy próximos entre sí. Por ello, las asociaciones teloméricas se registraron como aquellas aberraciones que presentaban dos pares de señales teloméricas muy próximas entre sí luego de haberseles aplicado la técnica de PNA-FISH. Cada par de señales teloméricas corresponde a un cromosoma diferente (Figura 5 A). Por el contrario, las fusiones teloméricas implican la fusión de dos extremos cromosómicos. Por lo tanto, las fusiones fueron registradas como aquellas en donde los telómeros de los cromosomas se había fusionado en una única señal de FISH (una señal por cromátida y la señal de la contratinción de DAPI era continua a lo largo del punto de fusión entre los telómeros); (Figura 5 B-E).

Se determinó la frecuencia de aberraciones cromosómicas totales y la frecuencia de aberraciones a nivel telomérico inducidas por cada mutágeno, en los tiempos postratamiento establecidos (18 horas, 10 días y 15 días luego de la exposición a cada mutágeno). En todos los casos, los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.



**Figura 4: Representación esquemática de los llamados elementos cromosómicos incompletos (ECI), tal como se observan en cromosomas en metafase, utilizando la técnica de FISH con sonda telomérica.** Los círculos rojos representan las señales teloméricas luego de aplicar la técnica de FISH con sonda telomérica. Los puntos negros indican la posición del centrómero en cada cromosoma. Las flechas señalan los sitios de ruptura en cada cromosoma. (A) Cromosoma incompleto CI acompañado por su correspondiente fragmento terminal (FT). (B) Par de CI acompañado por un fragmento compuesto (FC) o “dicéntrico incompleto proximal”. (C) Par de fragmentos terminales resultantes de la formación de un cromosoma dicéntrico (DIC) o de un anillo céntrico, también conocidos como “dicéntrico o anillo incompleto distal”. (D) CI que carece de ambos extremos cromosómicos, acompañado por un FC. (E) CI que carece de ambos extremos cromosómicos, acompañado por dos FT. Los FT se pueden unir a otro cromosoma, promoviendo la estabilidad cromosómica a largo plazo. (F) Fragmento intersticial (FI) que carece de señales teloméricas debido a que no posee telómeros.



**Figura 5: Representación esquemática de los principales tipos de aberraciones teloméricas que involucran disfunción telomérica analizadas en metafase mitótica de las células ADIPO-P2 mediante la técnica de FISH.** (A) Asociación telomérica tipo cromosoma, que ocurre cuando los telómeros de ambos cromosomas se asocian entre sí y se pueden detectar cuatro señales teloméricas. (B) Fusión telomérica tipo cromosoma. Se detectan dos señales teloméricas. (C-D) Fusión de cromosomas en ausencia de telómeros en el punto de unión. (C) Fusión tipo cromosoma y (D) tipo cromátida. (E) Fusión telomérica tipo cromátida. (F-G) Anillos. (F) Anillo cromosómico que se forma a partir de telómeros disfuncionales de un solo cromosoma. Los telómeros del mismo cromosoma se asocian pero no se fusionan (dependiendo de la orientación espacial del anillo, dos o cuatro señales teloméricas podrán ser detectadas, cada una de ellas representando a uno de los telómeros). (G) Anillo cromosómico y sus correspondientes fragmentos terminales (FT). (H) Pérdida de telómero tipo cromátida. (I) Pérdida de telómeros tipo cromosoma. (J) Duplicación de telómero tipo cromátida. (K) Duplicación de telómeros tipo cromosoma.

#### **4.1.1.8 Análisis estadístico de los datos citogenéticos obtenidos**

El análisis estadístico de los datos citogenéticos se realizó utilizando el programa *GraphPad Prism* versión 5.0 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, CA). La significancia de las diferencias de los porcentajes de células dañadas (metafases aberrantes) entre los cultivos dañados y controles se determinó utilizando el test de Chi-Cuadrado. La significancia estadística de las diferencias entre las frecuencias observadas y esperadas de aberraciones cromosómicas obtenidas para los distintos tratamientos, se determinó utilizando la distribución de Poisson, debido a que las mismas mostraron una distribución estadística de tipo Poisson (datos no mostrados). Para ello, se comparó la frecuencia de aberraciones cromosómicas observadas y las esperadas por experimento para cada tratamiento teniendo en cuenta el número total de células y la frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula observados en los respectivos controles. De este modo, los datos señalados como significativos en las tablas correspondientes para cada uno de los tratamientos indican la existencia de significancia estadística en ambos experimentos realizados para cada uno de los mutágenos. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a aquellas con valores de  $p < 0,05$ .

#### **4.1.2 Determinación de la longitud telomérica mediante Tel-Flow-FISH por citometría de flujo**

En conjunto con el Servicio de Citometría de Flujo y Clasificación Celular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) de Montevideo (Uruguay), se desarrolló un nuevo protocolo de “Tel-Flow-FISH” para medir longitud telomérica mediante citometría de flujo. El mismo se describe en el Anexo II (A3) de la presente Tesis Doctoral.

Las mediciones teloméricas por citometría de flujo se realizaron utilizando un citómetro FACS Vantage (BD, San José, California), equipado con un láser *Coherent Innova* 304, de argón de 488 nm, perteneciente al Servicio de Citometría de Flujo y Clasificación Celular del IIBCE (Plataforma).

Cada ensayo de Flow-FISH, requiere de la calibración y la verificación de la linealidad del láser del citómetro. Para ello, se realizó la calibración correspondiente, utilizando *Chicken red blood cells* con ADN QC *particles* (Beckson & Dickinson, California, EE.UU.). La alineación del láser se realizó siguiendo las indicaciones del

proveedor, Beckson & Dickinson. Los parámetros utilizados para las mediciones fueron *forward scatter* (FSC) para el tamaño relativo y *side scatter* (SSC) para la granularidad relativa o complejidad interna. Los filtros utilizados fueron: FL-3 para Ioduro de Propidio (IP), filtro banda 675/20 y FL-1 para la sonda marcada con Isotiocianato de fluoresceína (FITC), filtro banda 520/30. Se utilizó IP, ya que se excita fácilmente con el láser de argón 488 nm y tiene emisión en el rango de 570-620nm (FL-3). La mayoría de los citómetros comerciales están equipados con un láser de argón 488nm, por lo que resultan una buena opción para realizar Flow-FISH utilizando una sonda telomérica de tipo PNA FITC e IP como colorante de ADN.

Se utilizaron 0,3 µg/ml de sonda telomérica conjugada con FITC (FITC-CCCTAA<sub>3</sub>) de tipo PNA (PNABio Inc., EE.UU), cuya intensidad de señal es directamente proporcional al número de repetidos teloméricos presentes en la célula bajo estudio. Asimismo, el contenido de ADN total se determinó mediante la tinción de las células con 0.01 µg/µl de IP (Sigma, CAS No 25535-16-4). La adquisición de los datos se realizó haciendo *gate* en G<sub>1</sub>. Es importante que el análisis de los datos del Tel-Flow-FISH, (obtenidos tanto a partir de células sobre las cuales se realizó la hibridación con sonda FITC, como a partir de aquellas que fueron procesadas únicamente con el *buffer* de hibridación sin sonda), se realice sobre aquellas células que se encuentran en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular, en donde la célula tiene una sola copia del genoma. Esto se logra seteando los *gates* correctos sobre las células en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Si no se descartan aquellas células que se encuentran en las fases S-G<sub>2</sub>/M por *gating*, el valor total obtenido de la longitud telomérica promedio no será equivalente al del genoma.

Los ajustes de compensación del láser se realizaron utilizando una muestra de células teñidas únicamente con IP y otra muestra celular marcada con sonda telomérica FITC resuspendida en 425 µl de PBS con 0,1% de BSA (Invitrogen, Grand Island, NY), (ver Anexo II (A3) de Materiales y Métodos).

Para cada ensayo se recolectaron 500.000 células y la potencia empleada del láser fue de 100mW. El análisis de los datos se realizó mediante el programa *Cellquest Pro Software* (BD, Biosciences, EE.UU), utilizando una escala lineal en FL-1. El *threshold* o umbral, es decir el canal mínimo de detección de un parámetro determinado para la adquisición de los eventos analizados, fue fijado en FSC.

#### **4.1.2.1 Células control utilizadas en las mediciones de longitud telomérica por Tel-Flow-FISH**

Los ensayos de Tel-Flow-FISH para determinar la longitud telomérica se realizaron sobre células ADIPO-P2, a las 18 horas y 10 y 15 días luego del tratamiento con BLM, EN y EZ. Asimismo, se utilizaron como controles internos estándar: la línea celular Jurkat de leucemia linfoblástica aguda de células T humanas, como control de telómeros cortos [98], [99] y células de bazo extraído de ratones machos de la cepa C57BL/6 (*Mus musculus*) de un mes de edad, debido a que poseen telómeros cuya longitud es mayor o igual a 20 kb, como control para telómeros largos [13], [98], [100], [101]. El proceso de obtención de los esplenocitos de *Mus musculus*, utilizados en las mediciones como control interno estándar, se encuentra detallado en el Anexo II (A4) de Materiales y Métodos.

#### **4.1.2.2 Determinación de la longitud telomérica**

Los cálculos para determinar la longitud telomérica a partir de los datos obtenidos por Tel-Flow-FISH se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Baerlocher (2006); [102]. Dicha metodología consiste en el análisis de las distancias de los picos obtenidos en los histogramas generados por el programa de citometría de flujo *Cellquest Pro Software* (BD, Biosciences). Los cálculos de longitud telomérica se realizaron teniendo en cuenta la longitud telomérica promedio de las células Jurkat de telómeros cortos (11,5 kb) y la longitud telomérica promedio de células de bazo, de telómeros largos ( $\geq 20$ kb). En cada caso, se calculó la diferencia existente entre la media de la señal fluorescente obtenida en presencia de la sonda FITC y la media de los picos correspondientes a la autofluorescencia de las células sin sonda en el histograma resultante. El resultado obtenido corresponde a la fluorescencia específica de los telómeros propiamente dichos y fue utilizado para calcular la longitud telomérica de las células ADIPO-P2 sin tratamiento y aquellas células expuestas a los mutágenos químicos a diferentes tiempos postratamiento, según la metodología propuesta por Baerlocher (2006); [102].

#### 4.1.2.3 Análisis estadístico de los datos obtenidos de longitud telomérica

Se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando el programa *Graphpad Prism* versión 5.0 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Para determinar la significancia estadística de las diferencias observadas en la longitud telomérica entre las células ADIPO-P2 tratadas con los mutágenos químicos (BLM, EN y EZ) y sus controles correspondientes, se utilizó ANOVA de una sola vía junto con el test de Tukey para comparar las distintas muestras entre sí. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0,05$ .

#### 4.1.3 Evaluación de la actividad de la enzima telomerasa

Se analizó la actividad de la enzima telomerasa en todos los cultivos celulares a las 18 horas, 10 días y 15 días luego de la exposición a BLM, EN y EZ y en los controles correspondientes (células no expuestas y células tratadas con citrato de sodio). Para ello, en el caso de la BLM y la EN, se utilizó el *Kit TRAPeZe-RT® (Telomeric repeat amplification protocol)* (S7710) de detección de la telomerasa de la empresa Chemicon (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.); [103], [104] y la enzima ADN polimerasa Taq *Platinum* (Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU.), siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante, detallado en el Anexo II (A5). Asimismo, para completar los datos obtenidos de actividad telomerásica, en las muestras tratadas con EZ (y sus respectivos controles), se utilizó el *kit TRAPeZe* de detección de la telomerasa (S7700). El *Kit TRAPeZe-RT®* (S7710) cuantifica la actividad de la enzima telomerasa a través de la medición de la emisión fluorescente en tiempo real mediante PCR cuantitativa (qPCR), mientras que con el *kit TRAPeZe* (S7700), la actividad se determina mediante la amplificación de repetidos teloméricos por PCR convencional y el posterior análisis en geles de poliacrilamida. Si bien la sensibilidad de ésta metodología es mucho menor, se consideró la utilización de este *kit* (S7700) para poder concluir con los ensayos, ya que, al momento de realizar estos experimentos, el *kit* anterior había dejado de fabricarse. En ambos casos, la actividad telomerásica se determinó a partir de extractos celulares provenientes de los cultivos sembrados en paralelo a los utilizados para el análisis citogenético.

El ensayo TRAP cuantifica la actividad de telomerasa en tejidos o extractos celulares mediante el agregado de repetidos teloméricos en el extremo 3' de un oligómero. El producto obtenido sirve luego como templado para una reacción de PCR

que permite medir el número de copias teloméricas resultantes de la actividad telomerasica celular.

La determinación de la actividad de la telomerasa se llevó a cabo a partir de los dos experimentos utilizados en el estudio citogenético de células tratadas con BLM, EN y EZ. Las reacciones de qPCR (BLM y EN) y de PCR convencional (EZ) se corrieron por duplicado. Los extractos celulares que se utilizaron en los ensayos fueron tomados a las 18 horas, 10 días y 15 días luego del tratamiento con BLM, EN y EZ y a partir de los controles correspondientes (células sin exponer y con el *buffer* citrato de sodio). Los extractos celulares fueron resuspendidos en 100 µl de *buffer* de lisis CHAPS, detergente con alta capacidad de disolución de la membrana, que permite mantener la conformación de la proteína y la interacción proteína-proteína. El *buffer* de lisis CHAPS proporciona el medio adecuado para la lisis celular y la extracción proteica.

La concentración de proteínas se determinó utilizando el *Quant-iT Protein Assay Kit* con el *Qubit Fluorometer* (Invitrogen, Grand Island, NY), siguiendo el protocolo indicado por el proveedor; descrito en el Anexo II (A6). Los ensayos de actividad de la telomerasa se realizaron a partir de 1,5 µg/ul de proteína. Para el caso de la BLM y la EN, se generó una curva *standard* a partir de las mediciones de las reacciones llevadas a cabo con el templado control TRS8 incluido en el *Kit* TRAPeze-RT® (S7710). Los controles positivos y negativos fueron analizados en referencia a la curva *standard*. La actividad de la enzima telomerasa (el total de producto generado o TPG) fue calculada comparando el valor promedio de los Ct obtenidos en cada reacción por duplicado con los valores de Ct obtenidos con el templado control TSR8 en la curva *standard*. Las reacciones se llevaron cabo en el equipo ABI *Prism 7500* (Bio-Rad Laboratories Inc., Irvine, CA). Las condiciones de ciclado fueron un ciclo de 30°C durante 30 min y un ciclo de 95°C durante 2 min, seguidos por 45 ciclos de 94°C por 15 seg, 59°C por 60 seg y 45°C durante 10 seg.

Como se mencionó anteriormente, para el caso de las muestras tratadas con EZ y sus respectivos controles, se utilizó el *kit* TRAPeze (S7700). En este caso, la reacción de PCR se realizó según el protocolo detallado por el proveedor, realizando una incubación durante 30 minutos a 37°C, seguida por 33 ciclos de 94°C durante 30 seg, 59°C por 30 seg y 72°C durante 1 min. Los productos de amplificación se detectaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 12% en *buffer* TBE 1X. Además de las muestras, se sembraron dos marcadores de tamaño molecular de 100pb y 25 pb *Ladder* (Invitrogen, Grand Island, NY). Los geles se visualizaron

mediante la tinción del gel con GelRed (Biotium, California) y se fotografiaron usando un sistema de documentación de geles *Molecular Imager® Gbox XR™* (Bio-rad Laboratories Inc., Irvine, CA). El análisis cuantitativo de los geles se llevó a cabo utilizando el programa de acceso gratuito *ImageJ* para Windows (*Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA*). En todos los casos, los ensayos se realizaron por duplicado y se calculó el Total de Producto Generado promedio (TPG o *Total Product Generated*), con la siguiente fórmula, siguiendo las indicaciones del proveedor:

$$\text{TPG (Unidades)} = \frac{(X-X_0)/C}{(r-r_0)/C_R}$$

X: Señal de la muestra.

X<sub>0</sub>: Señal de la muestra incubada a 85°C para inactivar la actividad de la enzima.

C: Señal del control interno *standard* de 36 pb incluido en el kit s7700 presente en las muestras sin incubación a 85°C.

r: Señal del control de cuantificación TSR8, incluido en el kit s7700.

r<sub>0</sub>: Señal del control negativo sin muestra

C<sub>R</sub>: Señal del control interno *standard* de 36pb presente en la muestra de TSR8 incluida en el kit s7700.

#### **4.1.3.1 Análisis estadístico de los datos de actividad telomérica**

Se realizó el análisis estadístico de los datos utilizando el programa *Graphpad Prism* versión 5.0 para Windows (*GraphPad Software, San Diego, CA*). Para determinar la significancia estadística de las diferencias observadas en la actividad de la enzima telomerasa entre las células ADIPO-P2 tratadas con los mutágenos químicos (BLM y EN) y sus controles correspondientes, se utilizó ANOVA de una sola vía con el test de Kruskal-Wallis. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con un valor de p<0.05. En el caso de los datos obtenidos de la EZ (utilizando el *kit* TRAPeZe de detección de la telomerasa (S7700), se realizó el análisis cuantitativo de los geles de poliacrilamida obtenidos y los datos fueron analizados según la metodología detallada por el proveedor, descrita en la sección 4.1.3.

## **4.2 Estudios *In Vivo***

### **4.2.1 Evaluación de la expresión de genes vinculados al complejo telomérico en un modelo murino de inducción tumoral mediante PCR cuantitativa (qPCR)**

#### **4.2.1.1 Modelo experimental de inducción tumoral murino *in vivo***

Se empleó la línea tumoral B16, línea celular de melanoma de ratón (*American Type Culture Collection*, Virginia, EE.UU.), inoculada de forma subcutánea en el flanco de ratones de la cepa C57BL/6 (*Mus musculus*). De esta forma, se induce inicialmente el crecimiento de un tumor en el flanco inoculado y posteriormente se producen las metástasis en órganos particulares. La progresión normal de tumores en el modelo de melanoma murino ha sido previamente caracterizada por el grupo de trabajo del Dr. Juan Chiesa del Laboratorio de Cronobiología de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ). Las células se mantuvieron en cultivo con medio D-MEM, 10% de SFB y 1% de glutamina, en estufa gaseada a 37°C.

Se utilizaron animales de 8 a 14 semanas de edad, con un peso de entre 20 y 25 gramos. Los animales inoculados y los controles (inoculados con D-MEM) se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio agrupados y con acceso a comida y bebida *ad libitum*. Las tareas hasta aquí mencionadas fueron realizadas por el grupo de trabajo del Laboratorio de Cronobiología de la UNQ, siguiendo protocolos experimentales revisados y avalados por la Comisión del Bioterio del Departamento de Ciencia y Tecnología de la UNQ. Las muestras obtenidas de tejido de melanoma se colocaron inmediatamente en las soluciones correspondientes al protocolo de extracción de ARN (Anexo II, A7), y se transportaron en hielo seco hasta los laboratorios del IMBICE para su procesamiento.

#### **4.2.1.2 Extracción y procesamiento del ARN mensajero (ARNm) obtenido a partir de tejido tumoral**

Para las mediciones de la expresión de genes del complejo telomérico shelterina, se seleccionaron los genes principales que codifican para las proteínas TRF1, TRF2, POT1a, TIN2, RAP1 y TPP1 que participan de la estabilidad y el mantenimiento de la función telomérica en mamíferos. Se extrajo ARN de tejido hepático y esplénico de 3 animales control (sin melanoma) y ARN de la piel de 4

ratones controles. Asimismo, se utilizó ARN de muestras de bazo e hígado de 6 y 10 animales respectivamente, inoculados con la línea tumoral B16 de melanoma. Aproximadamente 17 días después de la inoculación de la línea B16, los ratones desarrollaron un tumor subcutáneo palpable en el flanco inoculado. La latencia tumoral, es decir el tiempo que tarda un tumor en ser detectado a partir de la inoculación se determinó por palpación de los animales. La medida del tamaño tumoral se registró tres veces por semana con calibre *vernier*. Para la extracción de ARN de las muestras tumorales, se utilizaron 16 animales que habían desarrollado un tumor subcutáneo de 2000 mm<sup>3</sup> en el flanco inoculado, aproximadamente 40 días luego de haber sido inoculados con la línea B16.

La extracción del ARN total se realizó utilizando Trizol™ (Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU.), siguiendo el protocolo propuesto por el proveedor detallado en el Anexo II (A7). Se cuantificó el ARN total utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, West Palm Beach, FL). La síntesis del ADN copia se realizó a partir de 1 µg de ARN utilizando la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (RT) (Thermo Fisher Scientific, West Palm Beach, FL, EE.UU.), *Random primers* y dNTPs (Invitrogen, Grand Island, NY), siguiendo las indicaciones del fabricante descritas en el Anexo II (A8).

#### **4.2.1.3 Determinación de la actividad transcripcional de los genes *trf1*, *trf2*, *pot1a*, *tin2* y *rap1* y análisis estadístico de los datos**

Las reacciones se llevaron a cabo en un equipo ABI *Prism 7500* (Bio-Rad Laboratories Inc., Irvine, CA, EE.UU.). Se utilizó GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa) de ratón como gen de referencia, que se expresa en forma constitutiva (*housekeeping gene*). Los *primers* para su amplificación fueron *sense* 5' TGCACCACCAACTGCTTAG 3' y *antisense* 3' GGATGCAGGGATGATGTTTC 5', los cuales generan un fragmento de 177 nucleótidos. Para determinar la actividad transcripcional de los genes del complejo telomérico de ratón (*Mus musculus*), se utilizó un par de *primers* o cebadores para cada uno de los genes codificantes *pot1a*, *pot1b*, *trf1* y *trf2*. Para el gen *trf1* se utilizaron los *primers sense* 5' AAACACAGACGTGCTCCATCA 3' y *antisense* 3' CCTTCCACTGGTTCTTCGGT 5', los cuales generan un producto de 102 pb (pares de bases). El gen de interés *trf2* fue amplificado con los *primers sense* 5' GAGAGCCACCTGGATGACAC 3' y *antisense* 3' CTGAGGCTGTCTGCTTGAG 5' que producen un fragmento de 153 pb. Asimismo,

la detección de la expresión transcripcional de los genes *pot1a* y *rap1* se realizó con los pares de *primers sense* 5' ACTTTAGTTGTCCGCGGGTT 3' y *antisense* 3' ACAGCTATGGGGTTTCAGCC 5', los cuales amplifican un fragmento de 154 pb correspondiente al gen *pot1a* y los pares 5'GGAGAATGGAGAGGCAGACAAC 3' y 3' CTGGCTGTGTTTCTGAGTCTTCC 5' del gen *rap1* que amplifica un fragmento de 152 pb. Además, se determinó el patrón de expresión del gen *tin2*, el cual interacciona con TPP/POT1, evitando la fusión telomérica. Para ello, se utilizaron los *primers sense* y *antisense* 5' GCTTGTGAAGCACCTGTTCAGAG 3' y 3' GGCAGTGCTTTCTCTAGCTGAC 5' los cuales generan un producto de 132 pb. Las características de los *primers* se detallan en la Tabla 2.

La detección de los productos de amplificación fue realizada utilizando 5x HOT FIREPol®, Evagreen®, qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Estonia), siguiendo las indicaciones del proveedor descritas en el Anexo II (A9). La reacción se llevó a cabo utilizando 1 µl de ADN copia de un stock de 500 ng/µl con 0,2 µl de cada primer (25 µM). La condición de ciclado fue de un ciclo a 95°C por 15 min, seguido de 41 ciclos a 95°C por 15 seg, 60°C por 20 seg y 72°C por 30 seg. En el caso de *rap1* y *tin2*, la temperatura de *annealing* utilizada fue de 56°C y 58 °C, respectivamente por 30 segundos. Las reacciones se realizaron por duplicado para cada muestra. La curva de renaturalización (*melting*) se realizó al final de la PCR. La especificidad de los productos de PCR amplificados se verificó por el análisis de curvas de *melting* en el equipo ABI Prism 7500 (Bio-Rad Laboratories Inc., Irvine, CA). Además, se realizaron electroforesis en geles de agarosa, donde se corroboraron los resultados observados con las curvas de *melting*.

Para calcular la eficiencia de amplificación de cada par de *primers* se realizaron diluciones de ADN copia (1, 1/10, 1/100 y 1/1000), luego se graficaron los valores de Ct en función del logaritmo de las diluciones del ADN copia y se aplicó la fórmula:

$$E (\text{eficiencia}) = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

El análisis de la expresión relativa de cada una de las muestras se realizó utilizando el software Bio-Rad CFX Manager versión 1.5 (Bio-Rad Laboratories Inc., Irvine, CA).

<b>Primer</b>	<b>Secuencia del par de primers</b>	<b>Tamaño del producto amplificado</b>	<b>Temperatura de annealing</b>
<b>GAPDH</b>	5' GCACCACCAACTGCTTAG 3' 3' GGATGCAGGGATGATGTTTC 5'	177 pb	60°C
<b>Trf1</b>	5' AAACACAGACGTGCTCCATCA 3'	102 pb	60°C
<b>Trf2</b>	5' GAGAGCCACCTGGATGACAC 3' 3' CTGAGGCTGTCTGCTTGGAG 5'	153 pb	60°C
<b>Pot1a</b>	5' ACTTTAGTTGTCCGCGGGTT 3' 3' ACAGCTATGGGGTTTCAGCC 5'	154 pb	60°C
<b>Rap1</b>	5' GGAGAATGGAGAGGCAGACAAC 3' 3' CTGGCTGTGTTTCTGAGTCTTCC 5'	152 pb	56°C
<b>Tin2</b>	5' GCTTGTGAAGCACCTGTCAGAG 3' 3' GGCAGTGCTTTCTCTAGCTGAC 5'	132 pb	58°C
<b>Tpp1</b>	5' GCGATACAACCTGACAGCCAAAG 3' 3' AAAGTCCACCGAATAGGCGCA 5'	132pb	60°C

**Tabla 2: Características de los primers utilizados en las reacciones de qPCR.** En todos los casos, los pares de primers se encuentran separados por al menos un intrón en el correspondiente ADN genómico. De esta forma, se evita la cuantificación de productos provenientes del ADN genómico.

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa *Graphpad Prism* versión 5.0 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, CA). Los niveles de expresión de cada uno de los genes en los tejidos hepático, esplénico y de piel en animales inoculados y normales fueron comparados en cada caso con el tejido tumoral utilizando el test t de *Student*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a aquellos valores de  $p < 0,05$ . Para cada gen, los datos de las muestras tumorales fueron normalizados respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras control (de hígado o bazo, según corresponda el análisis), siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de Livak y Schmittgen (2001) [105].

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis del cariotipo de células ADIPO-P2 y determinación de las características cromosómicas

#### 5.1.1 Características generales de las células ADIPO-P2

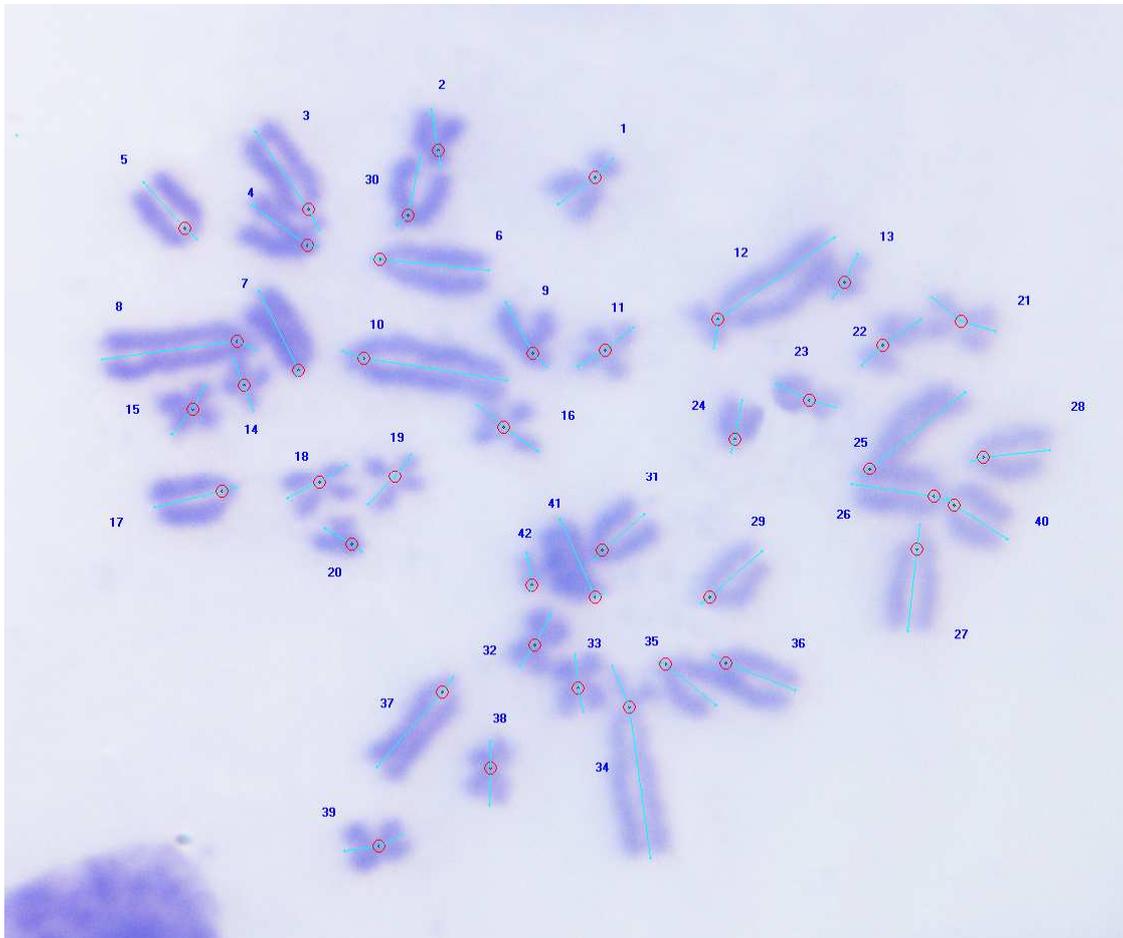
El análisis citogenético de las células ADIPO-P2 reveló que esta línea celular posee  $2n=42$  cromosomas por célula y un número fundamental (NF)= 64 (Figuras 6 y 7).

La evaluación de metafases a partir de la medición de la longitud de los brazos de cada cromosoma mediante el *software* MicroMeasure 3.3 [96], permitió determinar que la constitución cromosómica de las células ADIPO-P2 se corresponde con el cariotipo normal de la rata parda (*Rattus norvegicus*), [106], que presenta un número diploide de  $2n=42$  cromosomas. El cariotipo de las células ADIPO-P2 está constituido por 40 autosomas: 18 cromosomas metacéntricos (M) y submetacéntricos (SM), 4 subtlocéntricos (ST), 18 cromosomas acrocéntricos (AC) y 2 cromosomas sexuales: el X, de tamaño mediano y acrocéntrico (AC) y el Y, el más pequeño del genoma y también acrocéntrico (AC), (Figura 6).

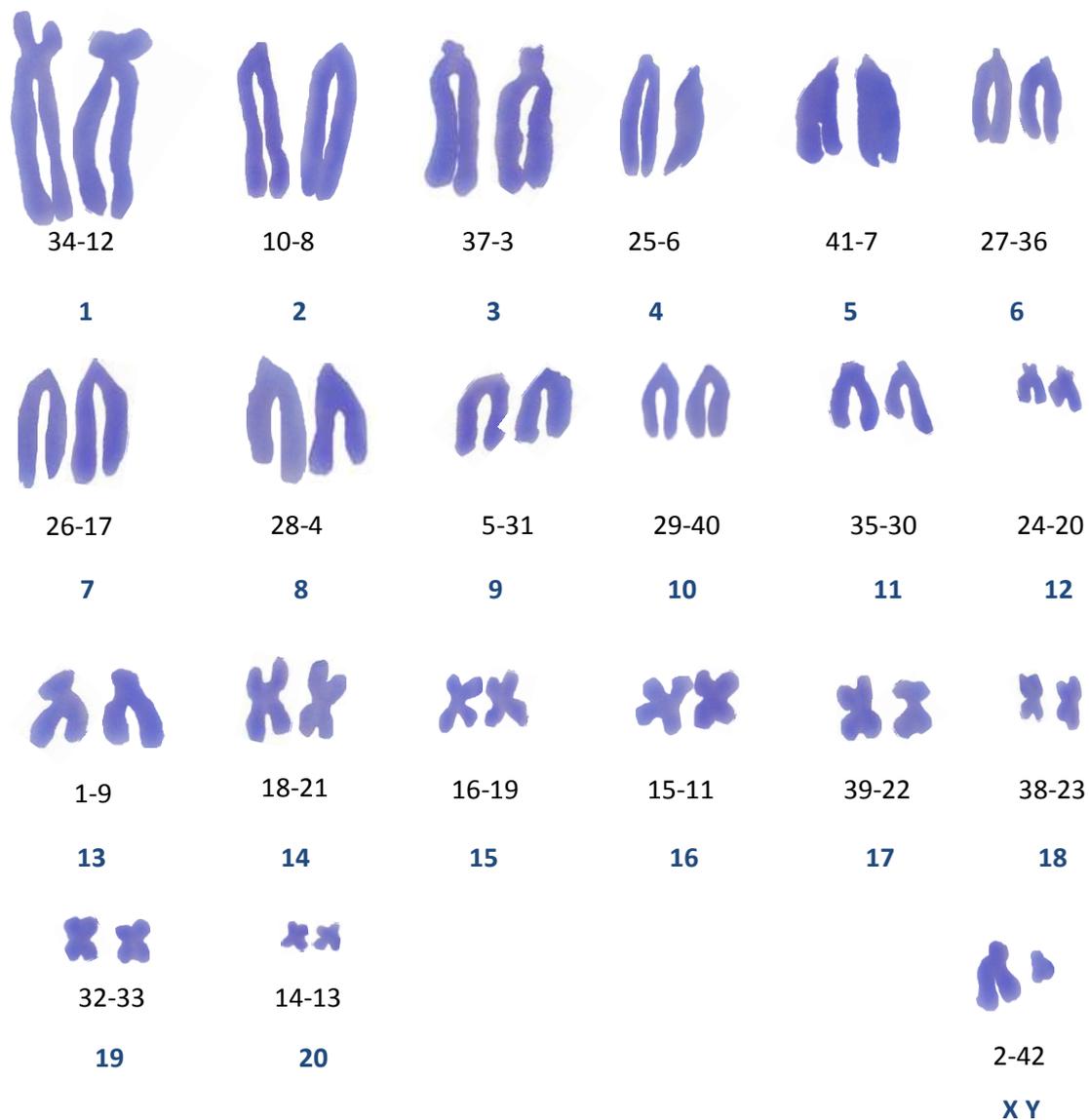
#### 5.1.2 Longitudes de los cromosomas de las células ADIPO-P2

Las mediciones de los brazos de los cromosomas de las células ADIPO-P2, se realizaron utilizando el *software* MicroMeasure 3.3 [96], el cual permitió obtener mediciones directas del brazo corto (p), brazo largo (q) y la longitud total de cada cromosoma (LT) (Figura 8). En segundo término, se calcularon las mediciones indirectas: la longitud relativa promedio de los cromosomas (LR), que corresponde a la longitud total de cada cromosoma sobre la longitud total del genoma, el Índice braquial (Ib) y el Índice centromérico (IC). Para obtener los datos de la longitud de cada cromosoma (mediciones directas e indirectas) y construir el cariotipo normal de las células ADIPO-P2, se utilizó el programa MicroMeasure 3.3 [96], el cual le asignó para el análisis un número al azar a cada cromosoma (Figuras 6 y 7). La tabla 1 del Anexo I de Resultados muestra los datos obtenidos a partir de la medición de la longitud de los brazos de cada cromosoma, mediante los cuales se realizó la clasificación de los

cromosomas de las células ADIPO-P2, a partir de la posición del centrómero, según la nomenclatura propuesta por Levan y cols. (1964) [97].



**Figura 6: Evaluación de la longitud de los brazos cortos (p) y largos (q) de cada cromosoma, en una metafase de células control ADIPO-P2, teñida con Giemsa. Las mediciones se realizaron utilizando el programa MicroMeasure 3.3 (Reeves y Tear, 2001) [96], el cual le asignó para el análisis un número al azar a cada cromosoma. La longitud de las cromátidas está representada a partir de líneas de color celeste y el centrómero con círculos rojos.**



**Figura 7: Cariotipo de una célula de ADIPO-P2 normal:** Constituido por 18 cromosomas metacéntricos (M) y submetacéntricos (SM), 4 subtelocéntricos (ST) y 18 cromosomas acrocéntricos (AC) para el grupo de los autosomas, mientras que para los sexuales, el X es de tamaño mediano y acrocéntrico (AC) y el Y el más pequeño del genoma, y también acrocéntrico (AC). El genoma de las células ADIPO-P2 se corresponde con el cariotipo normal de la rata parda (*Rattus norvegicus*), (Makino y Hsu, 1954) [106] que presenta un número diploide de  $2n=42$  cromosomas. Los números de cromosomas (color negro) fueron asignados por el programa MicroMeasure 3.3 para el análisis y se corresponden con la Figura 6 de la sección de resultados. Los números en color azul indican el par cromosómico que constituye el cariotipo de células ADIPO-P2.

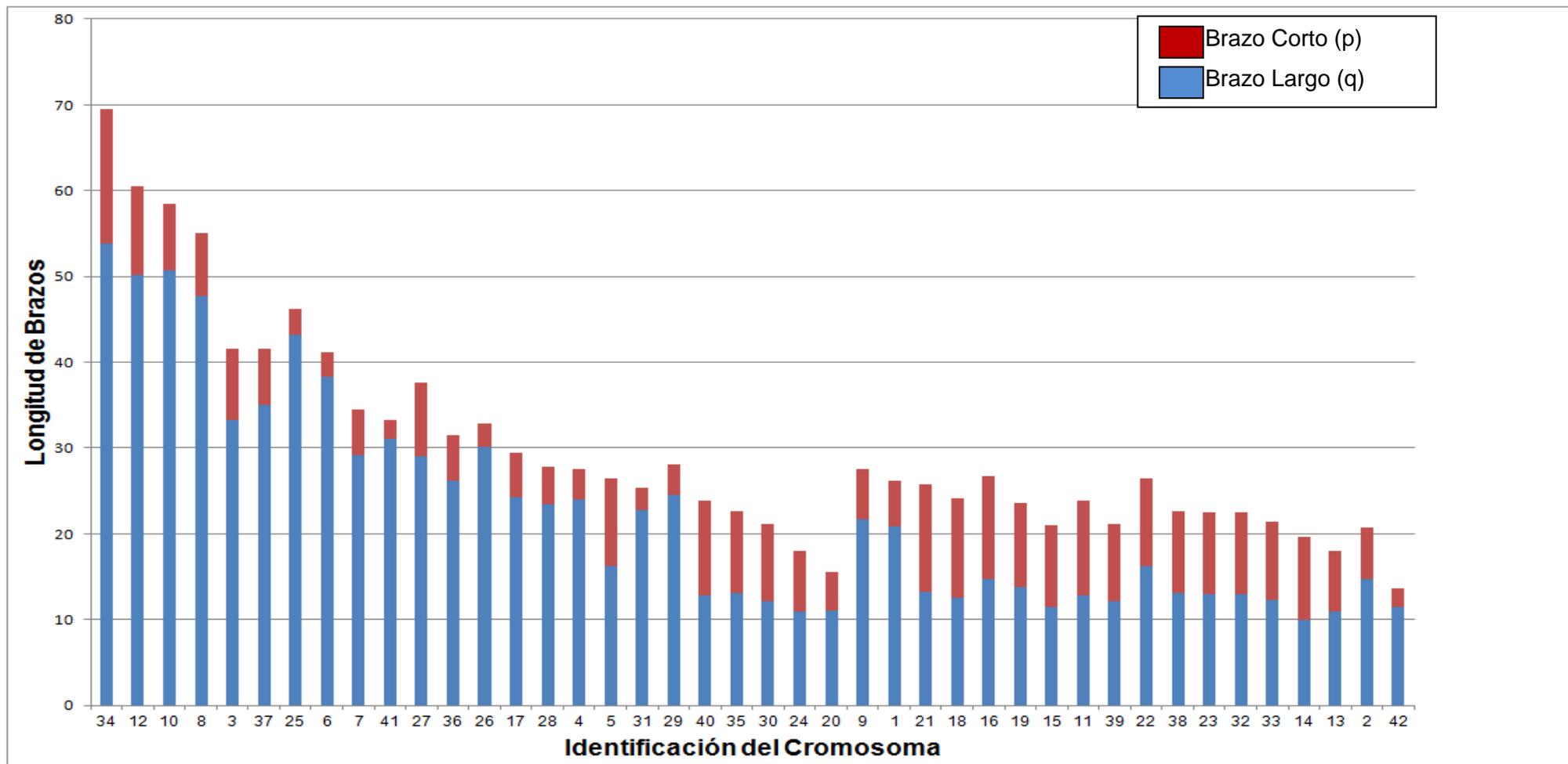


Figura 8: Longitud relativa de brazos cortos (p) y largos (q) de todos los cromosomas que componen el genoma de las células ADIPO-P2.

### 5.1.3 Evaluación de la frecuencia del número cromosómico en células ADIPO-P2 control y tratadas con mutágenos químicos

Se evaluó el número cromosómico en la línea celular ADIPO-P2 en células control y células tratadas con BLM, EN, EZ y citrato de sodio a las 18 horas, 10 y 15 días después del tratamiento con cada uno de los mutágenos.

El número cromosómico de la especie *Rattus norvegicus* (42 cromosomas), se mantuvo como número modal en todos los tiempos estudiados tanto en las células control, como en las células tratadas con BLM, EN, EZ y citrato de sodio (Figura 9). Así por ejemplo, a las 18 horas luego del tratamiento con BLM (2,5 µg/ml), se observó una disminución del 16,67 % en la frecuencia de 42 cromosomas y un aumento del 4,94 % en la cantidad de metafases con 43 cromosomas y del 10,73% en la cantidad de células con 37-41 cromosomas. No se detectó una alteración en el número de cromosomas de células ADIPO-P2 tratadas con los mutágenos restantes. Esto demuestra que la línea celular ADIPO-P2, mantiene gran estabilidad en cuanto al número cromosómico, dado que los valores que presentan sus modas permanecen constantes a través de los diferentes subcultivos, aún en los tratamientos con los mutágenos. Además, los valores de sus modas son significativamente más altos que los de las otras categorías ( $p < 0.05$ ); (Figura 9). Es de destacar que para el análisis citogenético realizado en la presente Tesis Doctoral solamente se tuvieron en cuenta aquellas metafases de células ADIPO-P2 que presentaban  $2n=42$  cromosomas.

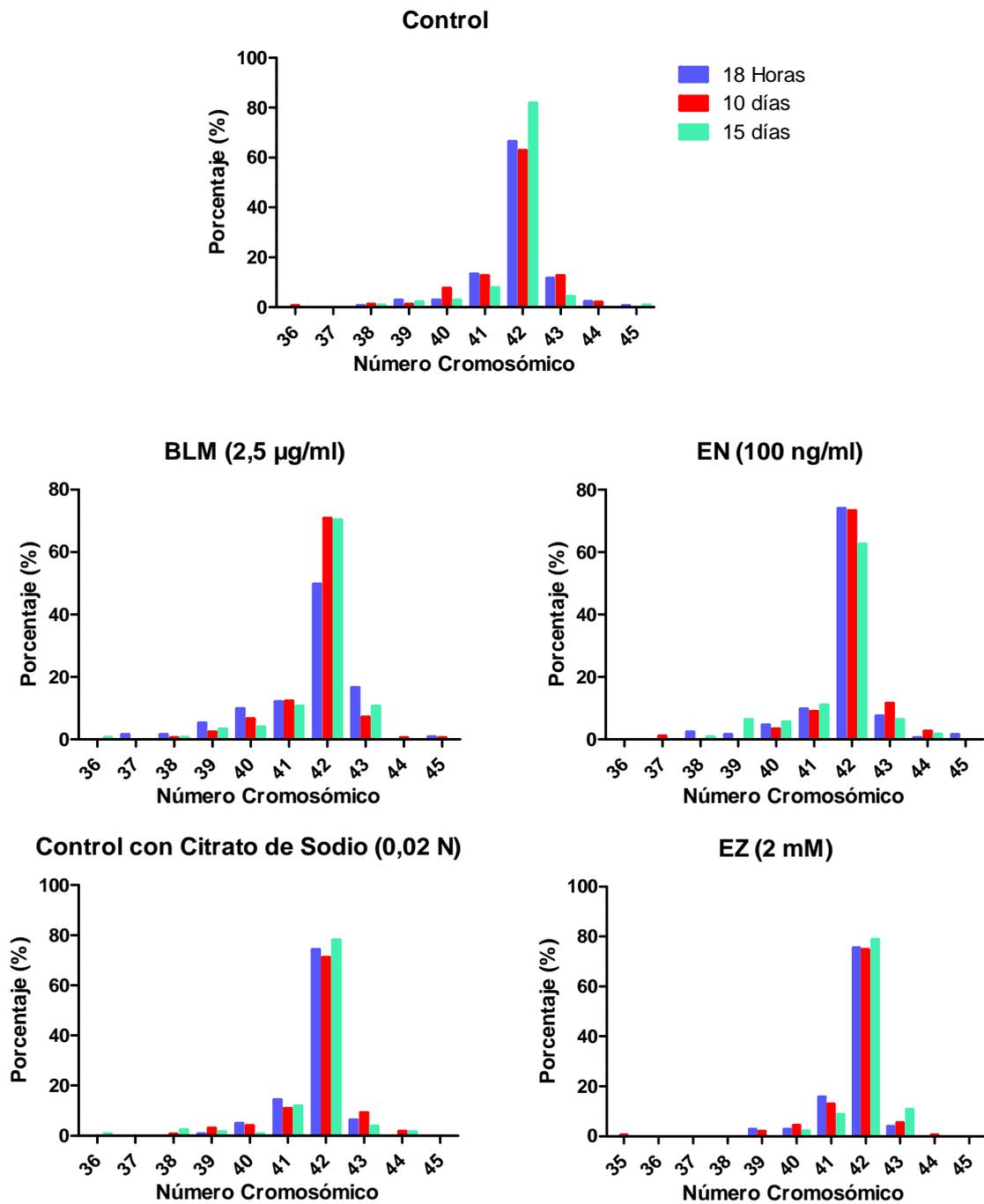


Figura 9: Frecuencia del número cromosómico en la línea celular ADIPO-P2 en células no expuestas y células expuestas a mutágenos químicos a diferentes tiempos postratamiento.

## 5.2 Análisis del índice mitótico y viabilidad celular

La evaluación del IM de las células ADIPO-P2 expuestas a cada uno de los mutágenos y en las células control, no arrojó diferencias significativas entre las células tratadas y los cultivos control sin tratamiento (Figura 10).

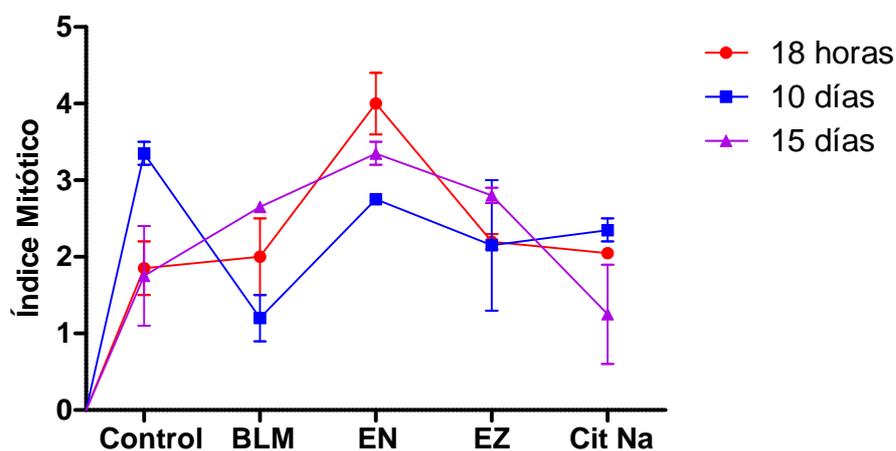


Figura 10: Índice mitótico expresado en porcentaje de células ADIPO-P2 en mitosis expuestas a BLM, EN y EZ y sus respectivos controles a diferentes tiempos postratamiento. ( $p>0,05$ ).

Por otro lado, se registró la cantidad de células vivas en cada pasaje o subcultivo luego de la exposición a cada mutágeno y sus respectivos controles. El análisis de la viabilidad de las células ADIPO-P2 vivas en cada subcultivo o pasaje no mostró diferencias significativas entre aquellas tratadas con los mutágenos y los controles correspondientes en ninguno de los tiempos estudiados ( $p>0,05$ ); (Figura 11 A-C). Los datos demuestran que no hubo muerte celular retardada en las células ADIPO-P2 inducida por los antibióticos, por lo menos hasta los 15 días postratamiento, ya que no se observó ningún efecto significativo de los agentes químicos sobre la viabilidad celular ( $p>0,05$ ). La disminución en el número de células vivas observada a los 10 y 15 días luego del tratamiento con EN y EZ, respectivamente ( $p>0,05$ ); (Figura 11 A-C), puede atribuirse a variaciones técnicas en el método utilizado para el conteo celular, ya que esta tendencia de mortalidad celular se observa tanto en células control como en aquellas células ADIPO-P2 que fueron expuestas a estos mutágenos.

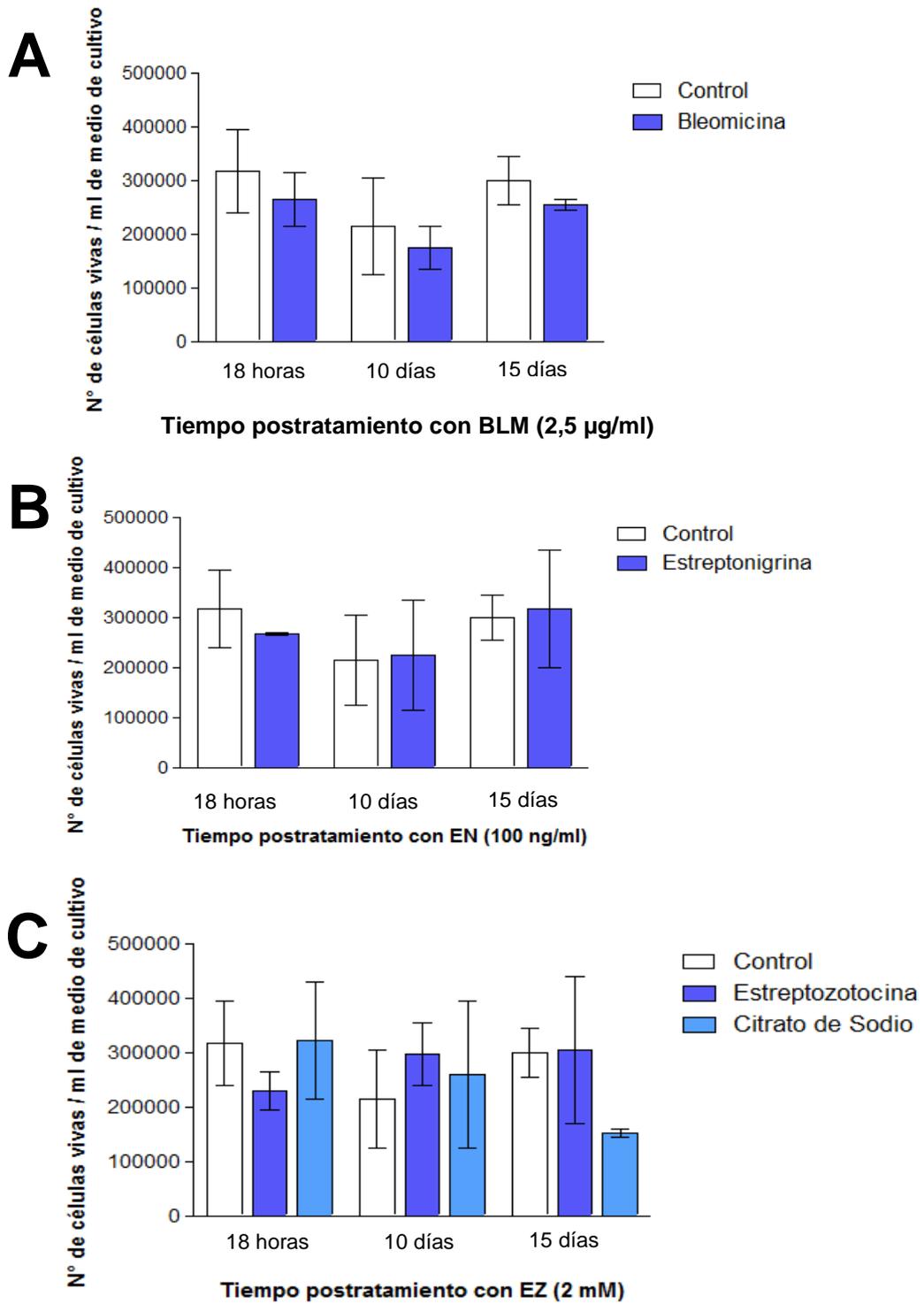
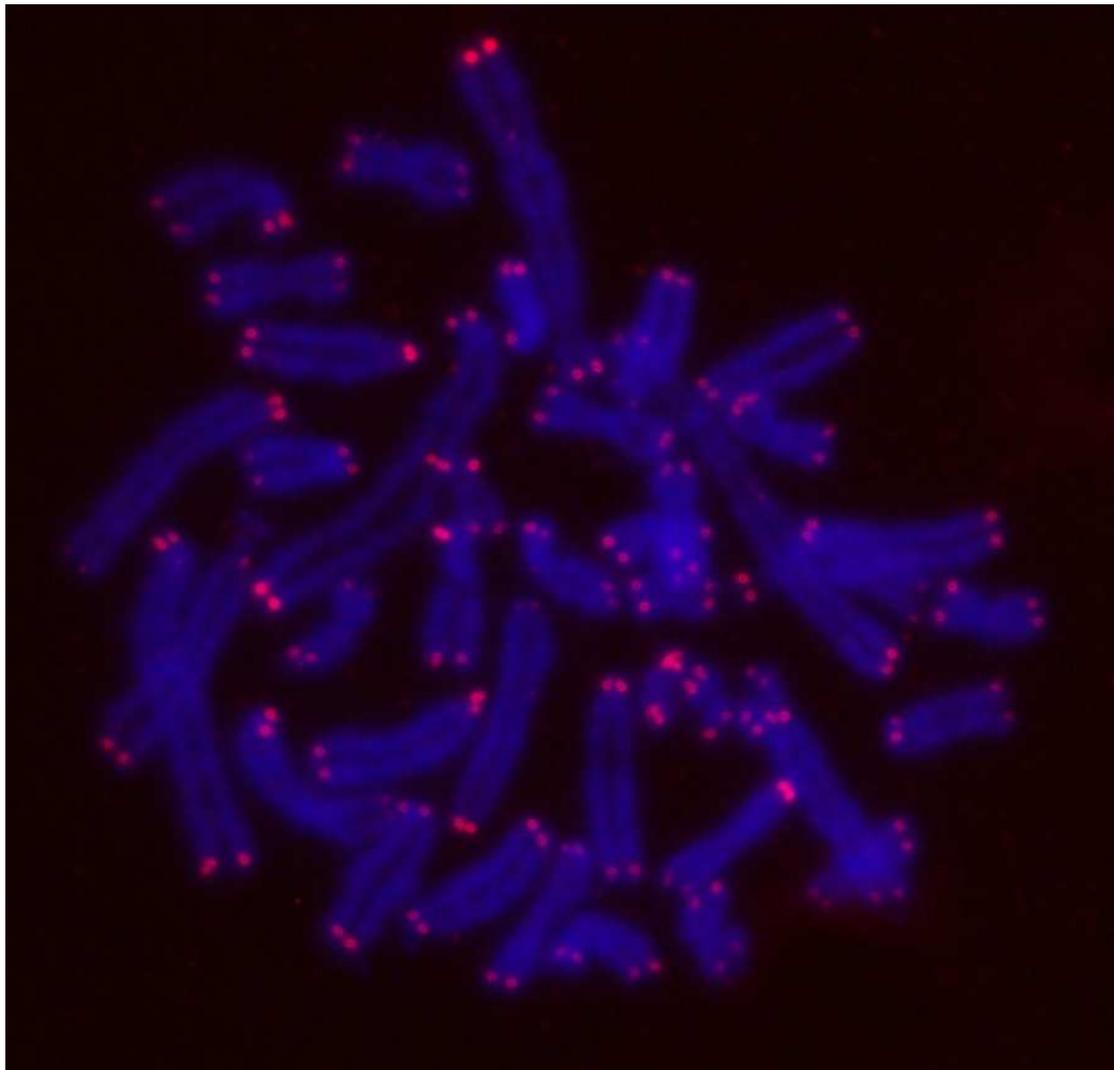


Figura 11: Variación en el número de células ADIPO-P2 viables en función del tiempo de cultivo luego de la exposición a (A) BLM, (B) EN y (C) EZ. Los datos registrados corresponden en casa caso a dos experimentos realizados en forma independiente.

### **5.3 Patrón de distribución de las secuencias teloméricas en células ADIPO-P2**

Como se mencionó en la sección 5.1.1 de los resultados, el análisis citogenético de las células ADIPO-P2, reveló que esta línea celular posee en promedio  $2n=42$  cromosomas por célula. Asimismo, el estudio citogenético empleando la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica permitió establecer que en los cromosomas de las células ADIPO-P2, los repetidos teloméricos (TTAGGG) se encuentran ubicados en los extremos cromosómicos propiamente dichos (siendo algunas señales teloméricas más pequeñas que otras) y que dichos cromosomas no poseen señales teloméricas intersticiales (Figura 12).



**Figura 12: Localización cromosómica de las secuencias teloméricas en una metafase de células control ADIPO-P2, sin tratamiento con los mutágenos químicos ( $2n= 42$ ).** Las señales teloméricas se muestran en color rojo, debido a que la sonda utilizada fue marcada con Cy3, mientras que los cromosomas se muestran en color azul, característico del colorante DAPI, utilizado como contratinción.

## **5.4 Evaluación de la inestabilidad telomérica en la progenie de las células ADIPO-P2 que sobrevivieron al tratamiento con mutágenos químicos de diferente modo de acción**

### **5.4.1 Evaluación de la inestabilidad telomérica en la progenie de las células ADIPO-P2 que sobrevivieron al tratamiento con BLM**

#### **5.4.1.1 Análisis de daño cromosómico inducido por BLM en células ADIPO-P2**

En concordancia con trabajos anteriores desarrollados en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE [46], [51], [74], [107], a las 18 horas luego del tratamiento con BLM, se observó un aumento significativo en el porcentaje de células con al menos una aberración cromosómica (metafases aberrantes); (Figura 13 A). Asimismo, se produjo un incremento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula (Figura 13 B), en relación con las células no expuestas a la BLM ( $p < 0,05$ ). Este efecto de la BLM sobre las células ADIPO-P2 también fue observado a los 10 y 15 días luego de la exposición al mutágeno ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, en las células tratadas con BLM se registró una disminución del 26,8% y 23,9%% en la frecuencia de aberraciones cromosómicas totales a los 10 y 15 días postratamiento, respectivamente, (Figura 13 B). Esta tendencia en la disminución del efecto clastogénico de la BLM a largo plazo, también se mantuvo en el caso de las células que presentaron fragmentos acéntricos (FA). Se registró una disminución de dicho efecto en el 25% de las células a los 10 días y del 10% a los 15 días postratamiento (Tabla 3 y 4).

#### **5.4.1.2 Efecto a corto y largo plazo de la BLM sobre las secuencias teloméricas**

Además de la frecuencia de aberraciones cromosómicas totales que involucran a las secuencias teloméricas (translocaciones, señales adicionales intracromosómicas y extracromosómicas, duplicaciones y pérdida de secuencias o señales teloméricas), se determinó el número y posición de las señales teloméricas de PNA-FISH en las metafases analizadas provenientes de los cultivos controles y tratados con BLM.

Los datos obtenidos a partir del análisis citogenético de las metafases de células ADIPO-P2 sobre las cuales se realizó PNA-FISH con sonda telomérica, sugieren que los fragmentos terminales (FT) constituyen el tipo más frecuente de

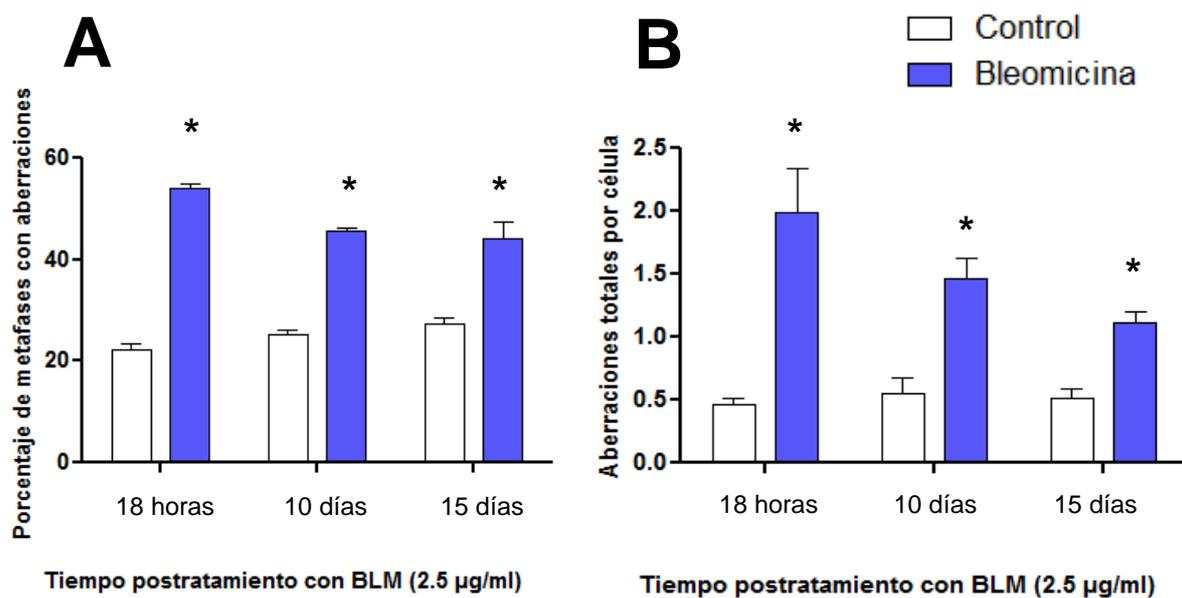
fragmentos acéntricos inducidos por la BLM a corto y largo plazo (Tabla 4). Asimismo, se registró una inducción retardada significativa de cromosomas dicéntricos a los 10 días postratamiento (Tabla 3) y una inducción persistente hasta los 10 días postratamiento de fusiones teloméricas. A los 15 días postratamiento, si bien se observaron fusiones teloméricas en los cultivos tratados con BLM, la frecuencia de las mismas fue similar a la de los cultivos controles (Tabla 5). La mayoría de las fusiones teloméricas observadas fueron de tipo cromosoma, donde se pueden detectar dos señales teloméricas. No obstante, la frecuencia de fusiones teloméricas luego del tratamiento con BLM fue baja (0,04 fusiones teloméricas por célula), representando el 3,7% y el 5,3% del total de aberraciones que directamente involucran secuencias teloméricas terminales inducidas por este compuesto a las 18 horas y 10 días postratamiento, respectivamente (Tabla 5).

La tabla 5 muestra que la BLM induce disfunción telomérica en células ADIPO-P2 hasta los 15 días luego del tratamiento con el mutágeno ( $p < 0,05$ ). La disfunción telomérica se detectó citogenéticamente como la ausencia o pérdida de señal telomérica y/o duplicaciones tipo cromátida o cromosoma en cromosomas metafásicos (Tabla 5 y Figuras 14 A-C y 15 B). Sin embargo, la frecuencia de aberraciones totales que involucran a los telómeros propiamente dichos se mantuvo constante en todos los tiempos postratamiento con BLM (Tabla 5). Asimismo, se observaron señales de FISH adicionales (señales teloméricas nuevas) en las metafases provenientes de todos los tiempos postratamiento estudiados con BLM (Tabla 5 y Figuras 14 A-B y 15 A). Para determinar el aumento en la frecuencia de señales teloméricas adicionales, se consideró el patrón normal de distribución de señales teloméricas en células ADIPO-P2. La presencia de señales teloméricas adicionales indica la posible multiplicación o bien translocación de bloques de secuencias teloméricas (identificados como una única señal por PNA-FISH). Aproximadamente el 62 % de las señales adicionales correspondieron a duplicaciones teloméricas de tipo cromátida y mostraron una distribución aleatoria, localizándose en diferentes cromosomas metafásicos. Las señales teloméricas por triplicado fueron registradas únicamente en la primera división celular a las 18 horas luego del tratamiento con BLM. En todos los casos, las imágenes tomadas con el filtro DAPI, mostraron que los cromosomas con señales teloméricas adicionales no presentaron “gaps” o espacios discontinuos en el sitio de la señal telomérica adicional (Figuras 14 D-F y 15 C-D), indicando que se trata de secuencias teloméricas adicionales situadas dentro del cromosoma.

Por otra parte, en cultivos controles (no expuestos a BLM), se observó un aumento en el número de cromosomas que habían perdido ambas señales teloméricas en uno de sus extremos. Esto puede ser atribuido al fenómeno de acortamiento espontáneo que se da a nivel telomérico en cultivos de células *in vitro* [108–110]. También podría deberse a que las células ADIPO-P2 presenten una menor eficiencia de reparación de rupturas a nivel de los extremos cromosómicos. Sin embargo, la frecuencia de este tipo de aberraciones en las células expuestas a BLM fue significativamente mayor en todos los tiempos de estudio propuestos (Tabla 5), lo cual demuestra el efecto clastogénico *in vitro* de la BLM sobre los telómeros de las células ADIPO-P2.

Tiempo Postratamiento	N° de metafases analizadas	Dicéntricos	Anillos	CI	FA	Rupturas		Aberraciones totales (frecuencia/célula)
						Mono-Cromátida	Iso-cromátida	
Control 18 horas	181	4	0	18	18	7	3	50 (0,27)
Control 10 días	199	1	0	22	27	5	1	56 (0,28)
Control 15 días	143	0	0	8	10	1	1	20 (0,14)
BLM (2,5 µg/ml) 18 horas	133	0	5	64	71	5	12	157 (1,18)*
BLM (2,5 µg/ml) 10 días	212	13x	4	48	60	11	11	147 (0,69)*
BLM (2,5 µg/ml) 15 días	151	0	0	27	28	2	1	58 (0,38)*

**Tabla 3: Aberraciones cromosómicas observadas en células ADIPO-P2 tratadas con BLM (2,5 µg/ml) y células control, luego del análisis citogenético realizado a partir de extendidos cromosómicos a los cuales se les aplicó la técnica de FISH con sonda telomérica.** (CI) Cromosomas incompletos. (FA) Fragmentos acéntricos totales. Aquellos dicéntricos que involucran fusiones teloméricas fueron excluidos de esta tabla e incluidos en la tabla 5. (x) Incluye a un cromosoma tricéntrico, que se considera equivalente a dos dicéntricos. Los cromosomas que mostraron ausencia de señales teloméricas en uno o ambos extremos sin el FA acompañante fueron considerados como eventos con pérdida de señales teloméricas de tipo cromosoma (incluidos en la tabla 5). Los distintos tipos de FA observados se detallan en la tabla siguiente (Tabla 4) (\*) Diferencias significativas en relación a los cultivos controles ( $p < 0,05$ ).



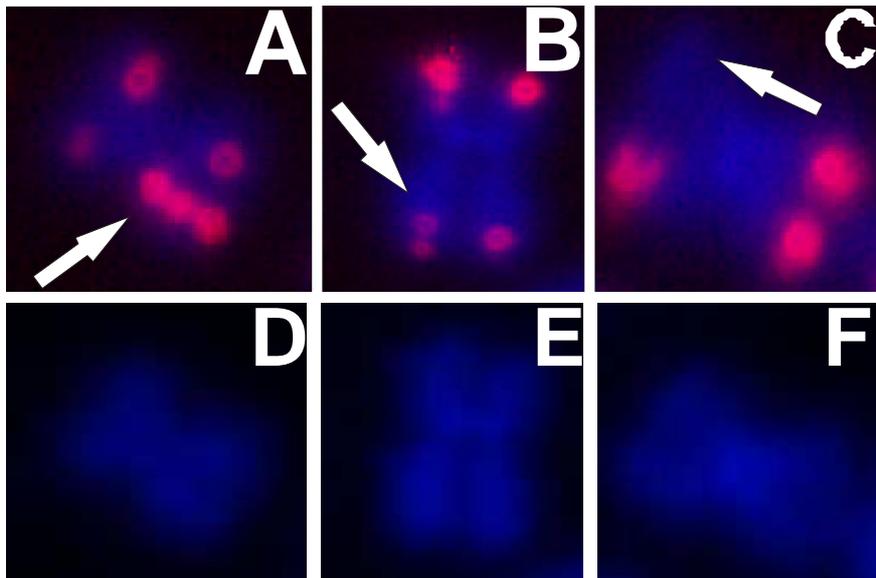
**Figura 13: (A)** Porcentaje total de células que poseen al menos una aberración cromosómica y **(B)** frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula en función del tiempo postratamiento con 2,5 µg/ml de BLM. Los datos obtenidos representan valores promedio de dos experimentos independientes realizados aplicando la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica. (\*) Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Tiempo de cultivo luego del tratamiento	N°total de células analizadas	Fragmentos Acéntricos (FA)			FA totales (frec/cél)
		FT	FC	FI	
Control 18 horas	181	16	1	1	18 (0,10)
Control 10 días	199	23	2	2	27 (0,13)
Control 15 días	143	10	0	0	10 (0,07)
BLM (2,5 µg/ml) 18 horas	133	61	3	7	71 (0,53)*
BLM (2,5 µg/ml) 10 días	212	52	3	5	60 (0,28)*
BLM (2,5 µg/ml) 15 días	151	21	3	4	28 (0,18)*

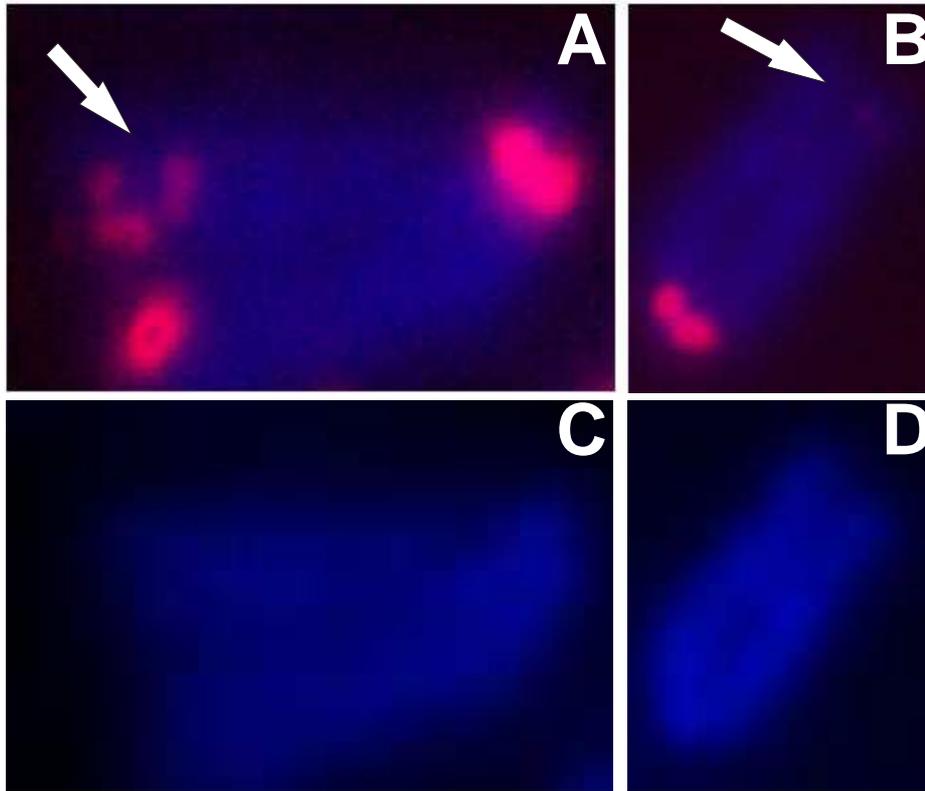
**Tabla 4: Frecuencias de los distintos tipos de fragmentos acéntricos observados en células ADIPO-P2 tratadas con BLM (2,5 µg/ml) y sus respectivos controles (células no expuestas) a partir de la aplicación de la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica. (\*) Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).**

Tratamiento	Tipos de aberraciones teloméricas									Total (frec/cél)
	F	A	Señales Adicionales STIN/STEC	Translocaciones	Señales teloméricas observadas en cada extremo cromosómico					
					Pérdidas		Duplicaciones			
										
Control 18 horas 181 Cél.	0	4	1/1	2	14	5	5	2	0	34 (0,18)
Control 10 días 199 Cél.	1	0	0	0	18	23	11	2	0	55 (0,27)
Control 15 días 143 Cél.	2	0	1/4	1	20	26	1	1	0	56 (0,39)
BLM (2,5 µg/ml) 18 horas 133 Cél.	4	1	4/1	5	22	48	15	5	3	108 (0,81)*
BLM (2,5 µg/ml) 10 días 212 Cél.	9	4	8	4	57	63	23	2	0	170 (0,80)*
BLM (2,5 µg/ml) 15 días 151 Cél.	3	0	3/5	4	38	45	14	1	0	113 (0,75)*

**Tabla 5: Aberraciones teloméricas observadas en células ADIPO-P2 tratadas con BLM (2,5 µg/ml) y células control, luego del análisis realizado a partir de metafases a las cuales se les aplicó PNA-FISH con sonda telomérica.** (STIN) Señales Teloméricas intra-Cromosómicas (STEC) Señales Teloméricas Extra-Cromosómicas. (F) Fusiones teloméricas, que incluyen anillos con señales teloméricas. (A) Asociaciones teloméricas. Las pérdidas y duplicaciones de señales teloméricas están representadas esquemáticamente: los círculos rojos corresponden al número de señales teloméricas observadas en exceso (tres o cuatro) o en defecto (una o ninguna) correspondientes a los extremos de los cromosomas de las metafases de las células ADIPO-P2 analizadas, a las 18 horas, 10 y 15 días luego del tratamiento con BLM. (\*) Diferencias significativas en relación a los cultivos controles ( $p < 0,05$ ).



**Figura 14: Diferentes tipos de aberraciones teloméricas observadas aplicando la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica en cromosomas pertenecientes a metafases de cultivos de células ADIPO-P2 ( $2n=42$ ) tratadas con BLM ( $2,5 \mu\text{g/ml}$ ) y sacrificadas a las 18 horas postratamiento (A-C). (A) Cromosoma metacéntrico con triplicado de señal telomérica en una de sus cromátidas. (B) Cromosoma metacéntrico con duplicado de señal tipo cromátida. (C) Cromosoma metacéntrico con pérdida de un telómero en una de sus cromátidas. Las mismas aberraciones observadas en fotografías tomadas con el filtro DAPI, se muestran en las figuras (D-F).**



**Figura 15: PNA-FISH con sonda telomérica marcada con Cy3 (señal roja) de cromosomas metafásicos de cultivos de células ADIPO-P2 tratados con BLM (2,5 µg/ml) y sacrificados 10 días postratamiento (A-B). Cromosomas contrateñidos con DAPI (azul). Señales adicionales en una de las cromátidas de un cromosoma acrocéntrico (A). Cromosoma acrocéntrico que ha perdido ambas señales teloméricas en uno de sus extremos (B). Las mismas aberraciones observadas pero en fotografías tomadas con el filtro DAPI (C-D).**

## **5.4.2 Evaluación de la inestabilidad telomérica en la progenie de las células ADIPO-P2 que sobrevivieron al tratamiento con EN**

### **5.4.2.1 Análisis del daño cromosómico inducido por EN en células ADIPO-P2**

Las células ADIPO-P2 que fueron tratadas con EN mostraron un aumento significativo en el porcentaje de metafases aberrantes (Figura 16 A) y en la frecuencia de aberraciones cromosómicas totales a las 18 horas, 10 y 15 días postratamiento (Figura 16 B). El análisis citogenético demostró que la EN induce inestabilidad telomérica, que se manifiesta como disfunción telomérica persistente, ya que la misma fue observada en todos los tiempos postratamiento analizados. Esta disfunción se manifiesta principalmente como pérdida y duplicación de secuencias teloméricas. Asimismo, el efecto clastogénico *in vitro* de la EN, persiste en el tiempo y permanece prácticamente sin cambios, al menos hasta 15 días con posterioridad al tratamiento (Figura 16 B). No se detectó la inducción significativa de fragmentos acéntricos (FA) por EN, en relación con las células control (Tabla 6 y 7), excepto a los 15 días postratamiento.

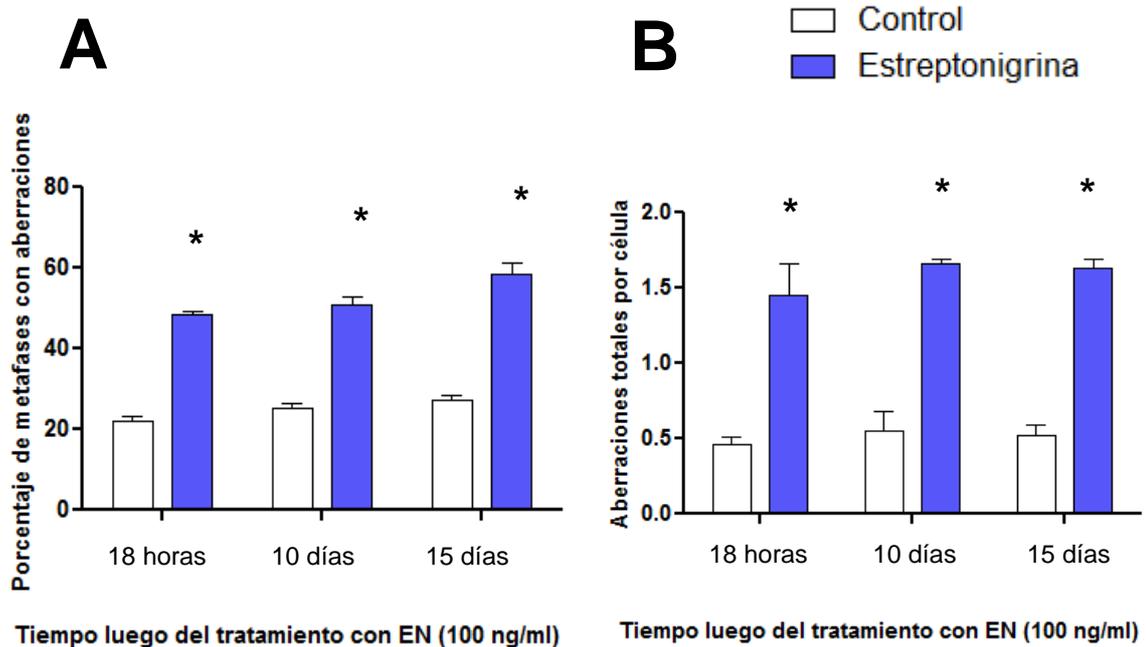
Por otro lado, la alta frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas observada en las células ADIPO-P2 control, que se manifiesta principalmente como cromosomas incompletos (CI) y fragmentos acéntricos (Tablas 6 y 7), no está relacionada con los resultados obtenidos a partir del análisis de FISH y resulta similar a la observada en otras líneas celulares de mamífero previamente investigadas en nuestro laboratorio [46], [47], [74]. No obstante, la frecuencia de este tipo de aberraciones en las células expuestas a EN fue significativamente mayor en todos los tiempos de estudio propuestos (Tabla 8), lo cual indica que existe un efecto clastogénico *in vitro* de la EN *per se* sobre los telómeros de las células ADIPO-P2.

### **5.4.2.2 Efecto a corto y largo plazo de la EN sobre las secuencias teloméricas**

Como se mencionó en la sección anterior, la EN indujo un aumento significativo en la frecuencia total de aberraciones cromosómicas por célula registradas en cultivos de células ADIPO-P2 a las 18 horas, así como también a los 10 y 15 días luego del tratamiento con este mutágeno ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, el análisis detallado de los datos demostró que esta inducción significativa de aberraciones cromosómicas por la EN, se observó principalmente en la frecuencia de aquellas aberraciones que

implicaban disfunción telomérica (Figura 17 y Tablas 6 y 8). La inducción de aberraciones que no involucran disfunción telomérica se detectó únicamente en aquellas células en metafase derivadas de cultivos de ADIPO-P2 sacrificados a los 15 días luego del tratamiento con EN (Tabla 6).

A partir de los datos del análisis citogenético, se evidenció que la disfunción telomérica en células ADIPO-P2 tratadas con EN se manifestó como presencia de señales teloméricas intracromosómicas adicionales, señales de FISH extracromosómicas, pérdida de señales de tipo cromátida y cromosoma, y duplicaciones de señal de tipo cromátida (Figura 18 A-C; G y Tabla 8). Asimismo, se observó una inducción persistente de fusiones teloméricas hasta los 10 días postratamiento. La frecuencia de aberraciones que directamente involucran a las señales teloméricas terminales resultó muy similar en todos los tiempos estudiados (1,21, 1,44 y 1,30, respectivamente), luego del tratamiento. La tabla 8 muestra que la EN induce disfunción telomérica en células ADIPO-P2 a las 18 horas y a los 10 y 15 días postratamiento ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16:** (A) Porcentaje total de células que poseen al menos una aberración cromosómica y (B) frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula en función del tiempo postratamiento con 100 ng/ml de EN. Los datos obtenidos representan valores promedio de dos experimentos independientes realizados aplicando la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica. (\*) Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Tiempo Postratamiento	N° de metafases analizadas	Dicéntricos	Anillos	CI	FA	Rupturas		Aberraciones totales (frecuencia/célula)
						Mono-cromátida	Iso-cromátida	
Control 18 horas	181	4	0	18	18	7	3	50 (0,27)
Control 10 días	199	1	0	22	27	5	1	56 (0,28)
Control 15 días	143	0	0	8	10	1	1	20 (0,14)
EN (100 ng/ml) 18 horas	134	1	2	10	14	2	4	33 (0,24)
EN (100 ng/ml) 10 días	157	8	2	13	17	1	5	46 (0,29)
EN (100 ng/ml) 15 días	128	2	2	14	17	7	2	44 (0,34)*

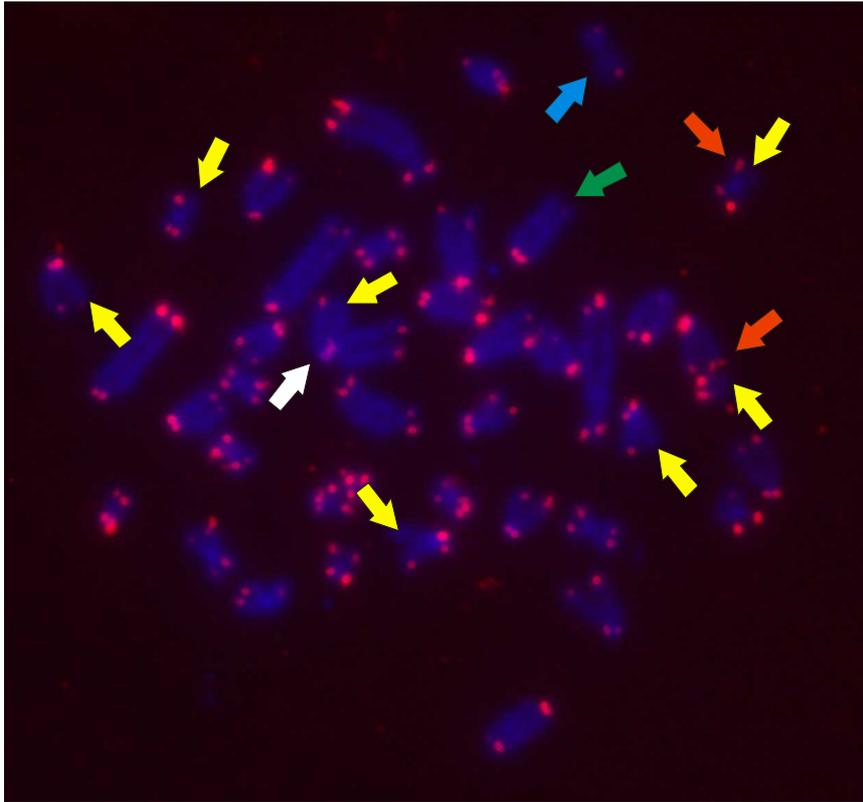
**Tabla 6: Aberraciones cromosómicas observadas en células ADIPO-P2 tratadas con EN (100 ng/ml) y células control, luego del análisis citogenético realizado a partir de metafases a las cuales se les aplicó la técnica de FISH con sonda telomérica.** (CI) Cromosomas incompletos. (FA) Fragmentos acéntricos totales. Aquellos dicéntricos que involucran fusiones teloméricas fueron excluidos de la tabla e incluidos en la tabla 8. Los cromosomas que mostraron ausencia de señales teloméricas en uno o ambos extremos sin el FA acompañante fueron considerados como eventos con pérdida de señales teloméricas de tipo cromosoma (incluidos en la tabla 8). Los distintos tipos de FA observados se detallan en la tabla 7. (\*) Diferencias significativas en relación a los cultivos controles ( $p < 0,05$ ).

Tiempo de cultivo luego del tratamiento	N°total de células analizadas	Fragmentos Acéntricos (FA)			FA totales (frec./cél.)
		FT	FC	FI	
Control 18 horas	181	16	1	1	18 (0,10)
Control 10 días	199	23	2	2	27 (0,13)
Control 15 días	143	10	0	0	10 (0,07)
EN (100 ng/ml) 18 horas	134	10	1	3	14 (0,10)
EN (100 ng/ml) 10 días	157	14	0	3	17 (0,11)
EN (100 ng/ml) 15 días	128	12	1	4	17 (0,13)*

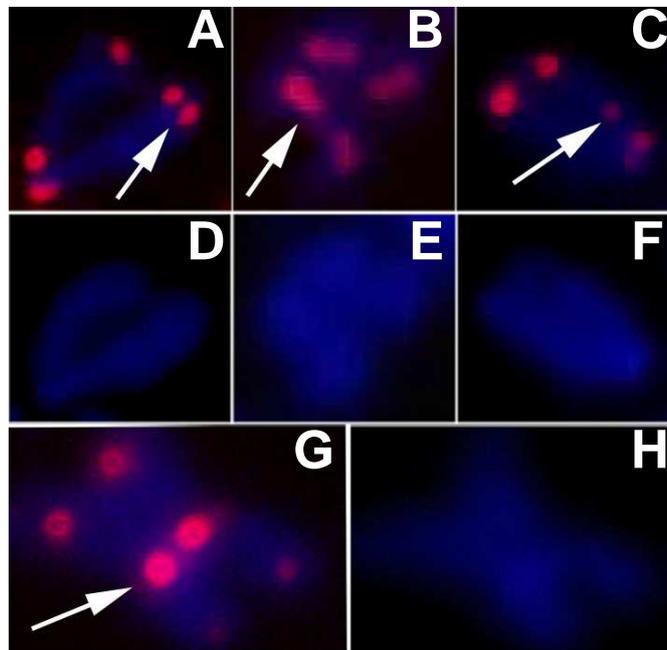
**Tabla 7: Frecuencias de los distintos tipos de fragmentos acéntricos observados en células ADIPO-P2 tratadas con EN (100 ng/ml) y sus respectivos controles (células no expuestas) a partir de la aplicación de la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica. (\*) Diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles ( $p < 0,05$ ).**

Tratamiento	Tipos de aberraciones teloméricas									
	F	A	Señales Adicionales STIN/STEC	Translocaciones	Señales teloméricas observadas en cada extremo cromosómico					Total (frec/cél)
					Pérdidas		Duplicaciones			
										
Control 18 horas 181 Cél.	0	4	1/1	2	14	5	5	2	0	34 (0,18)
Control 10 días 199 Cél.	1	0	0	0	18	23	11	2	0	55 (0,27)
Control 15 días 143 Cél.	2	0	1/4	1	20	26	1	1	0	56 (0,39)
EN (100 ng/ml) 18 horas 134 Cél.	3	0	14	5	54	62	16	5	4	163 (1,21)*
EN (100 ng/ml) 10 días 157 Cél.	10	2	17	3	68	86	32	5	4	227 (1,44)*
EN (100 ng/ml) 15 días 128 Cél.	4	4	8	3	61	36	43	6	1	167 (1,30)*

**Tabla 8: Aberraciones teloméricas observadas en células ADIPO-P2 tratadas con EN (100 ng/ml) y células control, luego del análisis realizado a partir de metafases a las cuales se les aplicó la técnica de FISH con sonda telomérica.** (STIN) Señales Teloméricas intracromosómicas. (STEC) Señales Teloméricas Extra- Cromosómicas. (F) Fusiones teloméricas (incluyen anillos con señales teloméricas). (A) Asociaciones teloméricas. Las pérdidas y duplicaciones de señales teloméricas están representadas esquemáticamente: los círculos rojos corresponden al número de señales teloméricas observadas en exceso (tres o cuatro) o en defecto (una o ninguna) correspondientes a los extremos de los cromosomas de las metafases de las células ADIPO-P2 analizadas, a las 18 horas, 10 y 15 días luego del tratamiento con EN. (\*) Diferencias significativas en relación a los cultivos controles ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17: Metafase de cultivos de células ADIPO-P2 tratada con EN y sacrificada a las 10 días postratamiento mostrando diferentes tipos de aberraciones cromosómicas a nivel telomérico:** Cromosomas con pérdida de señal telomérica de tipo cromátida (las flechas amarillas indican el sitio de pérdida de la señal telomérica); cromosomas acrocéntricos con pérdida de señal telomérica de tipo cromosoma (flechas verdes); cromosoma acrocéntrico con señal telomérica adicional (flecha roja) en una de sus cromátidas; cromosoma metacéntrico exhibiendo una pérdida de telómeros en brazos opuestos del cromosoma (flecha celeste) y una asociación entre dos cromosomas acrocéntricos (flecha blanca). Los cromosomas se muestran en color azul debido a que fueron teñidos con DAPI.



**Figura 18: PNA-FISH con sonda telomérica marcada con Cy3 (señal roja) de cromosomas individuales de metafases de células tratadas con EN (A-H), exhibiendo diferentes tipos de aberraciones a los 10 días postratamiento. Cromosomas contrateñidos con DAPI (azul). (A) Cromosoma acrocéntrico con duplicación telomérica tipo cromátida. (B) Cromosoma metacéntrico con señales teloméricas por duplicado en todos sus brazos cromosómicos. (C) Señal telomérica adicional en una de las cromátidas de un cromosoma acrocéntrico. (D-F) Los mismos cromosomas que (A-C) visualizados con el filtro DAPI. (G) Fusión telomérica entre dos cromosomas acrocéntricos. (H) La misma fusión telomérica visualizada con el filtro DAPI.**

### **5.4.3 Evaluación de la inestabilidad telomérica en la progenie de las células ADIPO-P2 que sobrevivieron al tratamiento con EZ**

#### **5.4.3.1 Análisis de daño cromosómico inducido por EZ en células ADIPO-P2**

Se registró un aumento significativo en el porcentaje de metafases aberrantes (Figura 19 A) y en la frecuencia promedio de aberraciones cromosómicas totales en células expuestas a EZ, en relación con los cultivos de células ADIPO-P2 sin tratamiento. Este efecto también fue observado en aquellos cultivos tratados únicamente con el *buffer* de citrato de sodio 0,02 N (solvente de la EZ), respecto de los cultivos control sin tratar (Figura 19 A-B). Si bien, las diferencias registradas en las frecuencias de aberraciones en células expuestas a citrato de sodio 0,02 N, fueron significativas en relación a las obtenidas en las células ADIPO-P2 sin tratar ( $p < 0,05$ ), la frecuencia de aberraciones totales inducidas por EZ fue de aproximadamente el doble que las inducidas por el citrato en todos los tiempos estudiados ( $p < 0,05$ ); (Figura 19 B). Asimismo, nuestros resultados indican que el citrato de sodio si bien no induce citotoxicidad, ejerce cierto grado de genotoxicidad sobre los telómeros de los cromosomas, ya que el daño cromosómico observado se manifiesta principalmente como aberraciones que involucran disfunción telomérica (Tablas 9 y 11).

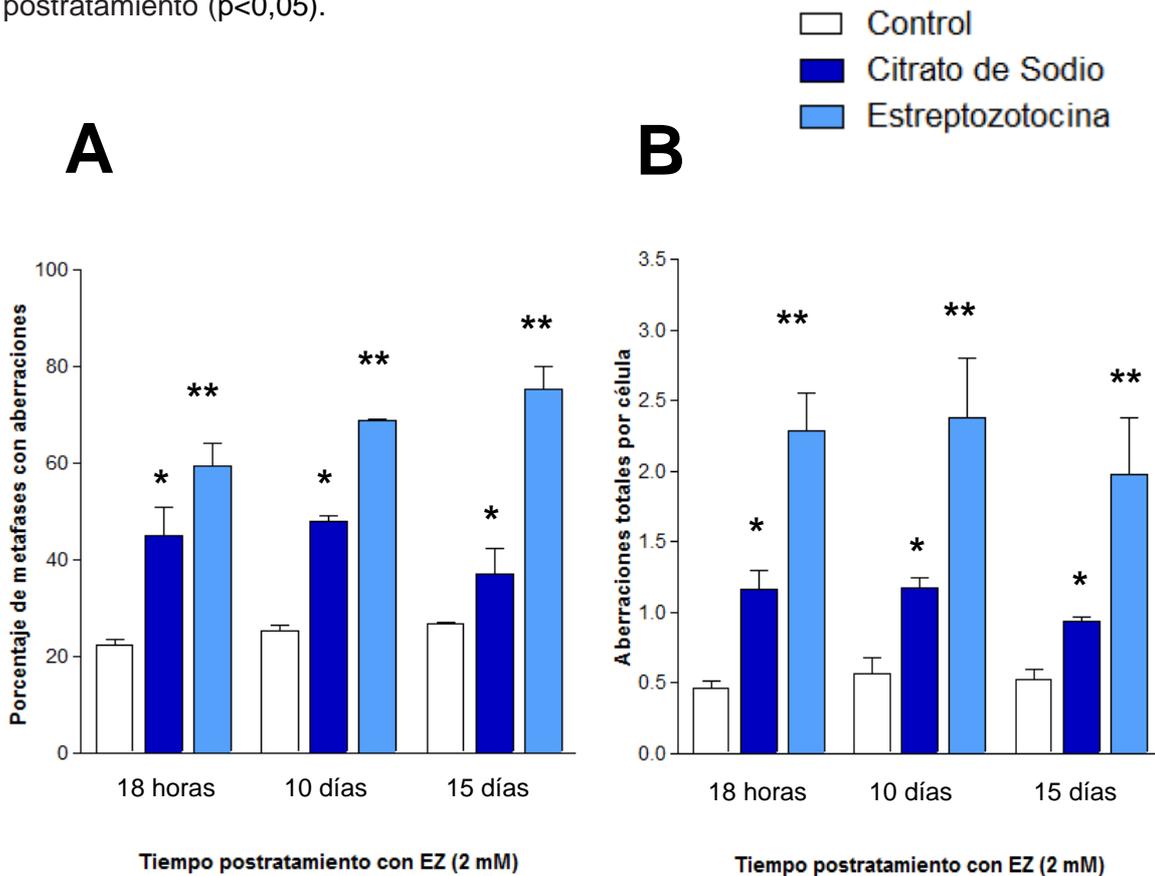
Por otro lado, se observó solamente la inducción de fragmentos acéntricos (FA) a las 18 horas y 15 días postratamiento como consecuencia de la acción de EZ sobre las células ADIPO-P2 (Tabla 10). El análisis citogenético evidenció que la disfunción telomérica en células ADIPO-P2 tratadas con EZ se manifestó principalmente a partir de la pérdida de señal telomérica en una o ambas cromátidas de los cromosomas y pérdida de señales tipo cromátida (Figura 20 y tabla 11).

#### **5.4.3.2 Efecto a corto y largo plazo de la EZ sobre las secuencias teloméricas**

El análisis citogenético de las metafases a las cuales se les aplicó PNA-FISH con sonda telomérica demostró que la EZ indujo principalmente aberraciones que involucran disfunción telomérica (Tablas 9 y 11) en todos los tiempos postratamiento estudiados ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de aberraciones cromosómicas totales solamente a las 18 horas y 15 días postratamiento (Tabla 9). Asimismo, la disfunción telomérica inducida por EZ, a los 10 y 15 días postratamiento, se manifestó principalmente a

partir de la presencia de señales teloméricas adicionales, señales de FISH extracromosómicas, pérdida de señales tipo cromátida y cromosómicas, así como también duplicaciones de señales tipo cromátida y cromosoma (Figura 20 y Tabla 11).

Por otro lado, la frecuencia de aberraciones que directamente involucran a las señales teloméricas terminales resultó muy similar en todos los tiempos estudiados (0,88, 0,82 y 0,73, respectivamente) luego del tratamiento. La tabla 11 muestra que la EZ induce disfunción telomérica en células ADIPO-P2 a las 18 horas, 10 y 15 días postratamiento ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19: (A)** Porcentaje total de células que poseen al menos una aberración cromosómica y **(B)** frecuencia de aberraciones cromosómicas por célula en función del tiempo postratamiento con 2 mM de EZ. Los datos obtenidos representan valores promedio de dos experimentos independientes realizados aplicando la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica. Diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin exponer (\*) y respecto de ambos controles (\*\*): ( $p < 0,05$ ).

Tiempo Postratamiento	N° de metafases analizadas	Dicéntricos	Anillos	CI	FA	Rupturas		Aberraciones totales (frecuencia/célula)
						Mono-cromátida	Iso-cromátida	
Control 18 horas	181	4	0	18	18	7	3	50 (0,27)
Control 10 días	199	1	0	22	27	5	1	56 (0,28)
Control 15 días	143	0	0	8	10	1	1	20 (0,14)
Cit Na (0,02 N) 18 h	147	0	0	13	12	2	0	27 (0,18)
Cit Na (0,02 N) 10 días	176	0	0	13	13	1	0	27 (0,15)
Cit Na (0,02 N) 15 días	136	0	0	5	5	0	3	13 (0,09)
EZ (2 mM) 18 horas	186	3	0	34	34	4	8	83 (0,44)*
EZ (2 mM) 10 días	209	2	0	23	23	2	4	54 (0,26)
EZ (2 mM) 15 días	150	0	0	21	22	0	2	45 (0,30)*

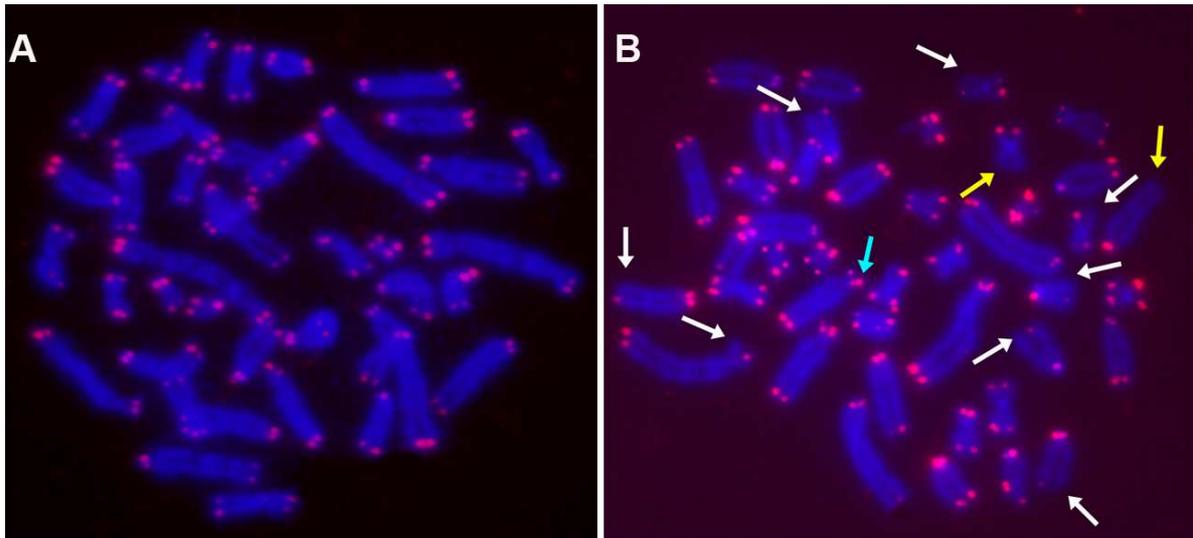
**Tabla 9: Aberraciones cromosómicas observadas en células ADIPO-P2 tratadas con EZ (2 mM) y células control, luego del análisis citogenético realizado a partir de metafases a las cuales se les aplicó la técnica de FISH con sonda telomérica.** (CI) Cromosomas incompletos. (FA) Fragmentos acéntricos totales. Aquellos dicéntricos que involucran a fusiones teloméricas fueron excluidos de la tabla e incluidos en la tabla 11. Los cromosomas que mostraron ausencia de señales teloméricas en uno o ambos extremos sin el FA acompañante fueron considerados como eventos con pérdida de señales teloméricas de tipo cromosoma (incluidos en la tabla 11). Los distintos tipos de FA observados se detallan en la tabla 10. (\*) Diferencias significativas en relación a los cultivos controles ( $p < 0,05$ ).

Tiempo de cultivo luego del tratamiento	N° total de células analizadas	Fragmentos Acéntricos (FA)			FA totales (frec/ cél)
		FT	FC	FI	
Control 18 horas	181	16	1	1	18 (0,10)
Control 10 días	199	23	2	2	27 (0,13)
Control 15 días	143	10	0	0	10 (0,07)
Cit Na (0,02 N) 18 h	147	9	2	1	12 (0,08)
Cit Na (0,02 N) 10 días	176	11	1	1	13 (0,07)
Cit Na (0,02 N) 15 días	136	5	0	0	5 (0,03)
EZ (2 mM) 18 horas	186	28	4	2	34 (0,18)*
EZ (2 mM) 10 días	209	21	1	1	23 (0,11)
EZ (2 mM) 15 días	150	19	1	2	22 (0,14)*

**Tabla 10: Frecuencias de los distintos tipos de fragmentos acéntricos observados en células ADIPO-P2 tratadas con EZ (2 mM) y sus respectivos controles (células no expuestas y con citrato de sodio) luego del análisis de los resultados de la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica. (\*) Diferencia significativa con respecto a los controles.**

Tratamiento	Tipos de aberraciones teloméricas									Total (frec/cél)
	F	A	Señales Adicionales STIN/STEC	Translocaciones	Señales teloméricas observadas en cada extremo cromosómico					
					Pérdidas		Duplicaciones			
										
Control 18 horas 181 Cél.	0	4	1/1	2	14	5	5	2	0	34 (0,18)
Control 10 días 199 Cél.	1	0	0	0	18	23	11	2	0	55 (0,27)
Control 15 días 143 Cél.	2	0	1/4	1	20	26	1	1	0	56 (0,39)
Cit Na (0,02 N) 18 h 147 Cél.	0	0	2/6	3	70	40	21	2	2	146 (0,99)*
Cit Na (0,02 N)10 días 176 Cél.	0	0	3	1	94	65	12	3	0	178 (1,01)*
Cit Na (0,02 N)15 días 136 Cél	0	0	0	1	57	49	6	1	0	114 (0,84)*
EZ (2 mM) 18 horas 186 Cél	2	1	5/12	6	116	137	42	17	3	341 (1,83)*
EZ (2 mM) 10 días 209 Cél	0	2	4/1	7	142	244	37	9	1	447 (2,14)*
EZ (2 mM) 15 días 150 Cél	0	0	0	10	89	102	35	8	2	246 (1,64)*

**Tabla 11: Aberraciones teloméricas observadas en células ADIPO-P2 tratadas con EZ (2 Mm) y células control, luego del análisis de metafases a las cuales se les aplicó la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica.** (STIN) Señales Teloméricas Intra-Cromosómicas. (STEC) Señales Teloméricas Extra- Cromosómicas. (F) Fusiones teloméricas que incluyen anillos con señales teloméricas. (A) Asociación de los extremos cromosómicos. Las pérdidas y duplicaciones de señales teloméricas están representadas esquemáticamente: los círculos rojos corresponden al número de señales teloméricas observadas en exceso (tres o cuatro) o en defecto (una o ninguna) correspondientes a los extremos de los cromosomas de las metafases de las células ADIPO-P2 analizadas, a las 18 horas, 10 y 15 días luego del tratamiento con EZ. (\*) Diferencias significativas en relación a los cultivos controles ( $p < 0,05$ ).



**Figura 20: Patrón de hibridación de los repetidos teloméricos (TTAGGG)<sub>n</sub> en metafases de células ADIPO-P2 control (A) y tratadas con EZ (2 mM), luego de aplicar la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica marcada con Cy3 (rojo).** Los cromosomas se muestran en color azul debido a que fueron teñidos con DAPI. (B) Metafase de cultivos de células ADIPO-P2 tratada con EZ y sacrificada a las 10 días postratamiento mostrando diferentes tipos de aberraciones cromosómicas a nivel telomérico: Cromosomas con pérdida de señal telomérica de tipo cromátida (las flechas blancas indican el sitio de pérdida de la señal telomérica); cromosomas con pérdida de señal telomérica de tipo cromosoma (flechas amarillas); cromosoma acrocéntrico con señal telomérica adicional (flecha celeste) en una de sus cromátidas.

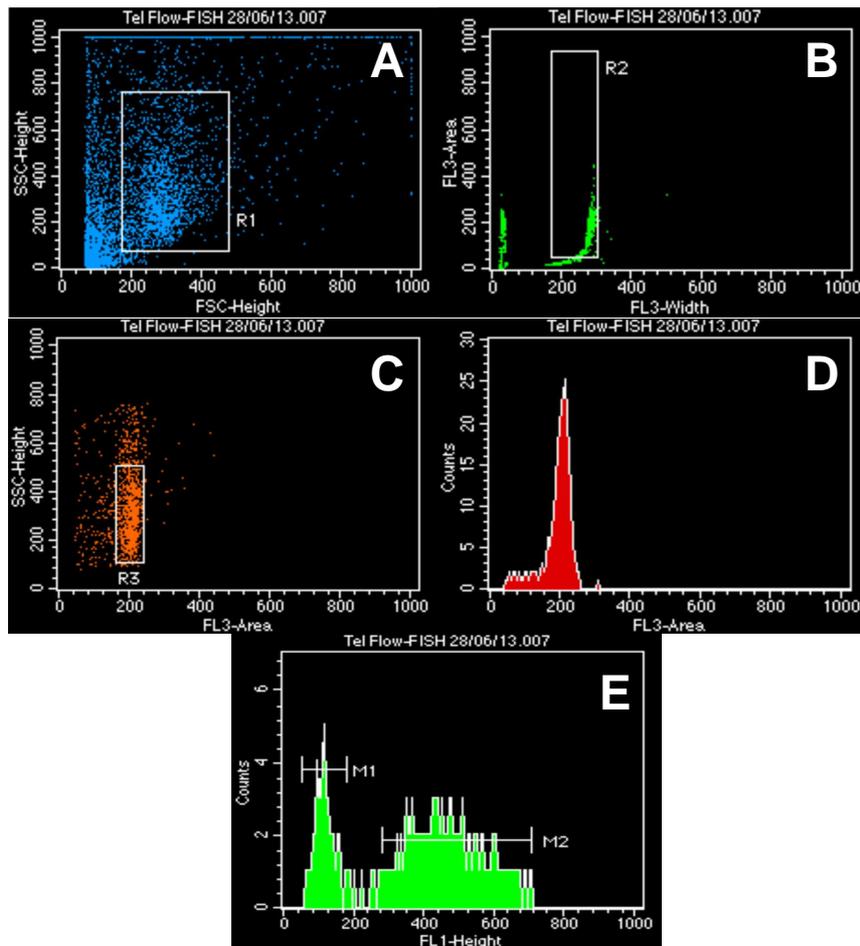
### 5.5 Evaluación de las modificaciones en la longitud telomérica mediante Tel-Flow-FISH en la progenie de células que sobrevivieron al tratamiento *in vitro* con mutágenos químicos de diferente modo de acción.

#### 5.5.1 Verificación de las longitudes teloméricas de células Jurkat y células de bazo de ratón utilizadas en la puesta a punto de la técnica de Tel-Flow-FISH.

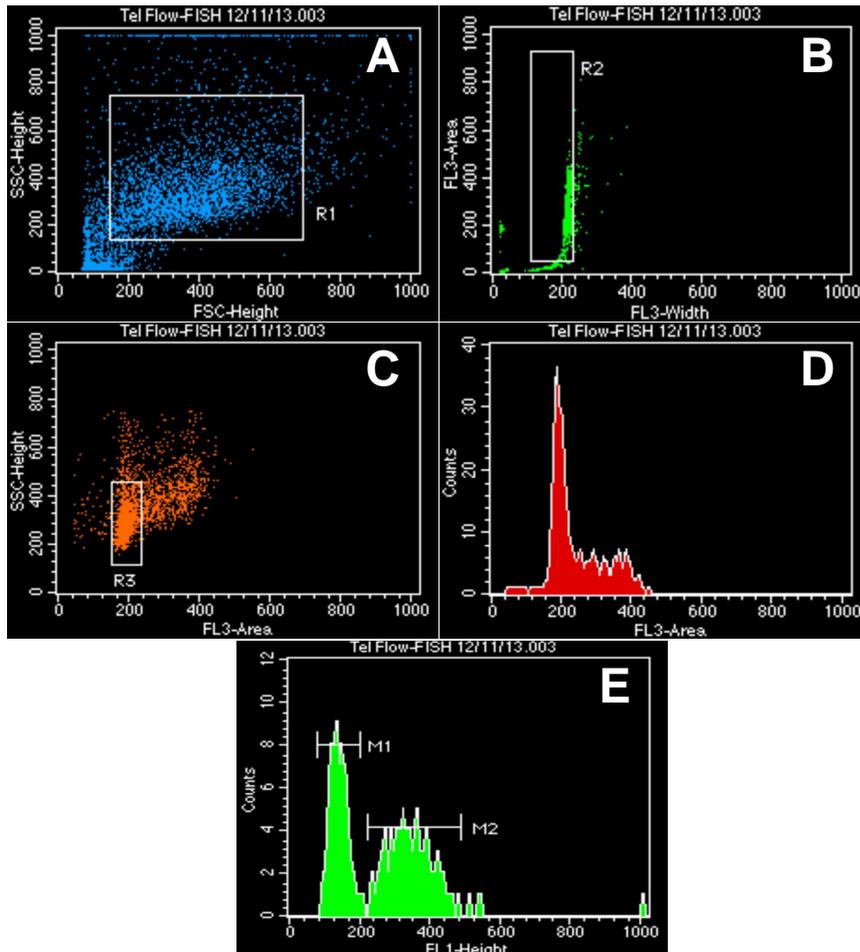
Se desarrolló la técnica de Tel-Flow-FISH, utilizando dos controles internos estándar: una suspensión de células Jurkat (línea celular de leucemia aguda linfoblástica de células T humanas), como control de telómeros cortos [98], [99] y otra suspensión de células de bazo extraído de ratones machos de la cepa C57BL/6 (*Mus musculus*) de un mes de edad, debido a que poseen telómeros cuya longitud es mayor

o igual a 20 kb, como control para telómeros largos [13], [98], [100], [101]. Ambas muestras fueron medidas en el citómetro de flujo. Para determinar la hibridación específica de la sonda FITC sobre los telómeros de los cromosomas y diferenciarla de la autofluorescencia propia de las células, cada población celular fue procesada para la técnica de Tel-Flow-FISH, con y sin sonda FITC en el *buffer* de hibridación. Las mediciones de cada muestra procesada por Flow-FISH con el *buffer* de hibridación sin sonda FITC, son necesarias para excluir a la autofluorescencia propia de las células, de las mediciones teloméricas obtenidas en dichas células. De este modo, a partir de las mediciones teloméricas registradas, se calculó la longitud promedio total del genoma (sección 4.1.2.2 de Materiales y Métodos). Asimismo, se corroboró la hibridación específica de la sonda PNA-FITC sobre los telómeros, observando las muestras procesadas por Tel-Flow-FISH en el microscopio de fluorescencia.

Los histogramas de fluorescencia obtenidos muestran las diferencias de longitud telomérica entre las células de bazo y las células Jurkat (Figura 21 E y Figura 22 E). Las células de bazo, debido a que presentan telómeros largos ( $\geq 20$  kb), registran un pico de fluorescencia que se encuentra desplazado hacia la derecha, en relación con el pico de fluorescencia de las células Jurkat, en donde la distancia con respecto al pico correspondiente a la autofluorescencia celular (células únicamente tratadas con el *buffer* de hibridación) es mucho menor, lo que denota los telómeros cortos propios de las células Jurkat (11,5 Kb), (Figura 22 E). Además, la diferencia registrada entre las medias M1 y M2 en los histogramas de fluorescencia de cada una de las poblaciones celulares es mucho menor en el caso de las células Jurkat (200,99), que la diferencia existente entre M1 y M2 en las células de bazo (348,3), indicando que estas últimas poseen telómeros largos (Figura 21 E y Figura 22 E).



**Figura 21: Tel-Flow-FISH de células de bazo de telómeros largos ( $\geq 20$  Kb). Se adquirieron un total de 5000 eventos (A-E). (A) Identificación de las células de bazo analizadas (R1), de acuerdo al tamaño celular (*forward scatter*, FSC) y a la complejidad citoplasmática (*side scatter*, SSC) en un *dot plot*. Se analizaron un total de 806 eventos (R1). (B) Células de bazo que hibridaron con la sonda FITC (R2). El resto de las células corresponden a esplenocitos sobre los cuales se realizó el mismo procedimiento de Flow-FISH pero sin sonda PNA-FITC en el *buffer* de hibridación. La señal de fluorescencia emitida por las células que hibridaron con la sonda telomérica es mayor que la autofluorescencia de las muestras, las cuales fueron procesadas únicamente con el *buffer* de hibridación sin la sonda. (C-D) Células de bazo en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. (E) Histograma de fluorescencia de la población de células de bazo analizada con y sin sonda telomérica (autofluorescencia). Las medias registradas para las células sin y con sonda fueron de 116,79 (M1) y de 465,09 (M2) respectivamente, indicando que hubo hibridación telomérica.**



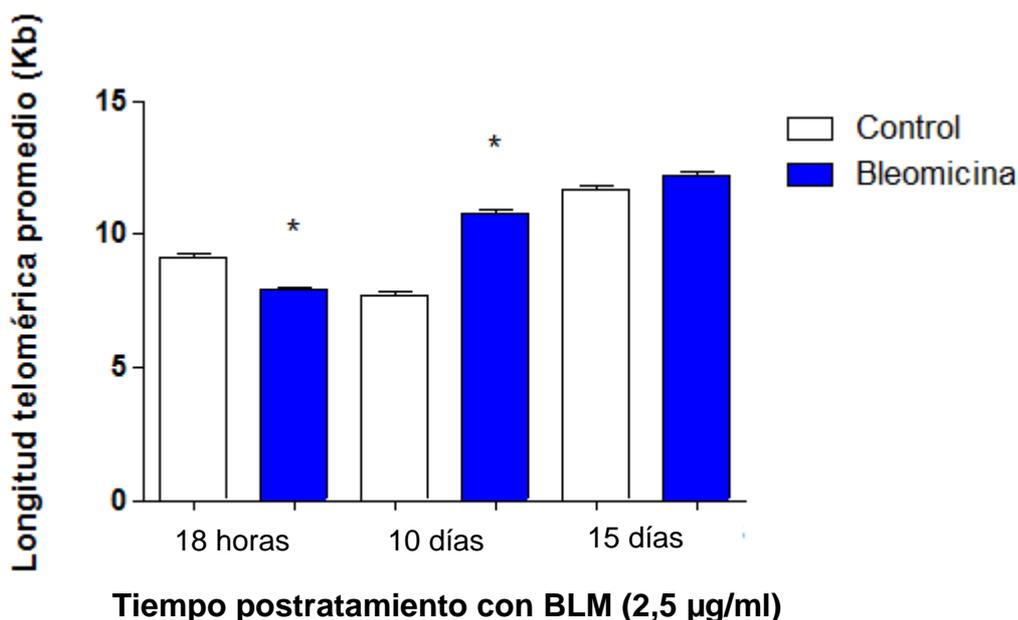
**Figura 22: Tel-Flow-FISH de células Jurkat de telómeros cortos (11,5 Kb). Se adquirieron un total de 5000 eventos (A-E).** (A) Identificación de las células Jurkat analizadas (R1), de acuerdo al tamaño celular (*forward scatter*, FSC) y a la complejidad citoplasmática (*side scatter*, SSC) en un *dot plot*. Se analizaron un total de 1158 eventos (R1). (B) Células Jurkat que hibridaron con la sonda FITC (R2). El resto de las células corresponden a aquellas células Jurkat sobre las cuales se realizó el mismo procedimiento de Flow-FISH pero sin sonda PNA-FITC en el *buffer* de hibridación. La señal de fluorescencia emitida por las células que hibridaron con la sonda telomérica es mayor que la autofluorescencia de las muestras, las cuales fueron procesadas únicamente con el *buffer* de hibridación sin la sonda. (C-D) Células Jurkat en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. (E) Histograma de fluorescencia de la población de células Jurkat analizada con y sin sonda telomérica (autofluorescencia). Las medias registradas para las células sin y con sonda fueron de 139,53 (M1) y de 340,52 (M2) respectivamente, indicando que hubo hibridación telomérica.

### 5.5.2 Determinación del efecto a largo plazo de la BLM sobre la longitud telomérica en células ADIPO-P2

Se determinó la longitud de las secuencias teloméricas de los cromosomas en aquellas células ADIPO-P2 que sobrevivieron a la exposición con 2,5 µg/ml de BLM, en la primera división mitótica. Los datos obtenidos a las 18 horas luego del tratamiento, señalan que la exposición a BLM indujo una disminución significativa en la longitud total (Kb) de los telómeros de las células tratadas en relación con los cultivos celulares que no fueron expuestos al mutágeno (Figura 23 y Figura complementaria 1 A-D del Anexo I de Resultados).

Los datos registrados por Tel-Flow-FISH indican el acortamiento de la longitud total de los telómeros a las 18 horas postratamiento respecto a las células control sin tratamiento (Figura 23 y Figura complementaria 2 A-D del Anexo I de Resultados).

Por otro lado, las mediciones de las longitudes teloméricas promedio (Kb) realizadas a largo plazo (15 días) luego del tratamiento con BLM (12,21 Kb), no mostraron diferencias con respecto a las células no expuestas (11,65 Kb).



**Figura 23: Longitud telomérica promedio (Kb) de células ADIPO-P2 en función del tiempo postratamiento con BLM (2,5 µg/ml).** Los datos obtenidos representan el promedio de la longitud telomérica total de cada muestra en relación a cada uno de los controles estándar utilizados. (\*) ANOVA ( $p < 0,05$ ).

### 5.5.3 Determinación del efecto a largo plazo de la EN sobre la longitud telomérica en células ADIPO-P2

La longitud promedio total (Kb) de las secuencias teloméricas de los cromosomas de las células ADIPO-P2 expuestas a 100 ng/ml de EN (sacrificadas a las 18 horas luego del tratamiento), fue significativamente menor que la longitud de los telómeros de aquellos cultivos celulares controles que no fueron expuestos al mutágeno (Figura 24 y Figuras complementarias 1 A-B y E-F del Anexo I de Resultados). El Tel-Flow-FISH realizado sobre las muestras que fueron sacrificadas a los 10 días luego del tratamiento con EN, reveló que hubo un aumento en la cantidad de repetidos teloméricos en las células expuestas al mutágeno (Figura 24 y Figuras complementarias 2 A-B y E-F del Anexo I de Resultados). A los 15 días postratamiento, no se produjo ningún efecto significativo de la EN sobre la longitud telomérica. Las mediciones teloméricas realizadas a largo plazo (15 días) no resultaron significativas en relación a los cultivos de células control (Figura 24 y Figuras complementarias 3 A-B y E-F del Anexo I de Resultados).

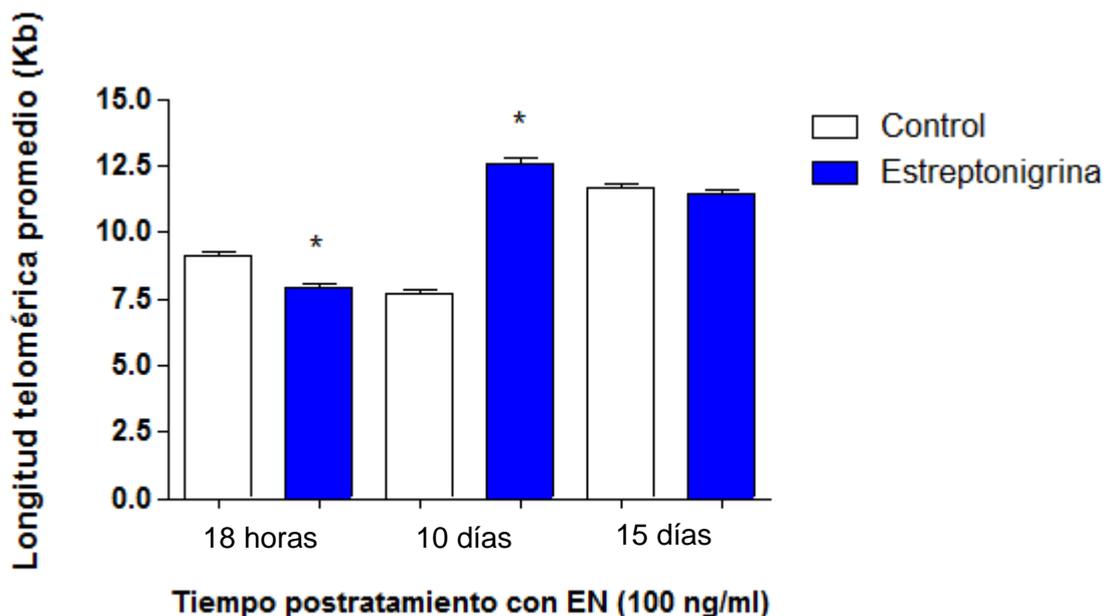


Figura 24: Longitud telomérica promedio (Kb) de células ADIPO-P2 en función del tiempo postratamiento con EN (100 ng/ml). Los datos obtenidos representan el promedio de la longitud telomérica total de cada muestra en relación a cada uno de los controles estándar utilizados. (\*) ANOVA ( $p < 0,05$ ).

#### 5.5.4 Determinación del efecto a largo plazo de la EZ sobre la longitud telomérica en células ADIPO-P2

Se obtuvieron las longitudes teloméricas promedio (Kb) a través de Tel-Flow-FISH sobre las células tratadas con 2 mM de EZ y aquellos cultivos tratados únicamente con el *buffer* de citrato de sodio 0,02 N (solvente de la EZ), que se utilizó como control negativo para descartar la inducción de aberraciones cromosómicas por parte del *buffer*. Si bien las mediciones obtenidas a las 18 horas luego del tratamiento indican que hubo una diferencia significativa entre las células tratadas con el *buffer* citrato de sodio y las células control (sin exposición), se indujo un mayor aumento en el número de repeticiones teloméricas en las células expuestas a EZ y este efecto se mantuvo hasta los 10 días después del tratamiento (Figura 25 y Figuras complementarias 4-5, A-F del Anexo I de Resultados). Los datos obtenidos a largo plazo (15 días) mostraron una disminución en la longitud telomérica en las células tratadas con el mutágeno ( $p < 0,05$ ). (Figura 25 y Figuras complementarias 6 A-F del Anexo I de Resultados).

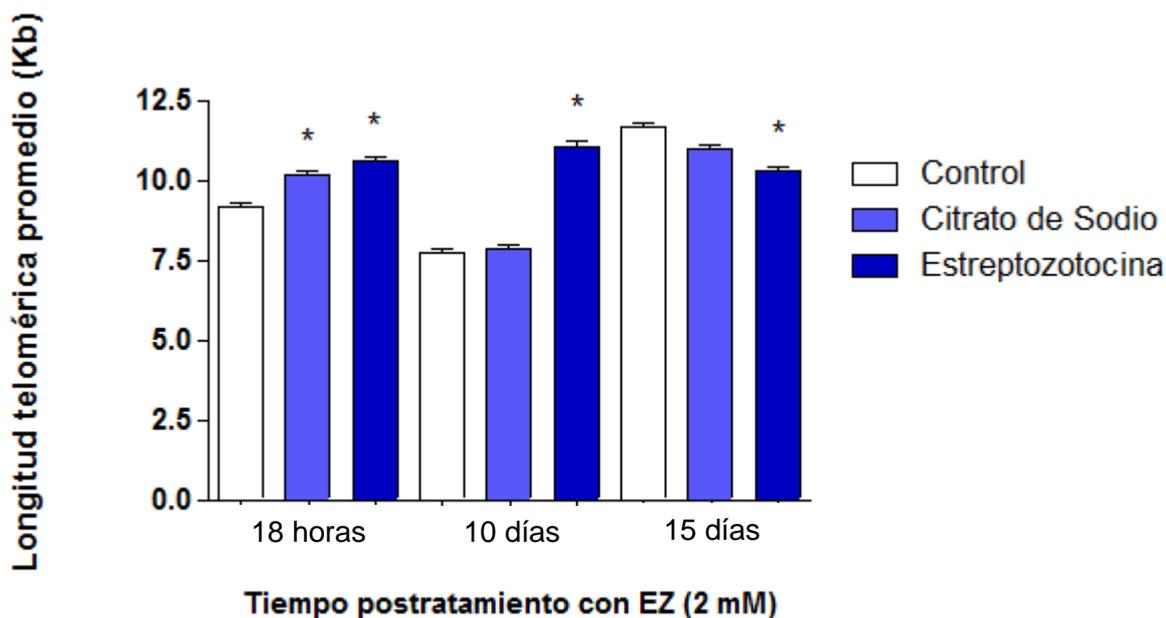


Figura 25: Longitud telomérica promedio (Kb) de células ADIPO-P2 en función del tiempo postratamiento con EZ (2 mM) y Citrato de Sodio (0,02 N). Los datos obtenidos representan el promedio de la longitud telomérica total de cada muestra en relación a cada uno de los controles estándar utilizados. (\*) ANOVA ( $p < 0,05$ ).

## **5.6 Detección de la actividad de la enzima telomerasa a corto y largo plazo en células de mamífero ADIPO-P2 expuestas a BLM, EN y EZ y sacrificadas a diferentes tiempos postratamiento.**

### **5.6.1 Efecto retardado de la BLM (2,5 µg/ml) sobre la actividad telomérica en células ADIPO-P2**

La actividad media de la telomerasa disminuyó un 15% en las células expuestas al mutágeno, a las 18 horas postratamiento, en relación con aquellas células que no habían sido tratadas con BLM, aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa y además no se observaron cambios en la viabilidad celular (Figura 11 A). Asimismo, se registró un aumento significativo de la actividad de la enzima (63%) a los 10 días en aquellas células expuestas, respecto de las células control (Figura 26). La disminución en la actividad de la enzima telomerasa que ocurre en la primera división mitótica en las células tratadas con BLM, se correlaciona con la pérdida de repetidos teloméricos registrados a las 18 horas postratamiento con el mutágeno (ver sección 5.5.2 de Resultados). Del mismo modo, la inducción significativa de la actividad telomérica que se observó a los 10 días postratamiento, está relacionada con el aumento en la cantidad de repetidos teloméricos observado en los cromosomas de las células ADIPO-P2 expuestas a BLM, en relación con las células control 10 días después de la exposición (Figura 23 y Figura complementaria 2 A-D); (ver sección 5.5.2).

Por otro lado, a los 15 días con posterioridad al tratamiento con el mutágeno, la actividad de la enzima decreció un 84% respecto a la de los cultivos controles (Figura 26). Al disminuir la acción de la enzima (ver sección 5.6.1), las longitudes promedio encontradas a los 15 días en las células tratadas con BLM, resultaron semejantes a las longitudes teloméricas de las células control (Figura 23 y Figuras complementarias 3 A-D del Anexo I de Resultados). Asimismo, la inducción retardada de la actividad de la enzima telomerasa registrada a los 10 días postratamiento, se podría asociar a la alta capacidad de proliferación celular de células que han logrado saltarse el proceso de apoptosis celular, para contrarrestar el acortamiento telomérico registrado en la primera división mitótica (Sección 5.5.2 de Resultados de la presente Tesis Doctoral); (Figura 26).

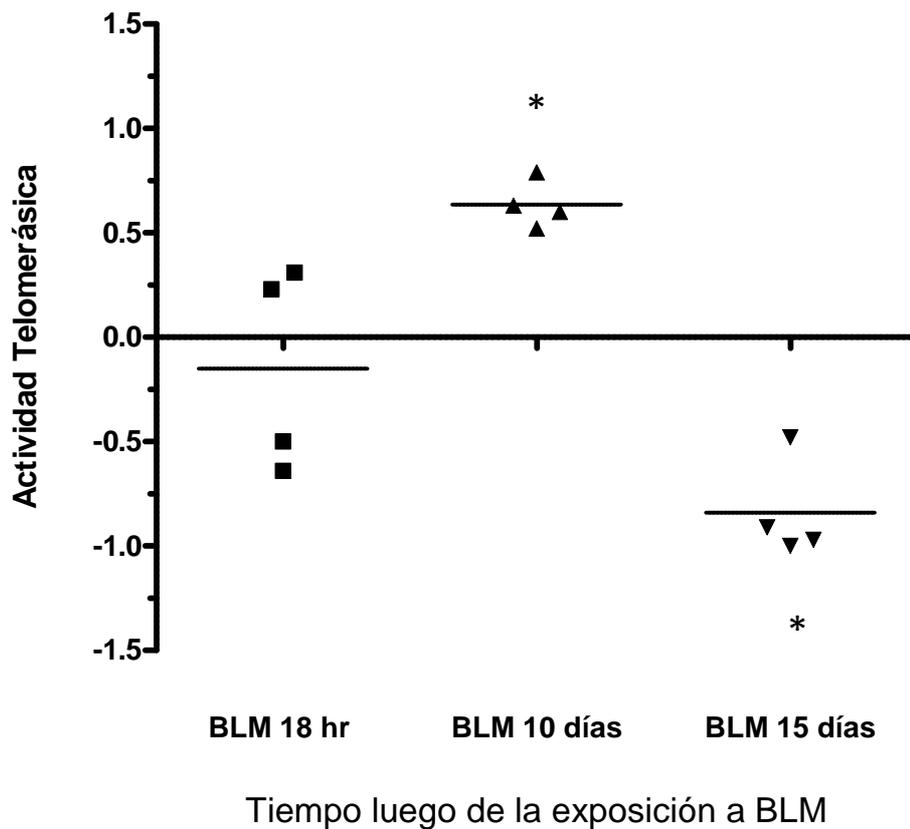
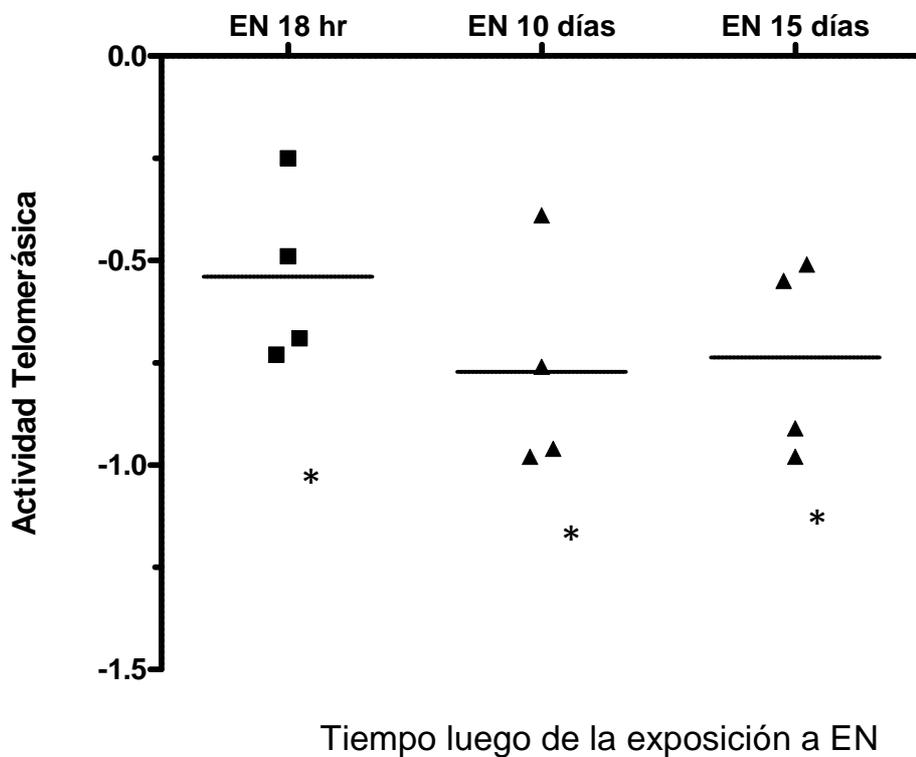


Figura 26: Efecto de la BLM (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) sobre la actividad telomerásica en células ADIPO-P2. Cada punto representa una comparación independiente entre las células tratadas con BLM y las células control. (\*) Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 5.6.2 Inhibición de la actividad de la enzima telomerasa luego del tratamiento de las células ADIPO-P2 con EN (100 ng/ml)

La figura 27 muestra los niveles de actividad de la telomerasa encontrados en aquellas células que fueron expuestas a 100 ng/ml de EN en relación con la actividad telomerásica registrada en células control en cada tiempo postratamiento estudiado. En todos los casos se observó una disminución substancial de la actividad en las células tratadas con EN con una media de 54, 77 y 74% a las 18 horas, 10 y 15 días postratamiento, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, el análisis estadístico de los datos demostró que los niveles de telomerasa obtenidos en las células tratadas no difería en forma significativa entre los diferentes tiempos postratamiento analizados

( $p > 0,05$ ); (Figura 27). Los resultados del análisis de la actividad de la enzima telomerasa en las muestras expuestas a EN sugieren la inhibición de dicha enzima como resultado del tratamiento con el mutágeno. Esto indicaría que la disminución en la actividad telomerasica de las células ADIPO-P2 no dependería del tiempo postratamiento transcurrido. Esto no se correlaciona con los datos obtenidos en las mediciones de longitud telomérica, en donde se observó una disminución en la cantidad de repetidos teloméricos a las 18 horas postratamiento y una posterior inducción en la longitud de los mismos a los 10 días luego del tratamiento en relación a las células control (ver sección 5.5.3 de Resultados).



**Figura 27: Efecto de la EN (100 ng/ml) sobre la actividad telomerasica en células ADIPO-P2. Cada punto representa una comparación independiente entre las células tratadas con EN y las células control. \* $p < 0.05$ .**

### 5.6.3 Efecto de la EZ (2 mM) sobre la actividad de la enzima telomerasa en células ADIPO-P2

En este caso la actividad de la telomerasa fue detectada utilizando el *kit* TRAPeze de detección de la telomerasa (S7700) (ver sección 4.1.3 de Materiales y

Métodos). Este ensayo tiene un rango lineal de 1 a 300 unidades de TPG (*Total Product Generated*), que es equivalente a la actividad de la telomerasa de aproximadamente 30 a 10000 células control, incluidas en el *kit*. Por lo tanto, aquellas muestras en las que se obtuvo un valor de TPG por fuera del rango lineal mencionado anteriormente (TPG<1-300), fueron consideradas con una actividad telomérica menor a las células utilizadas como control positivo en las reacciones de PCR.

La tabla 12 señala que la actividad telomérica tanto de las células no expuestas a 2 mM de EZ, como las células tratadas con citrato de sodio 0,02 N y sacrificadas 18 horas después, se mantiene en el rango normal de TPG (1 a 300 TPG), que es equivalente a la actividad telomérica de aproximadamente 30 a 10000 células control. Sin embargo, en las muestras tratadas con 2 mM de EZ y sacrificadas a las 18 horas luego del tratamiento, se registró un TPG por fuera de este rango, siendo la actividad de la telomerasa menor a la de las células control (TPG<1-300). Esto sugiere que la EZ indujo una disminución de la actividad de la enzima, en relación a las células que no fueron expuestas al mutágeno, cuyo valor promedio de TPG (6,43), se encuentra dentro del rango normal equivalente a la actividad de las células control (1 a 300 TPG).

Por otro lado, no se observaron diferencias en la actividad de la enzima en las células tratadas con 2 mM de EZ y sacrificadas a los 10 días postratamiento con el mutágeno con respecto a los controles, tanto de células no expuestas a EZ como el control negativo de células tratadas con citrato de sodio 0,02 N. En todos los casos, el TPG promedio calculado se registró por fuera del rango lineal de 1 a 300 TPG (Tabla 12), indicando una actividad telomérica baja con respecto a las células control incluidas en el *kit* (TPG<1-300). Esta tendencia también se observa en aquellas células tratadas con EZ y sacrificadas a los 15 días postratamiento con el mutágeno. En este caso, la actividad de la enzima también se encontró por debajo del rango lineal de TPG (TPG< 1-300); siendo los valores de TPG promedio registrados para aquellas muestras expuestas a 2 mM de EZ (-0,056) y para los controles sin exponer al mutágeno y el control negativo tratado con citrato de sodio 0,02 N de (-0,682 y -0,871, respectivamente). Asimismo, en los ensayos realizados para detectar la actividad telomérica en muestras tratadas con 2 mM de EZ, se incluyó una muestra de la línea celular de osteosarcoma, Saos-2 como indicador del nivel de actividad detectado. Se conoce que esta línea celular exhibe una actividad telomérica extremadamente baja y una expresión marginal de los genes h TERT y h TR, integrantes del complejo telomerasa [111], [112] [113]. Sin embargo, mantiene la

longitud de sus telómeros mediante el mecanismo alternativo de elongación, conocido como ALT (*Alternative Telomere Lengthening*) [114], [115]. La línea celular Saos-2 presenta telómeros de longitud heterogénea de 2-23kb, siendo la mayor señal de hibridación detectada aquella correspondiente a los 23 kb [111]. En este último caso, el valor de TPG promedio obtenido para las muestras Saos-2 fue de 1,84, señalando una actividad que, si bien se encuentra dentro del rango lineal correspondiente a las células control del *kit*, es extremadamente baja, al igual que los valores promedio de TPG obtenidos en las muestras analizadas en los diferentes tiempos postratamiento.

<b>Muestras analizadas</b>	<b>TPG promedio</b>
<b>Control 18 horas</b>	6,433
<b>Control con Citrato de Sodio 18 horas</b>	2,576
<b>EZ (2 Mm) 18 horas</b>	-2,362
<b>Control 10 días</b>	-1,799
<b>Control con Citrato de Sodio 10 días</b>	-2,32
<b>EZ (2 Mm) 10 días</b>	-17,557
<b>Control 15 días</b>	-0,682
<b>Control con Citrato de Sodio 15 días</b>	-0,871
<b>EZ (2 Mm) 15 días</b>	-0,056
<b>Saos-2</b>	1,84

**Tabla 12: TPG (*Total Product Generated*) promedios obtenidos en los ensayos de determinación de la actividad de la telomerasa utilizando el *kit* TRAPeZe s7700. El TPG promedio fue calculado a partir de dos experimentos independientes según lo descrito en la sección 4.1.3 de Materiales y Métodos.**

## **5.7 Estudios de inestabilidad telomérica a nivel molecular en un modelo *in vivo* de melanoma murino**

### **5.7.1 Evaluación de la expresión de genes vinculados al complejo telomérico mediante PCR (qPCR) en tiempo real**

Para determinar si el desarrollo tumoral *in vivo* está relacionado con alteraciones en los niveles de expresión de los genes ligados al mantenimiento telomérico, se realizó el análisis transcripcional de los 6 genes que codifican a las proteínas que forman parte del complejo telomérico shelterina (trf1, trf2, pot1a, tpp1, tin2 y rap1) en un modelo experimental de inducción tumoral *in vivo* de melanoma murino. La selección de genes a estudiar, vinculados al complejo shelterina, se realizó según la bibliografía existente sobre el tema. Para el análisis, se emplearon como controles animales inoculados con medio de cultivo D-MEM y el tejido hepático y esplénico de animales inoculados con la línea tumoral B16 de melanoma (cuyos tejidos hepático y esplénico no fueron afectados por metástasis). Se emplearon hígado y bazo debido a que se sabe que el perfil de expresión de estos genes se encuentra disminuido en hígado y sobre-expresado en bazo [116]. Asimismo, se determinó el patrón de expresión del tejido tumoral de melanoma en referencia a tejido de piel extraído de animales sanos sin inocular.

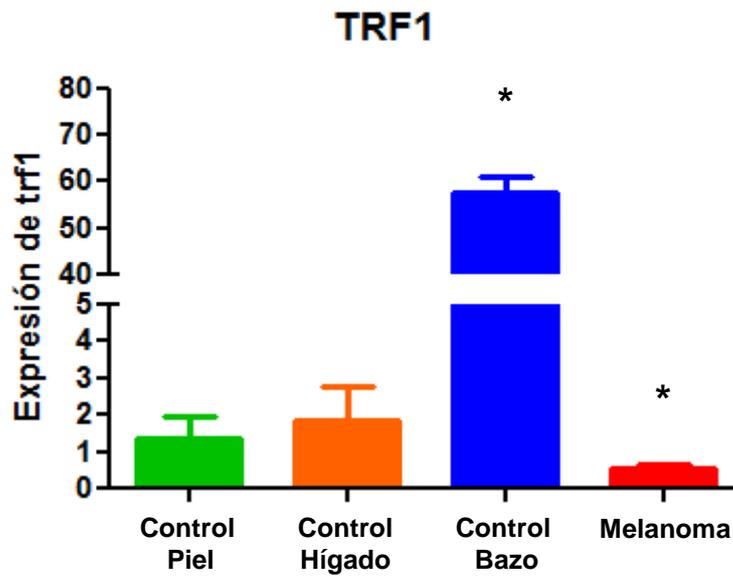
La eficiencia de amplificación de los *primers*, del gen de referencia GAPDH (Forward/Reverse) y de los *primers* de los genes trf1, trf2, pot1a, tpp1, tin2 y rap1 (Forward/Reverse) se mantuvo en todos los casos entre el 90 y el 110%.

#### **5.7.1.1 Variación en el patrón de expresión de los genes trf 1 y trf2 en tejido de melanoma murino**

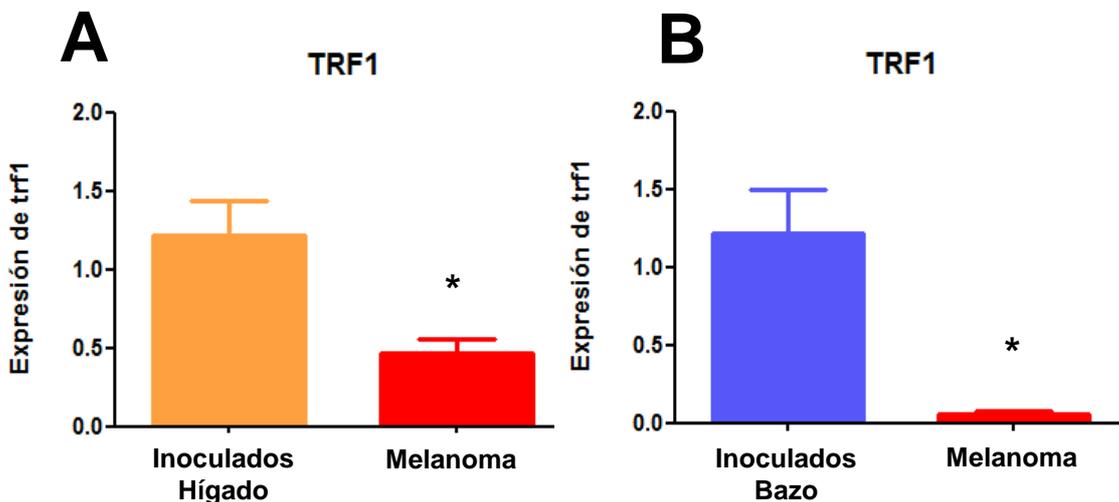
Para estudiar el comportamiento de estos genes en tejido de melanoma murino, se cuantificó la expresión de los mismos a través de qPCR, utilizando GAPDH como gen de referencia. El análisis de los datos se realizó siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [105]. Los niveles de expresión de trf1 y trf2 en los tejidos hepático, esplénico y de piel en animales inoculados y normales fueron comparados en cada caso con el tejido tumoral de melanoma utilizando el test t de Student (Figuras 28 y 31). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a aquellos valores de  $p < 0,05$ . Se encontró que existe una disminución substancial en el patrón transcripcional del gen trf1 en

tejido de melanoma en relación a la expresión del mismo en tejido normal de piel de ratón (Figura 28). Asimismo, los niveles de expresión encontrados en hígado y bazo en los animales inoculados con la línea tumoral B16 de melanoma murino se corresponden con lo informado en la bibliografía [116]. El bazo de *Mus musculus* es uno de los tejidos que expresa normalmente altos niveles de trf1 y trf2. Por el contrario, en el hígado los niveles de trf1 y trf2 son normalmente bajos [116]. Nuestros resultados indican que los niveles de expresión registrados en hígado en animales inoculados no mostraron diferencias significativas en comparación con los mismos tejidos extraídos de ratones normales y melanoma (Figura 30 A). Sin embargo, se observó una disminución significativa en la actividad transcripcional de trf1 en tejido esplénico en aquellos animales que fueron inoculados con B16, respecto del bazo de animales control. De la misma forma, la expresión de trf1 en melanoma fue significativamente menor que en tejido esplénico de animales normales (Figura 30 B). Asimismo, los resultados obtenidos de las muestras de tejido tumoral analizadas para trf1 demostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) cuando se las comparó directamente con aquellos datos obtenidos en tejido hepático y esplénico de animales inoculados con B16, pero que no desarrollaron el tumor (Figuras 29 A-B) [117].

Por otro lado, no se registraron diferencias significativas en el patrón de expresión de trf2 entre las muestras de tejido hepático y esplénico de animales inoculados con la línea B16 y los mismos tejidos de animales normales (Figura 33 A-B). Del mismo modo, solo se determinó una disminución en la expresión de trf2 en las muestras de melanoma, cuando se las comparó directamente con aquellas muestras de bazo obtenidas de animales inoculados con B16, pero que no desarrollaron tumor (Figura 32 A-B). Asimismo, a diferencia de lo que ocurrió con trf1 (Figura 28), los niveles transcripcionales de trf2 no mostraron diferencias significativas entre las muestras tumorales de melanoma y las de piel normal (Figura 31).



**Figura 28: Expresión de trf1 en muestras control de piel, hígado, bazo y melanoma murino.** Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de piel de animales control sin inocular, siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [105]. (\*) Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de trf1 entre los ratones que desarrollaron un tumor luego de que fueron inoculados con la línea B16 y los tejidos de animales controles hígado, bazo y piel normal ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,0001$ ; y  $p < 0,05$ ) respectivamente.



**Figura 29: Comparación de la expresión de trf1 en tejido hepático (A) y esplénico (B) de animales inoculados y en tumores de ratones luego de haber sido inoculados con la línea B16.** Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de animales inoculados con la línea B16. (\*) (A)  $p < 0,01$  y (B)  $p < 0,0001$ .

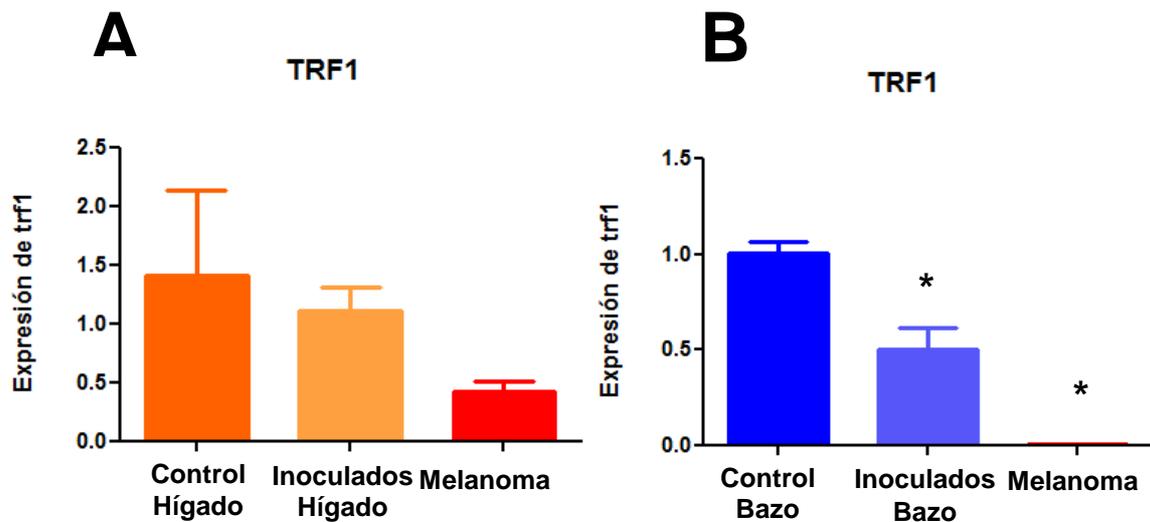


Figura 30: Expresión del gen *trf1* del complejo shelterina en muestras de animales control, de hígado y bazo de animales inoculados con la línea tumoral B16 y de melanoma (A) No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de *trf1* entre los animales control, los ratones que fueron inoculados con la línea B16 y las muestras tumorales ( $p > 0,05$ ). (B) Los niveles de expresión de *trf1* en bazo de animales inoculados fueron significativamente menores que en tejido esplénico de animales normales. La expresión de *trf1* en melanoma fue significativamente menor que en tejido esplénico de animales normales ( $p < 0,0001$ ).

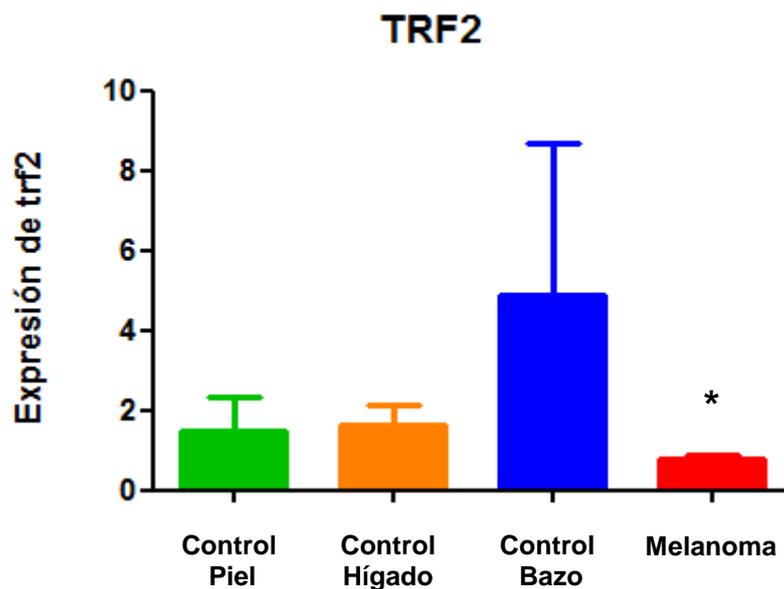
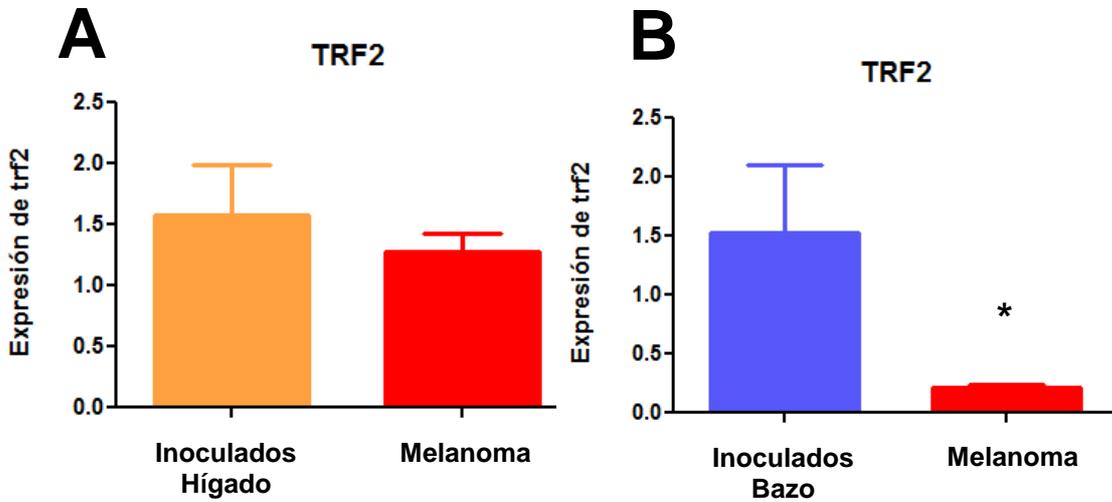
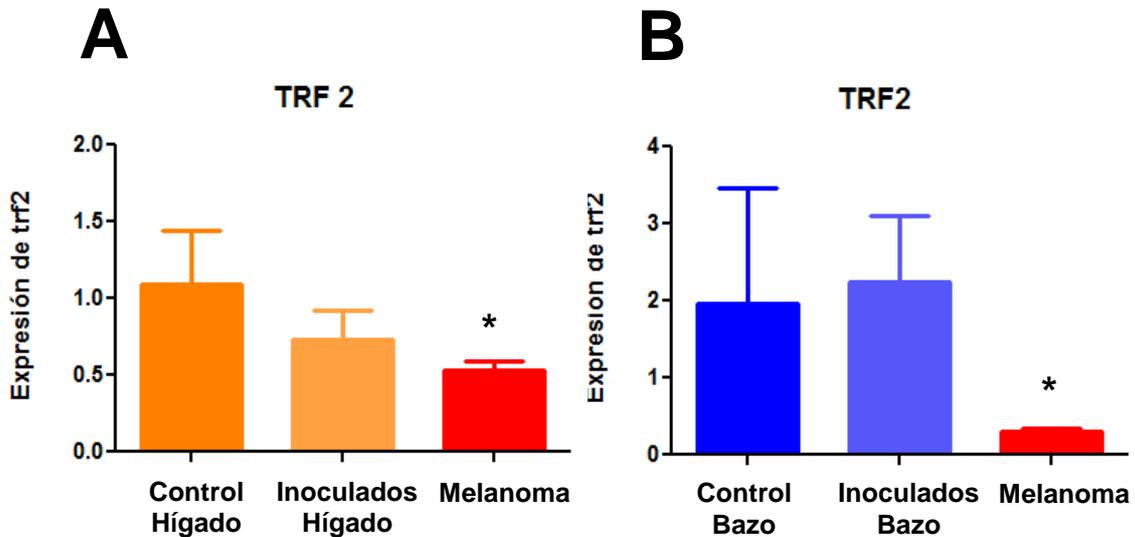


Figura 31: Expresión de *trf2* en muestras control de piel, hígado, bazo y melanoma. Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de piel de animales control sin inocular, siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [105]. No existen diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de *trf2* entre los diferentes tejidos de

animales controles ( $p > 0.05$ ). (\*) Se registraron diferencias entre las muestras de melanoma y los controles de hígado y bazo ( $p < 0,05$  y  $p < 0,05$ , respectivamente).



**Figura 32:** Comparación de la expresión de trf2 en tejido hepático (A) y esplénico (B) de animales inoculados y en tumores de ratones luego de haber sido inoculados con la línea B16. Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de animales inoculados con la línea B16. (\*) (B)  $p < 0,01$ .

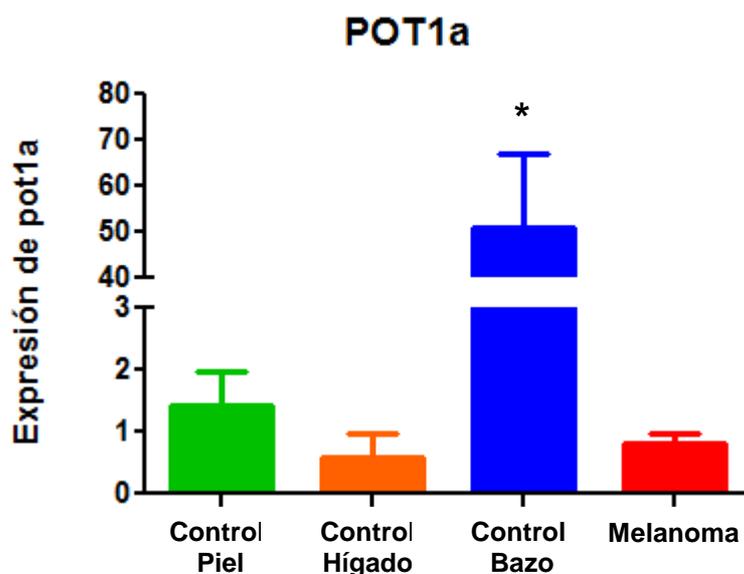


**Figura 33:** Expresión del gen trf2 del complejo shelterina en muestras de animales control, de hígado y bazo de animales inoculados con la línea tumoral B16 y de melanoma (A) No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de trf2 entre los animales control, los ratones que fueron inoculados con la línea B16. La expresión de trf2 en las muestras tumorales fue significativamente menor que en el tejido hepático de animales normales ( $p < 0,05$ ). (B). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de trf2 entre los animales control y los ratones que fueron inoculados con la línea B16 ( $p > 0,05$ ). La expresión de trf2 en melanoma fue significativamente menor que en tejido esplénico de animales normales sin inocular ( $p < 0,05$ ).

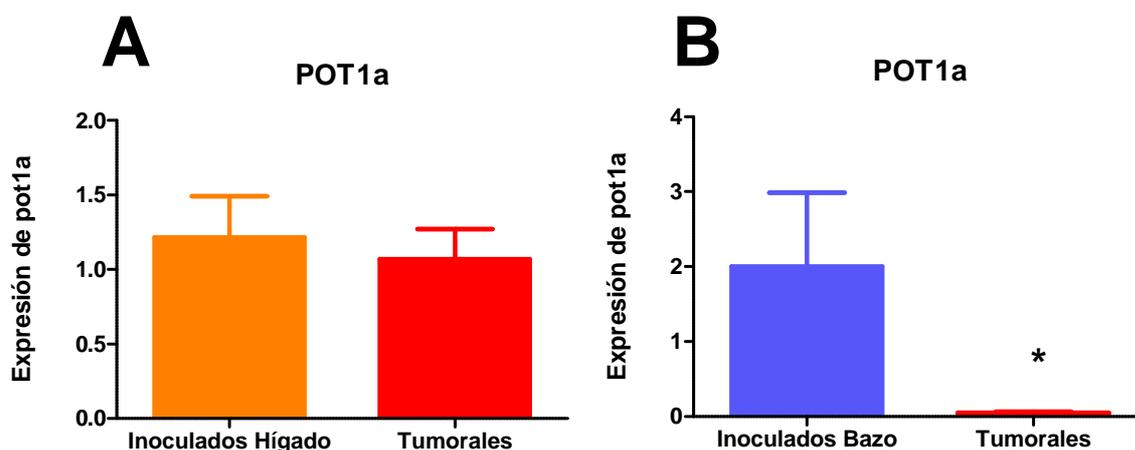
### 5.7.1.2 Patrón de expresión de los genes *pot1a*, *tpp1* y *tin2* en tejido de melanoma murino.

Dado que POT1 fue el primer componente del complejo telomérico shelterina que se encontró mutado en cánceres humanos [118], se decidió realizar el estudio del patrón de expresión de *pot1* en tejido de melanoma murino. En ratones, existen dos tipos de proteínas parálogas POT1 (POT1a y POT1b). No se han encontrado diferencias funcionales entre *pot1a* y *pot1b* [38], [39], [119], [120] [121]. Los resultados del patrón de expresión de *pot1a*, indican que no existen alteraciones significativas en el comportamiento del mismo en melanoma, en relación a la expresión del mismo en tejido normal de piel de ratón (Figura 34).

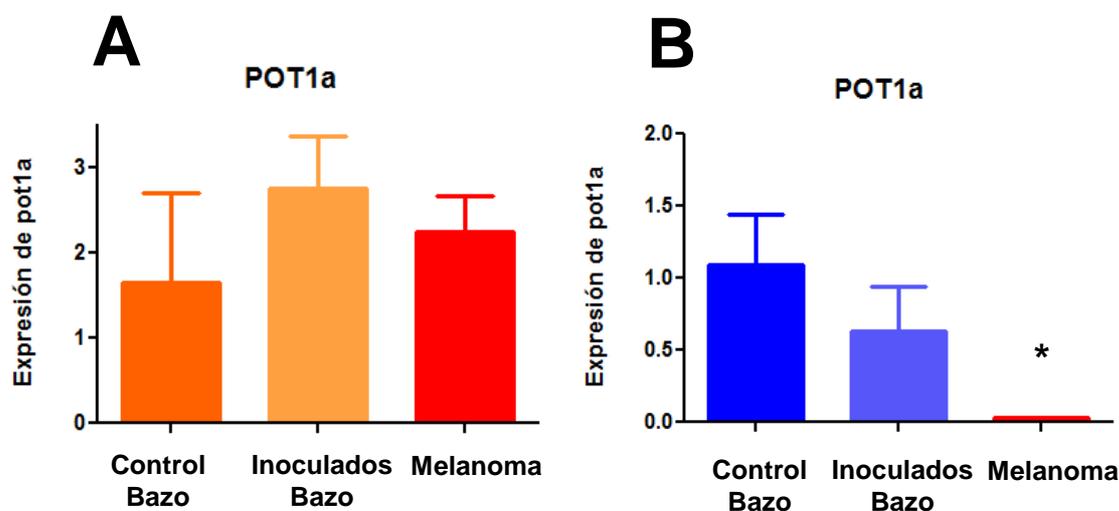
Por otro lado, los niveles de expresión encontrados en hígado y bazo en los animales inoculados con la línea tumoral B16 de melanoma murino se corresponden con lo informado en la bibliografía [116]. El bazo de *Mus musculus* es uno de los tejidos que expresa normalmente altos niveles de *pot1a* y *pot1b*, al igual que lo que ocurre con los genes *trf1* y *trf2*. Por el contrario, en el hígado los niveles de *pot1a* y *pot1b* son normalmente bajos [116]. Asimismo, los niveles de expresión obtenidos, tanto en bazo como en hígado en animales inoculados con B16 no mostraron diferencias significativas en comparación con los mismos tejidos extraídos de ratones normales (Figura 36 A-B). Estos datos indican que la expresión de *pot1a* en bazo e hígado no se vio alterada en aquellos animales que fueron inoculados con la línea tumoral B16, ya que no se encontraron diferencias significativas en los patrones de expresión con respecto a ratones normales ( $p > 0,05$ ). En todos los casos, las muestras de tejidos provenientes de animales inoculados y las tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras del tejido control, siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [105]. Al igual que lo que ocurrió con *trf2* en hígado, la transcripción de *pot1a* en tejido tumoral de melanoma no mostró diferencias con respecto a la expresión de ese gen en el hígado de animales normales y de animales inoculados con B16 y solo se determinó una disminución en la expresión de *pot1a* en las muestras de melanoma, cuando se las comparó directamente con aquellas muestras de bazo obtenidas de animales inoculados con B16, pero que no desarrollaron tumor (Figuras 35 A-B y 36 A-B).



**Figura 34: Expresión de pot1a en muestras control de piel, hígado, bazo y melanoma.** Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de piel de animales control sin inocular, siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [105]. No existen diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de pot1a en el tejido de piel de animales controles y los ratones que desarrollaron un tumor luego de que fueron inoculados con la línea B16 ( $p > 0.05$ ). (\*) Diferencia significativa de la expresión de pot1a en tejido esplénico respecto al tejido hepático control, melanoma y de piel normal ( $p < 0,05$ ).



**Figura 35: Comparación de la expresión de pot1a en tejido hepático (A) y esplénico (B) de animales inoculados y en tumores de ratones luego de haber sido inoculados con la línea B16.** Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de animales inoculados con la línea B16. (\*). (B)  $p < 0,01$ .

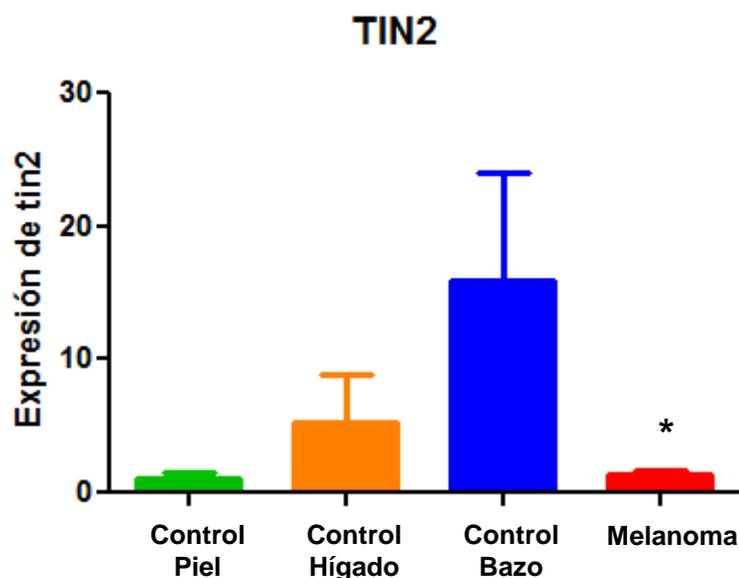


**Figura 36: Expresión del gen pot1a del complejo shelterina en muestras de animales control, hígado y bazo de animales inoculados con la línea tumoral B16 y de melanoma (A) No se encontraron diferencias significativas en el patrón de expresión de pot1a entre los animales control y los ratones que fueron inoculados con la línea B16. No se registraron diferencias significativas en estos tejidos con respecto a las muestras de melanoma ( $p > 0,05$ ). (B). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de pot1a entre los animales control y los ratones que fueron inoculados con la línea B16 ( $p > 0,05$ ). La expresión de pot1a en tejido tumoral fue significativamente menor que en tejido esplénico de animales normales sin inocular ( $p < 0,0001$ ).**

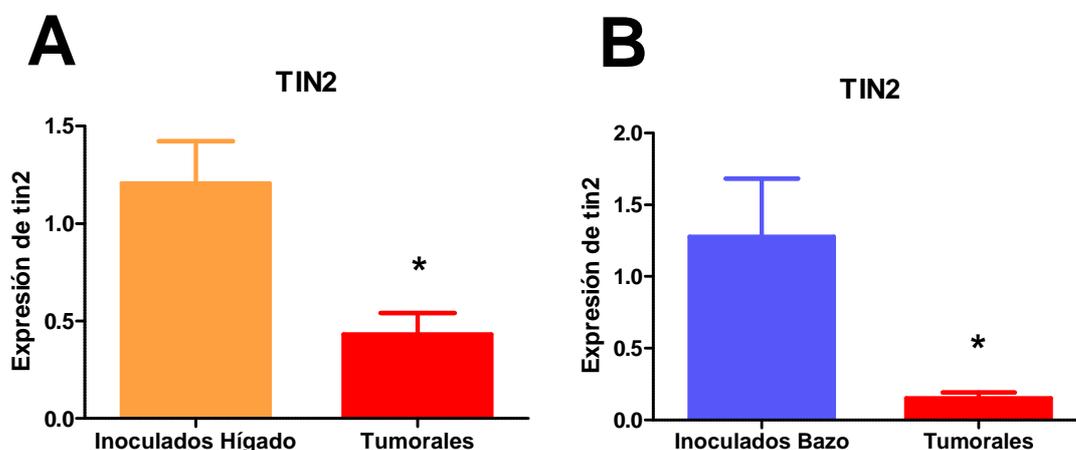
Teniendo en cuenta que en ratones no existen diferencias funcionales entre pot1a y pot1b (ambos actúan evitando las fusiones teloméricas) [41] y que los niveles de transcripción de pot1a en melanoma murino no resultaron significativos al compararlos con los de piel de ratones normales (Figura 34), se excluyó a pot1b del análisis transcripcional.

Por otra parte, se estudió el perfil de expresión de otros genes integrantes del complejo shelterina tales como tpp1 y tin2. Ambas proteínas interactúan en forma directa con trf1 y participan en el mecanismo de regulación de la elongación del telómero.

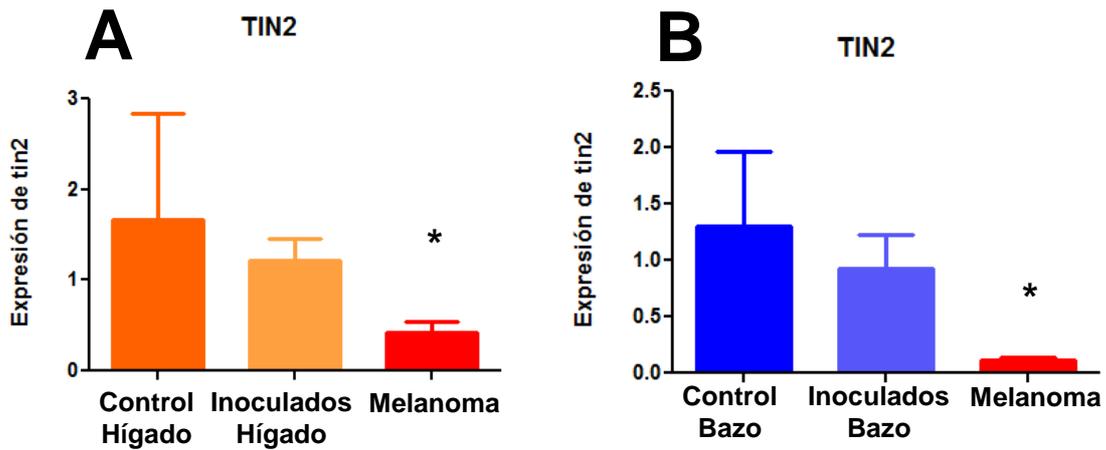
Los niveles de expresión obtenidos para el gen tin2 y tpp1 del complejo telomérico no se vieron alterados en melanoma de ratón (Figuras 37 y 40). Asimismo, los niveles de expresión de tin2 y tpp1 encontrados en hígado y bazo se corresponden con la bibliografía [116] (Figuras 38, 39, 41 y 42).



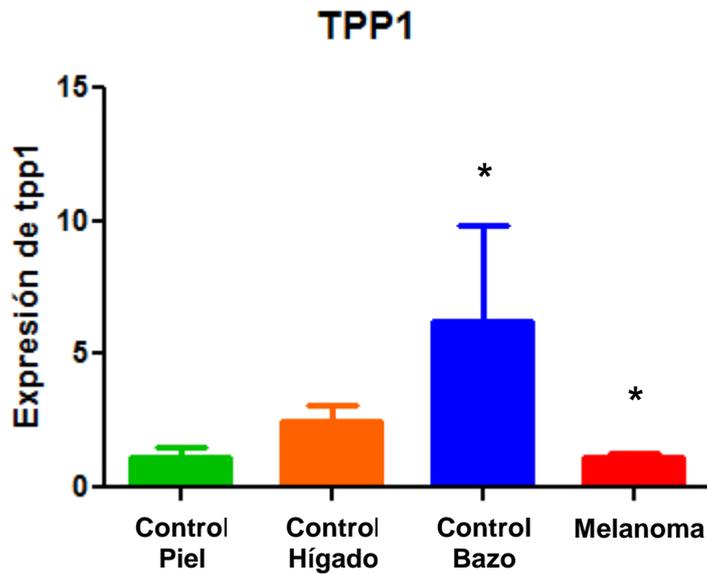
**Figura 37: Expresión de tin2 en muestras control de piel, hígado, bazo y melanoma.** Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de piel de animales control sin inocular, siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [105]. No existen diferencias significativas entre el tejido de piel normal y los animales que desarrollaron melanoma luego de haber sido inoculados con la línea B16 ( $p > 0,05$ ). (\*) Se registraron diferencias significativas entre las muestras de melanoma y los controles de hígado y bazo ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente).



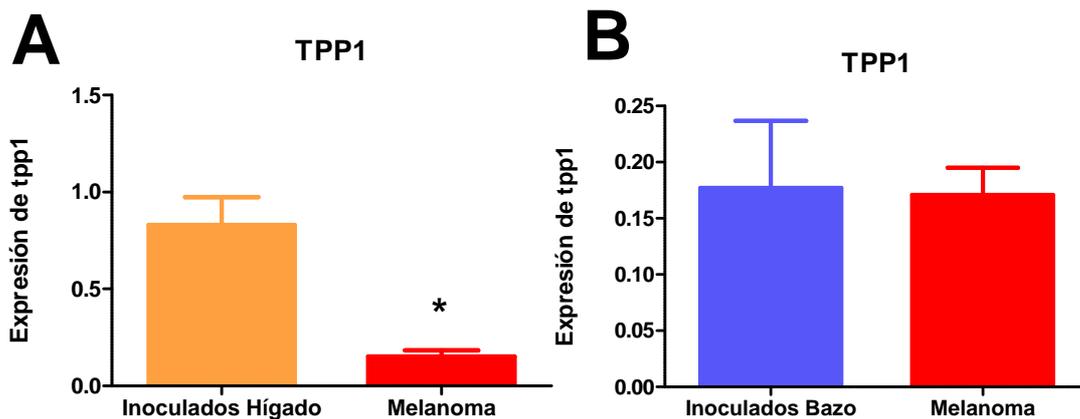
**Figura 38: Comparación de la expresión de tin2 en tejido hepático (A) y esplénico (B) de animales inoculados y en tumores de ratones luego de haber sido inoculados con la línea B16.** Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de animales inoculados con la línea B16. (\*) (A)  $p < 0,01$  y (B)  $p < 0,01$ .



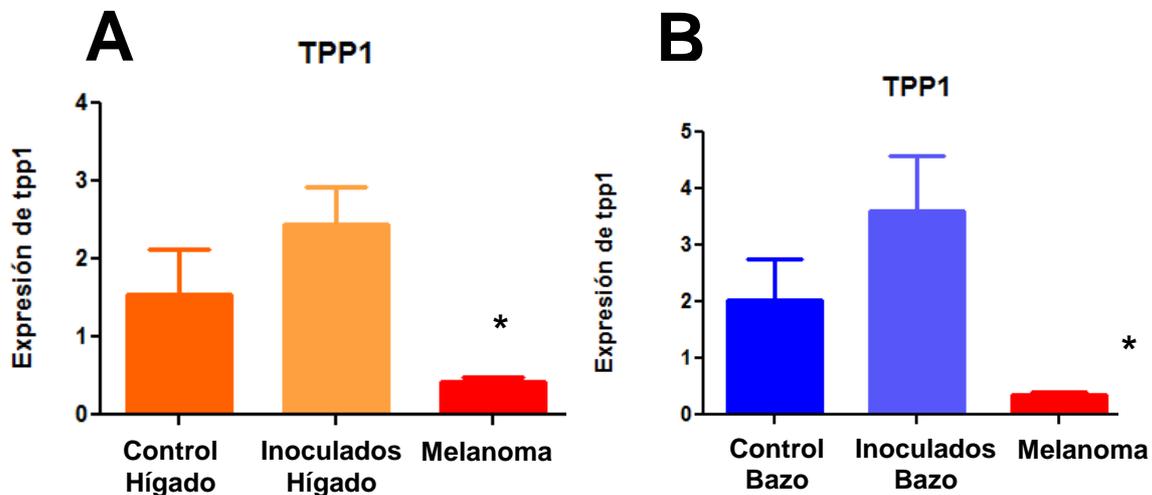
**Figura 39: Expresión del gen tin2 del complejo shelterina en muestras de animales control, de hígado y bazo de animales inoculados con la línea tumoral B16 y de melanoma (A)** No se encontraron diferencias significativas en el patrón de expresión de tin2 entre los animales control y los ratones que fueron inoculados con la línea B16. (\*) La expresión de tin2 en melanoma fue significativamente menor que en tejido hepático de animales controles e inoculados ( $p < 0,05$ ). **(B)**. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de tin2 entre los animales control y los ratones que fueron inoculados con la línea B16 ( $p > 0,05$ ). La expresión de tin2 en tejido tumoral fue significativamente menor que en tejido esplénico de animales normales y en bazo de animales inoculados ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ ) respectivamente.



**Figura 40: Expresión de tpp1 en muestras control de piel, hígado, bazo y melanoma.** Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de piel de animales control sin inocular, siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [105]. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de tpp1 entre tejido de piel animales controles y los ratones que desarrollaron un tumor luego de que fueron inoculados con la línea B16 ( $p > 0.05$ ). (\*) Se registraron diferencias entre las muestras de melanoma y los controles de hígado y bazo ( $p < 0,01$  y  $p < 0,01$ , respectivamente).



**Figura 41: Comparación de la expresión de tpp1 en tejido hepático (A) y esplénico (B) de animales inoculados y en tumores de ratones luego de haber sido inoculados con la línea B16.** Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de animales inoculados con la línea B16. (\*) (A)  $p < 0,0001$ .

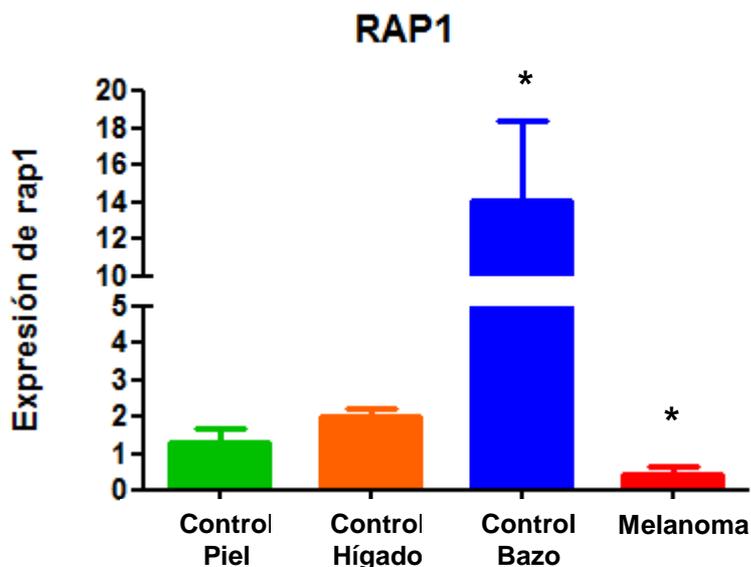


**Figura 42: Expresión del gen tpp1 del complejo shelterina en muestras de animales control, de hígado y bazo de animales inoculados con la línea tumoral B16 y de melanoma (A)** No se encontraron diferencias significativas en el patrón de expresión de tpp1 entre los animales control y los ratones que fueron inoculados con la línea B16. (\*) La expresión de tpp1 en melanoma fue significativamente menor que en tejido hepático de animales controles e inoculados ( $p < 0,05$ ). **(B)**. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de tpp1 entre los animales control y los ratones que fueron inoculados con la línea B16 ( $p > 0,05$ ). La expresión de tpp1 en tejido tumoral fue significativamente menor que en tejido esplénico de animales normales y en bazo de animales inoculados ( $p < 0,05$ ).

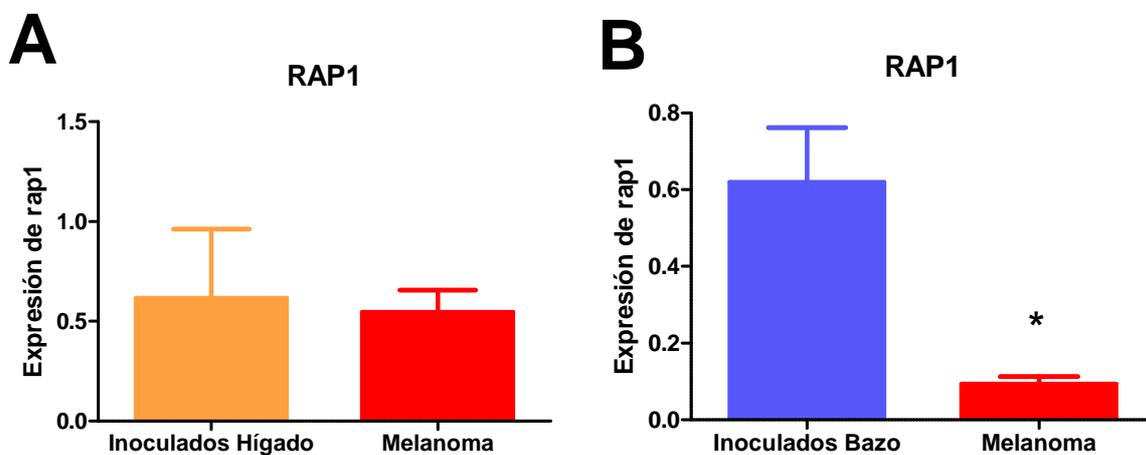
### 5.7.1.3 Patrón de expresión del gen rap1 en tejido de melanoma murino.

Teniendo en cuenta que en el epitelio estratificado de ratón la delección del gen rap1 no afecta la viabilidad del mismo y que en la adultez produce hiperpigmentación y favorece la presencia de telómeros cortos [122], también se estudiaron los niveles transcripcionales de este gen en melanoma murino (Figuras 43, 44 y 45).

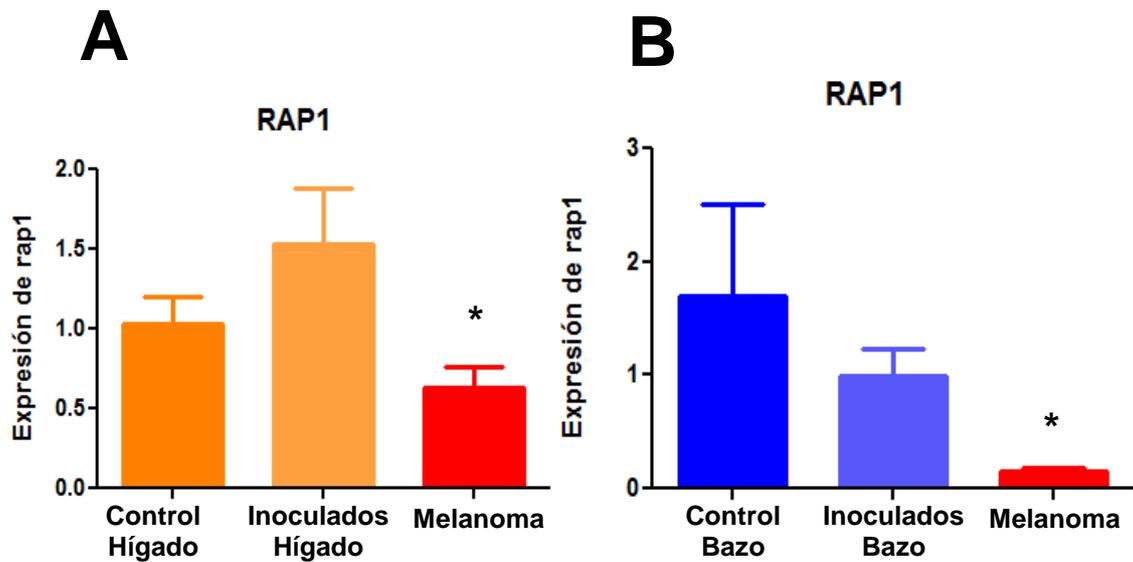
Los resultados del patrón de expresión de rap1 indican que existe una disminución significativa en el comportamiento de rap1 en melanoma, en relación a la expresión del mismo en tejido normal de piel de ratón (Figura 43).



**Figura 43: Expresión de rap1 en muestras control de piel, hígado, bazo y melanoma.** Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de piel de animales control sin inocular, siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001) [105]. (\*) Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de transcripción de rap1 entre los ratones que desarrollaron un tumor luego de que fueron inoculados con la línea B16 y los tejidos de animales controles hígado, bazo y piel normal ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,0001$ ; y  $p < 0,05$ ) respectivamente.



**Figura 44: Comparación de la expresión de rap1 en tejido hepático (A) y esplénico (B) de animales inoculados y en tumores de ratones luego de haber sido inoculados con la línea B16.** Las muestras tumorales fueron normalizadas respecto al promedio  $\Delta Ct$  de todas las muestras de animales inoculados con la línea B16. (\*) (B)  $p < 0,0001$ .



**Figura 45: Expresión del gen rap1 del complejo shelterina en muestras de animales control, de tejido hepático u esplénico en animales inoculados con la línea tumoral B16 y de melanoma (A)** No existen diferencias significativas en el patrón de expresión de rap1 entre los animales control y los ratones que fueron inoculados con la línea B16. (\*) La expresión de rap1 en melanoma fue significativamente menor que en tejido hepático de animales inoculados ( $p < 0,05$ ). **(B)**. No existen diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de rap1 entre los animales control y los ratones que fueron inoculados con la línea B16 ( $p > 0,05$ ). La expresión de rap1 en tejido tumoral fue significativamente menor que en tejido esplénico de animales normales y que en bazo de animales inoculados ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSIÓN

### 6. 1 Consideraciones generales

El estudio de los efectos a largo plazo de drogas antineoplásicas sobre los telómeros resulta fundamental para comprender la inestabilidad genómica asociada a regímenes quimioterapéuticos, ya que los telómeros juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica. Diversos estudios han demostrado que pacientes con cáncer bajo regímenes quimioterapéuticos poseen telómeros cortos en sus células sanguíneas, incluso luego de finalizar el tratamiento [123]. Estudios más recientes, indican que la disfunción telomérica promueve el desarrollo *in vivo* de tumores malignos en ratones [124].

Los agentes químicos que producen daño en el ADN, son aquellos que tienen una mayor efectividad como agentes antitumorales a nivel clínico. Dentro de este grupo, se encuentran los agentes alquilantes (como el cisplatino y la ciclofosfamida), los antimetabolitos (5-fluorouracilo), los inhibidores de la topoisomerasa II (etopósido), y los antibióticos citotóxicos (bleomicina) [125]. Existen diversos trabajos que demuestran que los agentes que ocasionan daño en el ADN afectan a la región telomérica. Así, por ejemplo, en la línea celular tumoral C18-4 de espermatogonias de ratón, el tratamiento con cisplastino produce el acortamiento telomérico y la inhibición de la telomerasa [125]; [126]. Asimismo, un estudio reciente demostró que otros agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina y el etopósido, así como la radiación ionizante, inducen inestabilidad telomérica a corto plazo en linfocitos T normales y en fibroblastos [127]. Consecuentemente, en las células tratadas con estos agentes se observó un acortamiento en la longitud telomérica y una disminución en la expresión de hTERT, y de las proteínas POT1 y TPP1. Esto sugiere que la exposición en forma repetida a quimio- y radioterapia puede llegar a desencadenar inestabilidad a nivel telomérico [127].

Finalmente, cabe citar trabajos previos realizados en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE en células de hamster chino y conejo, que demuestran que los compuestos BLM, EN y EZ inducen inestabilidad telomérica a corto plazo en forma de ECI, por rotura y pérdida de extremos cromosómicos [46], [47], [74], [92], [93].

En la presente Tesis Doctoral, se investigó si los mutágenos químicos son capaces de inducir a nivel citogenético y molecular inestabilidad telomérica en la progenie de células de mamífero, luego de varias generaciones de haber sido

expuestas a los mismos (efecto a largo plazo o residual). Para ello, se analizaron en primer término, aquellas aberraciones que involucran a los extremos cromosómicos (ECI) y a las secuencias teloméricas terminales propiamente dichas (disfunción telomérica) presentes en la progenie de células ADIPO-P2 expuestas a los antibióticos antitumorales bleomicina (BLM), estreptonigrina (EN) y estreptozotocina (EZ). Dicho análisis se llevó a cabo aplicando la técnica de PNA-FISH con sonda telomérica. Es importante destacar que el objetivo de este estudio fue realizar FISH específicamente telomérico para poder identificar a aquellas anomalías cromosómicas, que resultan de la inestabilidad telomérica presente en células ADIPO-P2 y que no pueden ser detectadas utilizando las técnicas de citogenética clásica o convencional [7]. Asimismo, se estudió la actividad de la enzima telomerasa y se determinó la longitud telomérica en dichas células expuestas a BLM, EN y EZ.

Por otro lado, se sabe que el mantenimiento de la estructura y función de los telómeros involucra a numerosas proteínas cuyas funciones se conocen parcialmente. Existen pocos trabajos acerca de la participación de proteínas teloméricas en la tumorigénesis [17], [20], [34], [36], [123]. Por ello, en segundo término, en este trabajo de Tesis Doctoral, se estudió el perfil de expresión de los genes integrantes del complejo shelterina en un modelo de melanoma murino, con el fin de detectar posibles alteraciones en la expresión de los genes ligados al mantenimiento telomérico. El análisis transcripcional de dichos genes permitió identificar una alteración en la expresión de 2 de ellos (*trf1* y *rap1*) en melanoma.

### **6.1.1 Análisis de la inestabilidad telomérica inducida por BLM**

En concordancia con observaciones previas realizadas en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE en células CHO (*Chinese Hamster Ovary Cells*) expuestas a BLM [107], el análisis del daño cromosómico total indicó que el efecto clastogénico de este compuesto en las células ADIPO-P2 se mantiene al menos hasta los 15 días con posterioridad al tratamiento. Asimismo, nuestros resultados revelaron un aumento significativo en la frecuencia de CI y FT en células expuestas a BLM, en relación a células control, sin tratamiento (Tablas 3 y 4), lo que coincide con lo observado en trabajos previos realizados en células de hámster chino [46], [93]. Además, se encontró que los FT constituyen los principales fragmentos acéntricos inducidos por BLM en células ADIPO-P2 (Tabla 4). Observaciones similares fueron realizadas en la línea celular CPC (Células de piel de Conejo Doméstico) [93]. Por el

contrario, se observó una elevada inducción de fragmentos intersticiales (FI) por la BLM en células CHE [46], [93] y en linfocitos humanos [48]. Por lo tanto, las diferencias en la frecuencia de fragmentos acéntricos (FA) inducidas por BLM dependen del tipo celular expuesto al antibiótico, ya que los distintos tipos de células estudiados exhiben diferente sensibilidad a la droga. Estas diferencias pueden atribuirse a variaciones en la absorción celular de la BLM, así como también a diferencias en la estructura de la cromatina o en la capacidad de reparación celular de las células expuestas al antibiótico [48]. Es importante señalar que la frecuencia observada de CI en células control de la línea ADIPO-P2 fue igual o incluso menor que las encontradas en otras líneas celulares de mamíferos que fueron investigadas previamente en relación a su inestabilidad telomérica [46], [47], [92], [93]. De este modo, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos previamente en otras líneas celulares de mamíferos. Nuestros análisis en células ADIPO-P2 confirman que la BLM induce inestabilidad telomérica, por pérdida de extremos teloméricos (manifestada como CI y FT), y aportan evidencia de que este compuesto también induce inestabilidad telomérica en forma de disfunción telomérica (expresada como pérdida de señales teloméricas de FISH, duplicaciones y fusiones teloméricas); (Figuras 14 y 15). La pérdida de señales de FISH y duplicaciones teloméricas fueron también observadas previamente en fibroblastos humanos, 14 días después de haber sido expuestos a radiación ionizante [57]. Por lo tanto, estas aberraciones parecen estar directamente relacionadas con la disfunción telomérica y constituyen un signo de inestabilidad telomérica inducida por radiación y agentes químicos radiomiméticos. Dado que gran parte de las duplicaciones de secuencias teloméricas inducidas por la BLM fueron de tipo cromátida, podemos suponer que este tipo de aberraciones ocurre principalmente durante la replicación del ADN o bien, en la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular, tal como fue sugerido anteriormente para las pérdidas y duplicaciones de secuencias teloméricas por Ojima en el caso de las radiaciones ionizantes [57]. No obstante, la inducción de pérdidas de señales teloméricas inducidas por la BLM tendría lugar a lo largo de todo el ciclo celular, dado que este compuesto indujo frecuencias similares de pérdidas de secuencias teloméricas de tipo cromosoma y cromátida. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para confirmar este supuesto.

La inestabilidad telomérica inducida por BLM fue observada en células ADIPO-P2 a las 18 horas, 10 días y 15 días postratamiento, lo cual indica que dicho compuesto induce inestabilidad telomérica persistente en células de mamífero. Nuestros resultados señalan que la inestabilidad telomérica observada a los 10 y 15

días postratamiento, se debe principalmente a las aberraciones registradas luego de la primera división celular luego del tratamiento, dado que en todos los tiempos postratamiento, se encontraron los mismos tipos de aberraciones teloméricas (Tablas 3 y 5). Éstos resultados difieren de aquellos informados por Ojima y cols. [57], quienes encontraron que los rayos X inducen inestabilidad cromosómica retardada (pérdida de telómeros y duplicaciones teloméricas) en fibroblastos humanos. De este modo, mientras que los telómeros de las células expuestas a radiaciones ionizantes se vuelven inestables luego de varias generaciones después de haber ocurrido la exposición al mutágeno, aquellos expuestos a mutágenos químicos como la BLM resultan inestables desde la primera división celular postratamiento.

Por otro lado, la presencia de CI en la progenie de las células expuestas al compuesto radiomimético BLM concuerda con observaciones realizadas previamente por Durante y cols. [58], quienes demuestran la existencia de CI en la progenie de linfocitos humanos irradiados con radiación de alta energía 6 días después de producida la irradiación. Por lo tanto, el presente trabajo de Tesis Doctoral constituye la segunda investigación que demuestra que a pesar de carecer de un extremo cromosómico, los CI pueden ser transmitidos a la progenie de células que fueron expuestas inicialmente a BLM. Esto probablemente se deba a la inducción por parte de la BLM de los llamados ciclos BFB, ya mencionados en la sección 1.2 de la Introducción, que generan CI y FT en forma continua, hasta que el o los cromosomas carentes de telómero adquieren uno nuevo (Figura 2). La formación retardada de cromosomas dicéntricos, sugiere que los ciclos BFB; [129] tendrían un rol importante en la persistencia de la inestabilidad telomérica inducida por este compuesto. De hecho, los ciclos BFB se inician con la pérdida de los extremos cromosómicos, dando lugar a CI y cromosomas dicéntricos, dos tipos de aberraciones cromosómicas registradas en las células provenientes de cultivos tratados con BLM. Por lo tanto, la inducción de rupturas en los extremos cromosómicos por parte de la BLM, que da lugar a la formación de CI, promovería la inestabilidad genómica a través de la formación de ciclos BFB. Estos ciclos BFB podrían continuar varias generaciones después, desencadenando así rearrreglos cromosómicos en la progenie de las células expuestas a este compuesto. Además, la disfunción telomérica inducida por la BLM, podría ser en parte consecuencia directa del acortamiento telomérico observado mediante Tel-Flow-FISH en las células expuestas a las 18 horas postratamiento (Figura 23). Estos datos podrían resultar de gran importancia en una quimioterapia clínica basada en la administración de BLM en pacientes con cáncer, ya que entre sus

efectos la BLM induce inestabilidad telomérica a largo plazo, lo que podría promover la progresión sostenida de células malignas en dichos pacientes.

Por otro lado, en un estudio previo se encontró que la BLM no induce la actividad de la enzima telomerasa en células CHE a las 18 horas postratamiento [74]. Nuestros estudios demostraron que este comportamiento también ocurre en las células ADIPO-P2 en la primera división mitótica luego del tratamiento. No obstante, el hecho de que la BLM produce un incremento en la actividad de la enzima telomerasa en las células ADIPO-P2 10 días luego del tratamiento, demuestra que este compuesto puede generar una inducción retardada de la actividad de la telomerasa (Figura 26). Esto se corresponde con lo observado por Fridlender y cols. [104], quienes demostraron que la BLM induce un aumento de la actividad telomerasa en células epiteliales de pulmón de ratón a los 7 y 14 días luego del tratamiento con el mutágeno. Asimismo, el grupo de Nozaki y cols. [130], encontró niveles elevados de telomerasa en fibroblastos y extractos de tejido pulmonar aislados de ratas a los 7, 14 y 21 días de haber sido expuestos a BLM. Los niveles máximos de telomerasa fueron registrados en las muestras del día 14 [130]. La inducción retardada de la actividad telomerásica en células ADIPO-P2 sugiere que esta enzima podría estar relacionada con la inestabilidad telomérica persistente inducida por este compuesto. Los datos registrados por Tel-Flow-FISH indican el acortamiento de la longitud total de los telómeros a las 18 horas postratamiento con BLM, respecto a las células control, sin tratamiento (Figura 23). Asimismo, si bien la disminución de la actividad telomerasa observada a en la primera división mitótica, no fue estadísticamente significativa (15% respecto a las células control), podría correlacionarse con el acortamiento telomérico que ocurre a las 18 horas luego del tratamiento con el mutágeno. Del mismo modo, la inducción significativa de la actividad telomerásica que se observó a los 10 días postratamiento (63% respecto a las células control); (ver sección 5.6.1), se correlaciona con el aumento en la cantidad de repetidos teloméricos observado en los cromosomas de las células ADIPO-P2, 10 días después de la exposición a BLM (Figura 23). Esta resultados concuerdan con las evidencias que señalan que la enzima telomerasa confiere un efecto de resistencia frente a agentes genotóxicos, tales como la radiación ionizante, la BLM, el peróxido de hidrógeno y el etopósido [131], [132]. Esta resistencia ocurre en aquellas células que presentan telómeros muy cortos y por ende, propensas a desencadenar telómeros disfuncionales y también está relacionada con la capacidad de la telomerasa de actuar en la elongación telomérica para contrarrestar el acortamiento de los telómeros [132]. Asimismo, este efecto de

resistencia de la enzima telomerasa frente a agentes genotóxicos como la BLM y las radiaciones ionizantes, no se observó en células que presentaban telómeros largos [131], [132], con lo cual, la inducción de la enzima telomerasa registrada 10 días después del tratamiento con BLM, podría ser un efecto tendiente a contrarrestar el acortamiento telomérico registrado en las primeras divisiones mitóticas postratamiento con el mutágeno, respecto a las células control. Es decir, la presencia de telómeros cortos en las células ADIPO-P2 expuestas a BLM, predispondría a dichas células a desarrollar a largo plazo telómeros disfuncionales. En consecuencia, la telomerasa reduciría esta sensibilidad en forma indirecta, actuando sobre la elongación de los telómeros cortos. Por ello, el incremento en la cantidad de repetidos teloméricos observado a los 10 días postratamiento, en comparación a los cultivos expuestos y sacrificados a las 18 horas luego del tratamiento, podría deberse al aumento de la actividad telomerásica (63% respecto del control), también registrado 10 días luego de la exposición a BLM (Figura 26). El aumento de la sensibilidad de las células a desarrollar telómeros disfuncionales debido a la presencia de telómeros cortos en las células tratadas con BLM a las 18 horas luego del tratamiento, se reflejaría citogenéticamente a largo plazo (Tabla 5 y Figura 13) como pérdidas de señales de señales y fusiones teloméricas (Figura 15 B y Tablas 3 y 5).

Por otro lado, las mediciones de las longitudes teloméricas promedio (Kb) realizadas a los 15 días luego del tratamiento con BLM (12,21 Kb), no mostraron diferencias significativas con respecto a las células no expuestas (11,65 Kb). Esto podría relacionarse con la disminución observada de la actividad de la enzima telomerasa a los 15 días postratamiento (ver sección 5.6.1 de Resultados), lo que favorecería la pérdida de repetidos teloméricos en las células expuestas a BLM. De esta forma, a los 15 días postratamiento y luego de la inducción de la enzima (a los 10 días postratamiento), probablemente para contrarrestar el acortamiento telomérico que se manifestó en las primeras divisiones mitóticas, la actividad de telomerasa disminuye significativamente con respecto a los cultivos no expuestas al mutágeno (84%); (Figura 26). Estas observaciones concuerdan con aquellas realizadas por Rubio y cols. [132]; en fibroblastos humanos con diferentes longitudes teloméricas. En este caso, sus estudios demostraron que la subunidad h TERT protege preferentemente de la senescencia a las células de pasajes tardíos en respuesta al estrés genotóxico (radiación ionizante o BLM), dependiendo específicamente de la longitud de los telómeros. De esta forma, Rubio y cols. [132], señalan a la enzima telomerasa como un posible factor de resistencia frente a agentes genotóxicos, dependiendo ello

principalmente de la longitud telomérica, es decir actuando la enzima preferentemente en la elongación de telómeros cortos en respuesta al estrés genotóxico. Otras evidencias que sostienen esta idea de la subunidad h TERT de la telomerasa como factor de resistencia frente a agentes genotóxicos, fueron las aportadas previamente por Counter y cols. [133], quienes expresaron una forma inactiva de la proteína h TERT, conocida como h TERT-HA, en células carentes de actividad telomerasa. La proteína h TERT-HA se caracteriza por reconstituir la actividad telomerásica en células que carecen de la misma, pero no actúa en el mecanismo de elongación de los telómeros y tampoco ejerce un efecto sobre la sensibilidad a la BLM [132], [133]. Esto indicaría que la actividad de la telomerasa *per se* no confiere resistencia al estrés genotóxico. En conjunto, estos datos indican que los telómeros extremadamente cortos sensibilizan en cierta forma a las células frente a la acción de agentes genotóxicos como la BLM y a su vez, la enzima telomerasa actúa en forma indirecta en la elongación de los telómeros cortos.

### **6.1.2 Análisis de la inestabilidad telomérica inducida por EN**

En la presente Tesis Doctoral, si bien se registró que la EN induce daño cromosómico en las células ADIPO-P2 a las 18 horas, así como también a los 10 y 15 días postratamiento, la mayor parte de las aberraciones cromosómicas inducidas por este compuesto correspondieron a aberraciones que involucran disfunción telomérica. Solamente se observó inducción de aberraciones cromosómicas que no suponen disfunción telomérica a los 15 días luego del tratamiento con EN (Tablas 7 y 8). No obstante, estudios previos en linfocitos humanos y células CHO demostraron que la EN induce daño cromosómico desde la primera mitosis luego del tratamiento [54], [92], [94], [134]–[136]. Asimismo, se encontró que en células CHE, la EN induce CI y FT y que éstos fueron los tipos más frecuentes de aberraciones cromosómicas inestables inducidas por este compuesto a las 18 horas luego de la exposición al mismo [92]. Estos datos indican que las células de mamífero exhiben una sensibilidad diferencial al efecto clastogénico de la EN y que esta sensibilidad depende del tipo de aberración que se considere. La razón por la que esto ocurre requiere futuros estudios y experimentos con la línea celular ADIPO-P2, utilizada en esta Tesis Doctoral. Nuestros resultados indican que la EN induce disfunción telomérica en células ADIPO-P2, manifestada en forma de señales teloméricas de FISH intracromosómicas adicionales, señales de FISH extra-cromosómicas, pérdida y duplicación de señales y fusiones

teloméricas. Teniendo en cuenta que la EN es también un agente radiomimético, es importante destacar que las aberraciones cromosómicas teloméricas más frecuentemente observadas (pérdida y duplicación de señales teloméricas) en las células ADIPO-P2 expuestas a EN, son similares a las observadas por Ojima y cols. [57], en fibroblastos humanos 14 días después de haber sido irradiados. Estas observaciones también concuerdan con nuestros hallazgos en células ADIPO-P2 a los 10 y 15 días postratamiento con BLM (Tabla 5). Asimismo, al igual que para la BLM, en las células tratadas con EN, se registró una inducción persistente de fusiones teloméricas hasta los 10 días postratamiento (Tabla 8). De este modo, puede decirse que este tipo de aberraciones directamente relacionadas con la disfunción del telómero (pérdidas, duplicaciones y fusiones), constituyen un signo de inestabilidad telomérica inducida por compuestos radiomiméticos y radiaciones ionizantes. Dado que la mayoría de los eventos de duplicación telomérica inducidos por EN fueron de tipo cromátida, es posible sugerir que gran parte de estas aberraciones ocurre principalmente durante la fase de duplicación del ADN o bien, en la fase G<sub>2</sub> del ciclo celular. Asimismo, la inducción de la pérdida de secuencias teloméricas ocasionadas por este compuesto parece tener lugar a lo largo de todo el ciclo celular, ya que la EN produjo una frecuencia similar de pérdida de señales teloméricas de tipo cromátida que de tipo cromosoma. La disfunción telomérica por efecto de la EN se observó en células ADIPO-P2 a las 18 horas, 10 y 15 días postratamiento, dando lugar a inestabilidad telomérica persistente en dichas células. De acuerdo a nuestros datos, la disfunción telomérica registrada a los 10 y 15 días luego del tratamiento derivaría de aquellas aberraciones registradas luego de la primera división mitótica postratamiento, ya que las mismas aberraciones fueron detectadas a las 18 horas luego del tratamiento (Figura 16 y Tabla 8). Esto se corresponde con los datos obtenidos previamente en las mismas células expuestas a BLM (sección 5.4.1.2 de Resultados). Dichos resultados difieren de los de Ojima y cols. [57], quienes demostraron que la radiación ionizante induce inestabilidad telomérica retardada en fibroblastos humanos, manifestada en forma de duplicaciones y pérdida de señal telomérica de FISH. Asimismo, Tanaka y cols. [137], demostraron la inducción retardada de asociaciones teloméricas o fusiones en células B humanas. Por lo tanto, mientras que los telómeros de células expuestas a radiaciones ionizantes parecen ser inestables varias generaciones luego de la exposición, aquellas células expuestas a compuestos radiomiméticos (BLM y EN) son inestables desde la primera división mitótica luego del tratamiento.

Por otro lado, nuestros datos indican que las células tratadas con EN exhiben una actividad telomérica disminuida con respecto a las células no expuestas al mutágeno. Esto sugiere que la EN produce inhibición de la actividad de la enzima telomerasa en las células ADIPO-P2, efecto que se mantiene al menos hasta los 15 días luego del tratamiento con el mutágeno (Figura 27). Datos previos en células CHO y CHE no mostraron diferencias significativas en la actividad de la enzima telomerasa entre las células control y aquellas tratadas con EN a las 18 horas postratamiento [74]. Por ello, el efecto de la EN sobre la actividad telomérica parece ser dependiente del tipo de célula expuesta a este compuesto. Las diferencias en la actividad telomérica encontradas entre las células de hamster chino y las células ADIPO-P2 luego de la exposición a EN, podrían ser debidas a la metodología empleada para determinar la actividad de la telomerasa. La técnica de q-PCR, utilizada en esta Tesis Doctoral para detectar la actividad de la telomerasa, es mucho más sensible que los ensayos de electroforesis realizados con geles de poliacrilamida en los trabajos anteriores [74]. La inhibición de la actividad de la enzima a las 18 horas se correlaciona con la persistencia de aberraciones directamente relacionadas con la disfunción del telómero, principalmente con la pérdida de secuencias teloméricas que se registró, respecto al control sin exponer (Tabla 8, Figura 24 y Figura complementaria 1 A-B y E-F), lo cual indicaría que el efecto de la EN sobre la telomerasa sería el responsable de la disfunción telomérica observada en la primera división mitótica luego del tratamiento.

Por otro lado, a los 10 días luego del tratamiento con EN, al igual que lo que ocurrió con la BLM, se produjo un aumento en la cantidad de repetidos teloméricos en las células expuestas al mutágeno (Figura 23). No obstante, la inhibición de la actividad de la telomerasa se mantuvo en todos los tiempos estudiados (Figura 27). Por el contrario, los resultados del efecto de la EN sobre la actividad de la enzima en las células ADIPO-P2 difieren de aquellos obtenidos para la BLM, en donde a los 10 días postratamiento, la telomerasa actuaría como un factor de resistencia en las células tratadas con dicho mutágeno. A los 15 días postratamiento, no se observó ningún efecto significativo de la EN sobre la longitud telomérica. En efecto, las mediciones de la longitud telomérica realizadas a largo plazo (15 días) en las células tratadas con EN, no resultaron significativamente diferentes a la de los cultivos de las células control (Figura 24). Esto no se correlaciona con los datos obtenidos para la actividad de la telomerasa, donde se observó una inhibición de dicha enzima como respuesta a la exposición a EN en todos los tiempos postratamiento estudiados. De este modo, la inhibición de la telomerasa podría ser un efecto directo o indirecto de la

droga. La EN podría inhibir indirectamente la actividad de la enzima afectando a la subunidad catalítica h TERT o a su templado de ARN (h TERC o TR), así como también, alterar la función de las proteínas asociadas al complejo shelterina y como consecuencia afectar la actividad de la telomerasa, [138]. La inhibición o disminución de la actividad de la enzima en las células tratadas con EN, podría ser también una consecuencia directa de la muerte celular inducida por la droga. Nuestros resultados no permiten determinar si la EN afecta a los componentes de la telomerasa y si esto incide en su actividad normal. Sin embargo, nuestros datos permiten sugerir que la inhibición o disminución de la actividad de la enzima en las células expuestas a esta droga no está directamente relacionada con la proliferación celular, ya que no se observaron cambios significativos en la viabilidad celular y tampoco en el IM en los cultivos expuestos a la EN en comparación con los cultivos controles (Figuras 10 y 11 B). Para determinar los mecanismos precisos por los cuales la EN inhibe a la telomerasa en células de mamífero, se requerirá de futuros estudios que permitan dilucidar el mecanismo de acción de la EN sobre esta enzima. De acuerdo con datos previos y los obtenidos en la presente Tesis Doctoral, los efectos genotóxicos de EN están relacionados con la inestabilidad telomérica persistente inducida en células ADIPO-P2. La EN constituye un veneno para la enzima topoisomerasa II, ya que induce RDC a partir de la estabilización de la trans-esterificación inmediata de la enzima (llamado complejo escindible). La topoisomerasa II reconoce sitios de escisión de ADN telomérico, [139]. Por ello, la EN podría promover la ruptura a nivel telomérico a través de su acción directa sobre la topoisomerasa II, contribuyendo así al acortamiento telomérico en las células expuestas. Nuestros datos indican que la longitud promedio total (Kb) de las secuencias teloméricas de los cromosomas de las células ADIPO-P2 expuestas a 100 ng/ml de EN, (sacrificadas a las 18 horas luego del tratamiento), fue significativamente menor que la longitud de los telómeros de aquellos cultivos celulares controles que no fueron expuestos al mutágeno (Figura 24 y Figura complementaria 1 A-B y E-F). Esto concuerda con las evidencias que señalan que varios agentes químicos actúan bloqueando la acción de la topoisomerasa II en secuencias teloméricas (como el etopósido), produciendo daño telomérico [140]. Como se mencionó anteriormente, el etopósido es un agente que actúa bloqueando a la topoisomerasa II, induciendo disfunción telomérica en células normales humanas como consecuencia del acortamiento telomérico, así como también la depleción en la actividad telomérica y la disminución en la expresión del TERT y las proteínas teloméricas TPP1 y POT1 [127]. Por lo tanto, podemos sugerir que la EN podría actuar

a nivel telomérico y sobre la telomerasa en forma similar al etopósido, debido a la acción inhibitoria sobre la topoisomerasa II, promoviendo así la disfunción telomérica.

### **6.1.3 Análisis de la inestabilidad telomérica inducida por EZ**

Nuestros datos indican un aumento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas totales inducidas por la EZ en las células ADIPO-P2 en relación con los cultivos de células sin tratamiento en todos los tiempos estudiados. Si bien las diferencias registradas en las frecuencias de aberraciones en células expuestas al *buffer* de citrato de sodio 0,02 N (solvente de la EZ), fueron significativas en relación a las obtenidas en las células ADIPO-P2 sin tratamiento, la frecuencia de aberraciones totales inducidas por el mutágeno aumentó significativamente en todos los tiempos postratamiento con respecto a ambos controles (cultivos sin tratar y cultivos con citrato de sodio); (Figura 19). Asimismo, al igual que en el caso de los compuestos BLM y EN, se detectó la inducción de CI y de fragmentos acéntricos como consecuencia de la acción de EZ sobre las células ADIPO-P2 pero en este caso a las 18 horas y 15 días postratamiento (Tabla 9). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por Bolzán y cols. [47] en células CHE expuestas a EZ, quienes observaron que el 34% de las metafases analizadas 18 horas después del tratamiento utilizando una concentración de 2 mM del mutágeno presentaron pares de CI y FT [47]. Teniendo en cuenta los datos obtenidos con los mutágenos estudiados en este trabajo y observaciones previas realizadas por otros investigadores [46], [47], [92], podemos concluir que la formación de CI constituye uno de los eventos más comunes luego de la exposición a mutágenos químicos. Asimismo, nuestros resultados indican que el citrato de sodio si bien no induce citotoxicidad, ejerce cierto grado de genotoxicidad sobre los telómeros de los cromosomas, ya que el daño cromosómico observado se manifiesta como aberraciones que involucran disfunción telomérica, algo previamente desconocido, ya que requiere del uso de la técnica de FISH con sonda telomérica para ser detectado y esta Tesis es el primer trabajo donde se aplica esta técnica en células tratadas con citrato de sodio. No obstante, puede mencionarse que existe al menos un trabajo publicado donde se señala que el citrato de sodio puede ser citotóxico [141]. Además, es importante destacar que en ninguno de los trabajos previos realizados con EZ en células CHO en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE, se encontró un efecto cito- y/o genotóxico del

citrate de sodium [47], [95] y que el citrate de sodium es el solvante par excellence pour dissoudre la EZ [82], [83].

En concordancia con otros trabajos previos [142]–[144], la EZ no indujo únicamente aberraciones de tipo cromátida (como la mayoría de los mutágenos químicos) en la primera división mitótica luego del tratamiento, sino también aberraciones de tipo cromosoma (Tabla 10). Nuestros resultados indican que este efecto también se mantiene a largo plazo, a los 10 y 15 días postratamiento con EZ. Además, la EZ indujo principalmente aberraciones que involucran disfunción telomérica (Tabla 11) en todos los tiempos estudiados. La disfunción telomérica se manifestó principalmente por la pérdida y duplicación de señales teloméricas de tipo cromátida y cromosoma, aunque también se observaron señales teloméricas adicionales, señales teloméricas extracromosómicas y translocación de señales teloméricas (Figura 20). De este modo puede decirse que, este tipo de aberraciones directamente relacionadas con la disfunción del telómero, también es consecuencia del efecto de compuestos con propiedades alquilantes (como la EZ) sobre células de mamífero.

Por otro lado, si bien las mediciones de la longitud telomérica obtenidas a las 18 horas luego del tratamiento indican que hubo una diferencia significativa entre las células tratadas con el *buffer* de citrate de sodium y las células control (sin exposición), se indujo un mayor aumento en el número de repeticiones teloméricas en la progenie de células expuestas a EZ. Este efecto se mantuvo hasta los 10 días después del tratamiento (Figura 25 y Figuras complementarias 4 y 5 A-F del Anexo I de Resultados). Sin embargo, los datos obtenidos para la enzima telomerasa señalan que, si bien hubo una disminución en la actividad de la enzima a las 18 horas postratamiento, la actividad telomerasica en las células ADIPO-P2 control y aquellas células expuestas al mutágeno resultó extremadamente baja, con valores muy cercanos a los obtenidos con la línea Saos2 (con actividad de telomerasa muy baja o deficiente); ( $TPG < 1-300$ ). Asimismo, no se detectó la inducción de la actividad de la enzima en ninguno de los tiempos estudiados (Tabla 12). Los registros de la actividad de la telomerasa obtenidos a corto plazo, difieren de aquellos indicados por Quiroga y cols. [95] en células CHO, quienes demostraron que no existen variaciones significativas en la actividad de la enzima a las 18 horas postratamiento con EZ en relación a las células control. Esto demuestra que la sensibilidad de la droga sobre la telomerasa varía de acuerdo al tipo celular expuesto al antibiótico [74], [95]. Sin embargo, nuestros datos concuerdan con aquellos informados por González-Suárez y

cols. [145], quienes a partir de un modelo murino deficiente en actividad telomérica, estudiaron la sensibilidad citotóxica y el impacto de la inhibición de dicha enzima, en respuesta al tratamiento con otro agente con propiedades alquilantes, el *N-metil-N-nitrosourea* (MNU). Las generaciones de ratones más tempranas ( $G_1$  y  $G_2$ ), provenientes de ratones deficientes en telomerasa, carecían de actividad de la enzima, pero aún presentaban telómeros largos. Recién a partir de la quinta generación de ratones ( $G_5$ ), se registró una pérdida significativa de repetidos teloméricos. Además, el acortamiento telomérico que se registró a largo plazo en dichos ratones, estuvo acompañado por un aumento significativo en la cantidad de CI y en la frecuencia de fusiones teloméricas [145]. Asimismo, nuestros datos obtenidos a largo plazo mostraron que a los 15 días postratamiento la longitud telomérica disminuyó en las células tratadas con EZ, (Figura 25 y Figura complementaria 6 A-F del Anexo I de Resultados) respecto de las células control. De este modo, cuando la actividad de la enzima telomerasa es extremadamente baja o bien se encuentra inhibida, el acortamiento telomérico se hace evidente varias generaciones después del tratamiento con el agente mutagénico. En efecto, los ratones que tienen telómeros muy cortos presentan una hipersensibilidad al tratamiento con aquellos agentes que ocasionan rupturas de cadena en el ADN, como la radiación ionizante [145], los agentes alquilantes (MNU) [146] y la BLM [132], (ver sección 6.1 de la Discusión). Por otro lado, nuestros datos también concuerdan con aquellos informados recientemente por Liu y cols. [125], quienes realizaron el tratamiento en una línea celular germinal (C18-4) con diferentes agentes con propiedades alquilantes. El tratamiento con dichos agentes (cisplatino y la ciclofosfamida), no sólo afectó a los telómeros sino que también ocasionó daño en regiones no teloméricas e indujo inhibición de la actividad de la enzima telomerasa, debido a una expresión reducida de *terc* y *tert*. Este fenómeno se vio acompañado por un acortamiento a nivel telomérico que se registró a largo plazo, a partir de la sexta generación de ratones ( $G_6$ ) *knockout* para el gen *terc* [125].

Por otro lado, nuestros datos indican que si bien la EZ indujo daño en el ADN cromosómico, no hubo una muerte celular retardada en las células ADIPO-P2 inducida por el antibiótico, por lo menos hasta los 15 días postratamiento, ya que no se observó ningún efecto significativo de la EZ sobre la viabilidad celular y tampoco hubo una alteración significativa del IM (Figuras 10 y 11 C).

En resumen, el tratamiento u exposición a otros agentes químicos con propiedades alquilantes, como la MNU [137], el cisplatino, la ciclofosfamida [119],

generan la pérdida de repetidos teloméricos a largo plazo en mamíferos como consecuencia de la inhibición de la actividad de la enzima telomerasa. En el caso de la EZ solo existe acortamiento telomérico a largo plazo pero nuestros estudios no mostraron correlación con la actividad de la enzima telomerasa.

#### **6.1.4 Análisis de la expresión de genes teloméricos en un modelo murino**

Cualquier alteración en las proteínas de unión al ADN telomérico, es suficiente para generar daño a nivel telomérico y desencadenar la degeneración del tejido epitelial y el desarrollo de lesiones neoplásicas en ratones [147]. En el presente trabajo estudiamos la expresión de las proteínas asociadas a los telómeros de los mamíferos en melanoma y en tejidos normales de bazo e hígado de ratones inoculados con la línea tumoral B16 de melanoma, pero que no llegaron a desarrollar el tumor [148], [149]. La disminución en la expresión de los genes *trf1* y *rap1* registrada en melanoma (Figuras 28 y 43), se corresponde con las observaciones previas de Martínez y cols. [147], quienes encontraron que el *knockout* para el gen *trf1* en la epidermis de ratones, promueve severos defectos en la morfogénesis de la piel, acompañados por el desarrollo de focos de lesiones preneoplásicas. Asimismo, como consecuencia de la falta de expresión de *trf1*, dichos autores también observaron severos defectos en la piel como alteraciones en la función de la barrera epidérmica [147]. Evidencias recientes del mismo grupo de investigación [122], también indican una deficiencia en la expresión de *rap1* en el epitelio de ratones que presentan una hiperpigmentación en la adultez y telómeros cortos. Lin y cols. también señalaron a la disminución de la expresión de *trf1* como un posible marcador clínico en tejido tumoral de pulmón en humanos. Asimismo, no observaron cambios en los niveles de transcripción de *trf2*, *pot1*, y *rap1*, en relación a los tejidos controles [150].

Por otro lado, los niveles de expresión de *rap1* y *trf1* encontrados en la presente Tesis Doctoral en hígado y bazo de ratón, se corresponden con lo informado en la bibliografía [116]. Sin embargo, nuestros resultados difieren de aquellos obtenidos recientemente por Martínez y cols. [151]; quienes comprobaron *in vivo* que la falta de expresión de *trf2* en un tejido murino altamente proliferativo como la piel, conlleva a alteraciones mucho más severas que las registradas en ausencia de la expresión de *trf1*, *tpp1* y *rap1* [122], [147], [151]. En nuestros ensayos, la expresión de *trf2* en el tejido de melanoma murino no se vio alterada, respecto de su expresión en la piel normal (Figura 31).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el perfil de expresión de tpp1, tin2 y pot1a en melanoma murino (Figuras 34, 37 y 40). Considerando que en ratones no existen diferencias funcionales entre pot1a y pot1b (ambos actúan evitando las fusiones teloméricas) [41] y que los niveles de transcripción de pot1a en melanoma murino no resultaron significativos, se excluyó a pot1b del análisis transcripcional.

Recientemente, Tejera y cols. [152], demostraron que la falta de TPP1 en el epitelio estratificado de ratón produce patologías en la piel muy similares a las registradas por Martínez y cols. en 2009, en ausencia de trf1 [147]. Sin embargo, nuestros resultados en melanoma murino no indican variaciones en el perfil de expresión de tin2.

En resumen, nuestros datos señalan a la disminución significativa de la actividad transcripcional de trf1 y rap1 como dos posibles marcadores de inestabilidad genómica en melanoma murino.

## 7. CONCLUSIONES

En conclusión los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral sugieren que:

1. Las células de mamífero (rata) expuestas a mutágenos químicos (BLM, EN y EZ) son inestables a nivel telomérico desde la primera división mitótica luego del tratamiento.
2. Los mutágenos químicos BLM, EN y EZ son capaces de inducir inestabilidad telomérica a largo plazo (hasta 15 días postratamiento) en células de mamífero (rata):
  - La BLM induce inestabilidad telomérica persistente, manifestada en forma de pérdida de extremos cromosómicos (CI) y disfunción telomérica (pérdidas, y duplicaciones de secuencias teloméricas, así como también fusiones de telómeros).
  - La EN induce inestabilidad telomérica en forma de disfunción telomérica persistente, manifestada como señales teloméricas adicionales (intra- y extracromosómicas), pérdida y duplicación de secuencias teloméricas y fusiones teloméricas en células de mamífero.
  - La EZ induce disfunción telomérica persistente en células de mamífero, manifestada principalmente como pérdida y duplicación de secuencias teloméricas, la mayoría de ellas de tipo cromátida.
3. La presencia de telómeros cortos en las células ADIPO-P2 expuestas a BLM, parece predisponer a dichas células a desarrollar telómeros disfuncionales. La enzima telomerasa reduciría esta sensibilidad en forma indirecta, elongando los telómeros cortos.
4. La EN actuaría como agente inhibidor de la actividad de la enzima telomerasa. Dicha inhibición no afectaría directamente a la longitud telomérica de las células ADIPO-P2 expuestas a dichos mutágenos.

5. La EZ genera la pérdida de repetidos teloméricos a largo plazo en mamíferos, aunque dicho efecto no estaría correlacionado con alteraciones en la actividad de la telomerasa.
  
6. La disminución de la actividad transcripcional de los genes teloméricos *trf1* y *rap1* podría considerarse como un posible marcador de inestabilidad genómica en melanoma murino.

La presente Tesis Doctoral constituye el primer trabajo de investigación donde se demuestra que los mutágenos químicos con propiedades antitumorales pueden inducir inestabilidad telomérica en la progenie de las células expuestas a los mismos. Asimismo, esta Tesis es la segunda investigación que demuestra que los CI, a pesar de carecer de un extremo cromosómico, pueden ser transmitidos a la progenie de células que fueron expuestas a un mutágeno, en este caso en particular, a los mutágenos químicos BLM, EN y EZ. Del mismo modo, este trabajo señala a dos de los genes integrantes del complejo telomérico como posibles marcadores de inestabilidad genómica en melanoma murino.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-Bibliografía citada según la norma IEEE

- [1] V. a Zakian, "Telomeres: beginning to understand the end.," *Science*, vol. 270, no. 5242, pp. 1601–7, Dec. 1995.
- [2] E. H. Blackburn, "Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions.," *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 4, pp. 859–62, Feb. 2005.
- [3] P. M. Lansdorp, "Major cutbacks at chromosome ends.," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 30, no. 7, pp. 388–95, Jul. 2005.
- [4] A. D. Bolzán and M. S. Bianchi, "Telomeres , interstitial telomeric repeat sequences , and chromosomal aberrations," *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 612, pp. 189–214, 2006.
- [5] A. L. M. Cheung and W. Deng, "Telomere dysfunction, genome instability and cancer," *Front. Biosci.*, vol. 13, pp. 2075–2090, 2008.
- [6] R. J. O'Sullivan and J. Karlseder, "Telomeres: protecting chromosomes against genome instability.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 171–81, Mar. 2010.
- [7] A. D. Bolzán, "Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences.," *Mutagenesis*, vol. 27, no. 1, pp. 1–15, Jan. 2012.
- [8] S. M. Bailey and E. H. Goodwin, "DNA and telomeres: beginnings and endings.," *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 104, no. 1–4, pp. 109–15, Jan. 2004.
- [9] M. P. Longhese, "DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres.," *Genes Dev.*, vol. 22, no. 2, pp. 125–40, Jan. 2008.
- [10] M. J. Mceachern, A. Krauskopf, and E. H. Blackburn, "Telomeres and Their Control," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 34, pp. 331–358, 2000.
- [11] L. P. Ford, W. E. Wright, and J. W. Shay, "A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation," *Oncogene*, vol. 21, pp. 580–583, 2002.
- [12] K. R. Prowse and C. W. Greider, "Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 11, pp. 4818–22, May 1995.
- [13] M. E. Delany, L. M. Daniels, S. E. Swanberg, and H. A. Taylor, "Telomeres in the Chicken: Genome Stability and Chromosome Ends Telomere History: Cytogenetics Telomeres: Tandem Repeats," *Poult. Sci.*, vol. 82, pp. 917–926, 2003.
- [14] E. H. Blackburn, "Switching and signaling at the telomere.," *Cell Press*, vol. 106, no. 6, pp. 661–73, Sep. 2001.

- [15] Jean-Patrick Pommier and Laure Sabatier, "Telomere Length Distribution Digital Image Processing and Statistical Analysis," in *Telomere Length Distribution*, 2002, pp. 33–63.
- [16] J. Graakjaer, C. Bischoff, L. Korsholm, S. Holstebro, W. Vach, V. a. Bohr, K. Christensen, and S. Kølvraa, "The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans is determined by inherited, telomere-near factors and is maintained throughout life," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 124, no. 5, pp. 629–640, May 2003.
- [17] D. Poncet, A. Belleville, C. t'kint de Roodenbeke, A. Roborel de Climens, E. Ben Simon, H. Merle-Beral, E. Callet-Bauchu, G. Salles, L. Sabatier, J. Delic, and E. Gilson, "Changes in the expression of telomere maintenance genes suggest global telomere dysfunction in B-chronic lymphocytic leukemia.," *Blood*, vol. 111, no. 4, pp. 2388–91, Feb. 2008.
- [18] T. de Lange, "How shelterin solves the telomere end-protection problem.," *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, vol. 75, pp. 167–77, Jan. 2010.
- [19] T. de Lange, "Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres.," *Genes Dev.*, vol. 19, no. 18, pp. 2100–10, Sep. 2005.
- [20] M. Thanasoula, C. Liao, A. Tejera, M. Tarsounas, C. Mcnees, J. M. Flores, O. Ferna, and M. A. Blasco, "Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice," vol. 2, pp. 2060–2075, 2009.
- [21] A. Sfeir, S. T. Kosiyatrakul, D. Hockemeyer, S. L. MacRae, J. Karlseder, C. L. Schildkraut, and T. de Lange, "Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication.," *Cell*, vol. 138, no. 1, pp. 90–103, Jul. 2009.
- [22] M. Bellon, A. Datta, M. Brown, J.-F. Pouliquen, P. Couppe, M. Kazanji, and C. Nicot, "Increased expression of telomere length regulating factors TRF1, TRF2 and TIN2 in patients with adult T-cell leukemia.," *Int. J. Cancer*, vol. 119, no. 9, pp. 2090–7, Nov. 2006.
- [23] M. Gancarcíková, Z. Zemanová, J. Brezinová, a Berková, S. Vcelíková, J. Smigová, and K. Michalová, "The role of telomeres and telomerase complex in haematological neoplasia: the length of telomeres as a marker of carcinogenesis and prognosis of disease.," *Prague Med. Rep.*, vol. 111, no. 2, pp. 91–105, Jan. 2010.
- [24] J. Lingner and T. R. Cech, "Telomerase and chromosome end maintenance.," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 8, no. 2, pp. 226–32, Apr. 1998.
- [25] J. . Watson, "Origin of Concatemeric T7 DNA," *Nat. New Biol*, vol. 239, pp. 197–201, 1972.
- [26] A. M. Olovnikov, "A Theory of Marginotomy The Incomplete Copying of Template Margin in Enzymic Synthesis of Polym & otides and Biological Significance of the Phenomenon?," *J. Theor. Biol*, vol. 7, pp. 181–190, 1973.
- [27] M. a Blasco, "Telomere length, stem cells and aging.," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 3, no. 10, pp. 640–9, Oct. 2007.
- [28] C. M. Buseman, W. E. Wright, and J. W. Shay, "Is telomerase a viable target in cancer?," *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 730, no. 1–2, pp. 90–97, 2012.

- [29] C. M. Buseman, W. E. Wright, and J. W. Shay, "Is telomerase a viable target in cancer?," *Mutat. Res.*, vol. 730, pp. 90–97, 2012.
- [30] P. K. Patel, a S. Koti, and R. V Hosur, "NMR studies on truncated sequences of human telomeric DNA: observation of a novel A-tetrad.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, no. 19, pp. 3836–43, Oct. 1999.
- [31] L. Petraccone, E. Erra, V. Esposito, A. Randazzo, L. Mayol, L. Nasti, G. Barone, and C. Giancola, "Stability and structure of telomeric DNA sequences forming quadruplexes containing four G-tetrads with different topological arrangements.," *Biochemistry*, vol. 43, no. 16, pp. 4877–84, Apr. 2004.
- [32] W. Lu, Y. Zhang, D. Liu, Z. Songyang, and M. Wan, "Telomeres — structure , function , and regulation," *Exp. Cell Res.*, vol. 319, no. 2, pp. 133–141, 2013.
- [33] J. Tang, Z.-Y. Kan, Y. Yao, Q. Wang, Y.-H. Hao, and Z. Tan, "G-quadruplex preferentially forms at the very 3' end of vertebrate telomeric DNA.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 4, pp. 1200–8, Mar. 2008.
- [34] X. Lin, J. Gu, C. Lu, M. R. Spitz, and X. Wu, "Expression of telomere-associated genes as prognostic markers for overall survival in patients with non-small cell lung cancer.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, no. 19, pp. 5720–5, Oct. 2006.
- [35] J. Panero, J. Arbelbide, D. B. Fantl, H. G. Rivello, D. Kohan, and I. Slavutsky, "Altered mRNA expression of telomere-associated genes in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma.," *Mol. Med.*, vol. 16, no. 11–12, pp. 471–8.
- [36] H. Hu, Y. Zhang, M. Zou, S. Yang, and X.-Q. Liang, "Expression of TRF1, TRF2, TIN2, TERT, KU70, and BRCA1 proteins is associated with telomere shortening and may contribute to multistage carcinogenesis of gastric cancer.," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 136, no. 9, pp. 1407–14, Sep. 2010.
- [37] J. Karlseder, L. Kachatrian, H. Takai, K. Mercer, S. Hingorani, T. Jacks, and T. De Lange, "Targeted Deletion Reveals an Essential Function for the Telomere Length Regulator Trf1," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 23, no. 18, pp. 6533–6541, 2003.
- [38] P. Baumann, E. Podell, and T. R. Cech, "Human Pot1 ( Protection of Telomeres ) Protein : Cytolocalization , Gene Structure , and Alternative Splicing," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 22, no. 22, pp. 8079–8087, 2002.
- [39] T. Kondo, "Expression of POT1 is Associated with Tumor Stage and Telomere Length in Gastric Carcinoma," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 2, pp. 523–529, Jan. 2004.
- [40] R. Possemato, J. C. Timmons, E. L. Bauerlein, N. Wada, A. Baldwin, K. Masutomi, and W. C. Hahn, "Suppression of hPOT1 in diploid human cells results in an hTERT-dependent alteration of telomere length dynamics.," *Mol. Cancer Res.*, vol. 6, no. 10, pp. 1582–93, Oct. 2008.
- [41] D. Hockemeyer, J.-P. Daniels, H. Takai, and T. de Lange, "Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres.," *Cell*, vol. 126, no. 1, pp. 63–77, Jul. 2006.

- [42] Z.-T. Xin, K. a Carroll, N. Kumar, K. Song, and H. Ly, "Transcriptional activation of TIN2, a gene encoding the telomere-associated protein TIN2, by Sp1 and NF- $\kappa$ B factors.," *PLoS One*, vol. 6, no. 6, p. e21333, Jan. 2011.
- [43] S. E. Artandi and R. a DePinho, "Telomeres and telomerase in cancer.," *Carcinogenesis*, vol. 31, no. 1, pp. 9–18, Jan. 2010.
- [44] J. P. Murnane, "Telomere loss as a mechanism for chromosome instability in human cancer," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 11, pp. 4255–4259, 2010.
- [45] J. P. Murnane, "Telomeres and chromosome instability.," *DNA Repair (Amst.)*, vol. 5, no. 9–10, pp. 1082–92, Sep. 2006.
- [46] A. D. Bolzán and M. S. Bianchi, "Detection of incomplete chromosome elements and interstitial fragments induced by bleomycin in hamster cells using a telomeric PNA probe.," *Mutat. Res.*, vol. 554, no. 1–2, pp. 1–8, Oct. 2004.
- [47] A. D. Bolzán and M. S. Bianchi, "Analysis of streptozotocin-induced incomplete chromosome elements and excess acentric fragments in Chinese hamster cells using a telomeric PNA probe.," *Mutat. Res.*, vol. 570, no. 2, pp. 237–44, Mar. 2005.
- [48] L. Benkhaled, M. Xunclà, M. R. Caballín, L. Barrios, and J. F. Barquinero, "Induction of complete and incomplete chromosome aberrations by bleomycin in human lymphocytes.," *Mutat. Res.*, vol. 637, no. 1–2, pp. 134–41, Jan. 2008.
- [49] G. Sciandrello, M. Mauro, I. Catanzaro, M. Saverini, F. Caradonna, and G. Barbata, "Long-lasting genomic instability following arsenite exposure in mammalian cells: the role of reactive oxygen species.," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 52, no. 7, pp. 562–8, Aug. 2011.
- [50] G. Sciandrello, F. Caradonna, M. Mauro, and G. Barbata, "Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells.," *Carcinogenesis*, vol. 25, no. 3, pp. 413–7, Mar. 2004.
- [51] J. Sánchez, M. S. Bianchi, and A. D. Bolzán, "Effect of bleomycin on interstitial telomeric sequences of immortalized Chinese hamster ovary cells.," *Mutat. Res.*, vol. 669, no. 1–2, pp. 139–46, Oct. 2009.
- [52] Y. H. Cho, H. K. Jeon, and H. W. Chung, "Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on delayed chromosomal instability induced by bleomycin in normal human fibroblast cells.," *J. Toxicol. Environ. Health. A*, vol. 70, no. 15–16, pp. 1252–8, Aug. 2007.
- [53] A. D. Bolzán, *Cytogenetic Evaluation of Telomere Dysfunction: Chromosomal Aberrations Involving Telomeres and Interstitial Telomeric Sequences*. 2009, pp. 1–52.
- [54] M. V Mencucci, M. V. Bravo, M. S. Bianchi, and A. D. Bolzán, "Streptonigrin induces delayed chromosomal instability involving interstitial telomeric sequences in Chinese hamster ovary cells.," *Mutat. Res.*, vol. 747, no. 1, pp. 46–52, Aug. 2012.
- [55] S. D. Bouffler, W. F. Morgan, T. K. Pandita, and P. Slijepcevic, "The involvement of telomeric sequences in chromosomal aberrations.," *Mutat. Res.*, vol. 366, no. 2, pp. 129–35, Nov. 1996.

- [56] S. D. Bouffler, "Involvement of telomeric sequences in chromosomal aberrations.," *Mutat. Res.*, vol. 404, no. 1–2, pp. 199–204, Aug. 1998.
- [57] M. Ojima, H. Hamano, M. Suzuki, K. Suzuki, S. Kodama, and M. Watanabe, "Delayed induction of telomere instability in normal human fibroblast cells by ionizing radiation.," *J. Radiat. Res.*, vol. 45, no. 1, pp. 105–10, Mar. 2004.
- [58] A. M. Durante, K. George, and F. A. Cucinotta, "Chromosomes Lacking Telomeres are Present in the Progeny of Human Lymphocytes Exposed to Heavy Ions Chromosomes Lacking Telomeres are Present in the Progeny of Human Lymphocytes Exposed to Heavy Ions," *Radiat. Res.*, vol. 165, no. 1, pp. 51–58, 2006.
- [59] L. F. Povirk and M. J. Austin, "Genotoxicity of bleomycin.," *Mutat. Res.*, vol. 257, no. 2, pp. 127–43, Mar. 1991.
- [60] J. Chen and J. Stubbe, "Bleomycins: towards better therapeutics.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 2, pp. 102–12, Feb. 2005.
- [61] J. Chen, M. K. Ghorai, G. Kenney, and J. Stubbe, "Mechanistic studies on bleomycin-mediated DNA damage: multiple binding modes can result in double-stranded DNA cleavage.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. 11, pp. 3781–90, Jun. 2008.
- [62] H. T. Q. Nguyen and V. Murray, "The DNA sequence specificity of bleomycin cleavage in telomeric sequences in human cells.," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 17, no. 8, pp. 1209–15, Dec. 2012.
- [63] T. V Nguyen and V. Murray, "Human telomeric DNA sequences are a major target for the antitumour drug bleomycin.," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2012.
- [64] H. a Jääskelä-Saari, K. J. Kairemo, H. a Ramsay, and R. Grénman, "Squamous cell cancer cell lines: sensitivity to bleomycin and suitability for animal xenograft studies.," *Acta Otolaryngol. Suppl.*, vol. 529, pp. 241–4, Jan. 1997.
- [65] G. P. Canellos, "Primary treatment of Hodgkin's disease," *Ann. Oncol.*, vol. 13, no. suppl 4, pp. 153–158, Oct. 2002.
- [66] L.-J. Ming, "Structure and function of 'metalloantibiotics'.," *Med. Res. Rev.*, vol. 23, no. 6, pp. 697–762, Nov. 2003.
- [67] Y. Xiao and a T. Natarajan, "Analysis of bleomycin-induced chromosomal aberrations in Chinese hamster primary embryonic cells by FISH using arm-specific painting probes.," *Mutagenesis*, vol. 14, no. 4, pp. 357–64, Jul. 1999.
- [68] a D. Bolzán and M. S. Bianchi, "Genotoxicity of streptonigrin: a review.," *Mutat. Res.*, vol. 488, no. 1, pp. 25–37, Mar. 2001.
- [69] T. J. McBride, J. J. Oleson, and D. Woolf, "The Activity of Streptonigrin against the Rauscher Murine Leukemia Virus in Vivo of Streptonigrin against the Rauscher Murine in," *Cancer Res.*, vol. 26, pp. 727–732, 1966.
- [70] J. E. J. Bryan Knuckley, "A Fluopol-ABPP HTS Assay to identify PAD inhibitors," *Chem Commun*, vol. 46, no. 38, pp. 7175–7177, 2011.

- [71] S. Park and S. Chun, "Streptonigrin inhibits  $\beta$ -Catenin/Tcf signaling and shows cytotoxicity in  $\beta$ -catenin-activated cells.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1810, no. 12, pp. 1340–5, Dec. 2011.
- [72] K. V Rao and J. W. Beach, "Streptonigrin and related compounds. 5. Synthesis and evaluation of some isoquinoline analogues.," *J. Med. Chem.*, vol. 34, no. 6, pp. 1871–1879, Jun. 1991.
- [73] C. J. Dreyton, E. D. Anderson, V. Subramanian, D. L. Boger, and P. R. Thompson, "Insights into the mechanism of streptonigrin-induced protein arginine deiminase inactivation.," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 22, no. 4, pp. 1362–9, Feb. 2014.
- [74] a D. Bolzán, G. L. Páez, and M. S. Bianchi, "FISH analysis of telomeric repeat sequences and their involvement in chromosomal aberrations induced by radiomimetic compounds in hamster cells.," *Mutat. Res.*, vol. 479, no. 1–2, pp. 187–96, Aug. 2001.
- [75] G. Pron, J. Belehradek, S. Orłowski, and L. M. Mir, "Involvement of membrane bleomycin-binding sites in bleomycin cytotoxicity.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 48, no. 2, pp. 301–10, Jul. 1994.
- [76] G. Pron, N. Mahrouf, S. Orłowski, O. Tounekti, B. Poddevin, J. Belehradek, and L. M. Mir, "Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: a receptor-mediated endocytosis mechanism.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 57, no. 1, pp. 45–56, Jan. 1999.
- [77] R. T. Dorr, R. Meyers, K. Snead, and J. D. Liddil, "Analytical and biological inequivalence of two commercial formulations of the antitumor agent bleomycin.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 42, no. 2, pp. 149–54, Jan. 1998.
- [78] A. D. E. V. J STUBBE, J W. KOZARICH, W WU, "Bleomycins : A Structural Model for Specificity , Binding , and Double Strand Cleavage," *Am. Chemistry Soc.*, vol. 29, pp. 322–330, 1996.
- [79] Cone and R, "The mechanism of the degradation of DNA by streptonigrin'," no. 13, pp. 219–223, 1976.
- [80] N. S. Mizuno and D. P. Gilboe, "Binding of streptonigrin to DNA," *Biochim. Biophys. Acta - Nucleic Acids Protein Synth.*, vol. 224, no. 2, pp. 319–327, Dec. 1970.
- [81] X. Wei and L.-J. Ming, "NMR Studies of metal complexes and DNA binding of the quinone-containing antibiotic streptonigrin," *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.*, no. 17, pp. 2793–2798, 1998.
- [82] S. Lenzen, "The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.," *Diabetologia*, vol. 51, no. 2, pp. 216–26, Feb. 2008.
- [83] C. O. Eleazu, K. C. Eleazu, S. Chukwuma, and U. N. Essien, "Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans.," *J. Diabetes Metab. Disord.*, vol. 12, no. 1, p. 60, Jan. 2013.
- [84] M. a Valentovic, N. Alejandro, a Betts Carpenter, P. I. Brown, and K. Ramos, "Streptozotocin (STZ) diabetes enhances benzo(alpha)pyrene induced renal injury in Sprague Dawley rats.," *Toxicol. Lett.*, vol. 164, no. 3, pp. 214–20, Jul. 2006.

- [85] M. Elsner, B. Guldbakke, M. Tiedge, R. Munday, and S. Lenzen, "Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin.," *Diabetologia*, vol. 43, no. 12, pp. 1528–33, Dec. 2000.
- [86] R. B. Weiss, "Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity.," *Cancer Treat. Rep.*, vol. 66, no. 3, pp. 427–38, Mar. 1982.
- [87] M. Kashani-Sabet, "Melanoma genomics.," *Curr. Oncol. Rep.*, vol. 6, no. 5, pp. 401–5, Sep. 2004.
- [88] L. S. Burke, P. L. Hyland, R. M. Pfeiffer, J. Prescott, W. Wheeler, L. Mirabello, S. a Savage, L. Burdette, M. Yeager, S. Chanock, I. De Vivo, M. a Tucker, A. M. Goldstein, and X. R. Yang, "Telomere length and the risk of cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations.," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e71121, Jan. 2013.
- [89] F. W. Huang, E. Hodis, M. J. Xue, G. V Kryukov, L. Chin, and L. A. Garraway, "Highly Recurrent TERT Promoter mutations in human melanoma," *Science (80-. )*, vol. 38, no. 5, pp. 531–9, May 2013.
- [90] S. Horn, A. Figl, P. S. Rachakonda, C. Fischer, A. Sucker, A. Gast, S. Kadel, I. Moll, E. Nagore, K. Hemminki, D. Schadendorf, and R. Kumar, "TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma.," *Science*, vol. 339, no. 6122, pp. 959–61, Feb. 2013.
- [91] H. Nan, M. Du, I. De Vivo, J. E. Manson, A. Mctiernan, J. D. Curb, L. S. Lessin, M. R. Bonner, A. A. Qureshi, D. J. Hunter, and J. Han, "Shorter telomeres associate with a reduced risk of melanoma development," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 21, pp. 6758–6763, 2011.
- [92] A. D. Bolzán and M. S. Bianchi, "Analysis of streptonigrin-induced incomplete chromosome elements and interstitial fragments in Chinese hamster cells using a telomeric PNA probe.," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 44, no. 4, pp. 277–82, Jan. 2004.
- [93] M. C. Diaz Flaque, M. S. Bianchi, and A. D. Bolza, "A Comparative Analysis of Bleomycin-Induced Incomplete Chromosome Elements in Two Mammalian Cell Lines Using a Telomeric PNA Probe," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 681, no. August, pp. 674–681, 2006.
- [94] J. Sánchez, M. S. Bianchi, and A. D. Bolzán, "Relationship between heterochromatic interstitial telomeric sequences and chromosome damage induced by the radiomimetic compound streptonigrin in Chinese hamster ovary cells.," *Mutat. Res.*, vol. 684, no. 1–2, pp. 90–7, Feb. 2010.
- [95] Y. Quiroga, N. Paviolo, and A. Bolzan, "Interstitial Telomeric Sequences Are Not Preferentially Involved in the Chromosome Damage Induced by the Methylating Compound Streptozotocin in Chinese," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 152, no. October 2012, 2013.
- [96] A. Reeves, "MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data," *Genome*, vol. 44, no. 3, pp. 439–443, 2001.
- [97] A. Levan, K. Fredga, and A. . Sandberg, "Nomenclature for centromeric position at chromosomes," *Hereditas*, pp. 201–220, 1964.

- [98] M. Hultdin, E. Grönlund, K. Norrback, E. Eriksson-Lindström, T. Just, and G. Roos, "Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 26, no. 16, pp. 3651–6, Aug. 1998.
- [99] V. Kapoor and W. Telford, "Telomere length measurement by FISH and flow cytometry," in *Telomere Length Measurement by Fluorescence In Situ Hybridization and Flow Cytometry*, 2004, pp. 385–398.
- [100] D. Kipling and H. J. Cooke, "Hypervariable ultra-long telomeres in mice.," *Nature*, vol. 347, no. 6291, pp. 400–2, Sep. 1990.
- [101] K. R. Prowse and C. W. Greider, "Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 11, pp. 4818–22, May 1995.
- [102] G. M. Baerlocher, I. Vulto, G. de Jong, and P. M. Lansdorp, "Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH).," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 5, pp. 2365–76, Jan. 2006.
- [103] R. D. Ballal, T. Saha, S. Fan, B. R. Haddad, and E. M. Rosen, "BRCA1 localization to the telomere and its loss from the telomere in response to DNA damage.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 52, pp. 36083–98, Dec. 2009.
- [104] Z. G. Fridlender, P. Y. Cohen, O. Golan, N. Arish, and R. Breuer, "Telomerase activity in bleomycin-induced epithelial cell apoptosis and lung fibrosis," vol. 30, no. 2, pp. 205–213, 2007.
- [105] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–8, Dec. 2001.
- [106] S. Makino, "The somatic complement of the Norway rat , *Rattus norvegicus*," in *Mammalian Chromosomes in vitro*, 1954, pp. 23–28.
- [107] M. V. Bravo, M. S. Bianchi, and A. D. Bolzán, "Bleomycin induces delayed instability of interstitial telomeric sequences in Chinese hamster ovary cells.," *Mutat. Res.*, vol. 731, no. 1–2, pp. 133–9, Mar. 2012.
- [108] P. Slijepcevic, M. P. Hande, S. D. Bouffler, P. Lansdorp, and P. E. Bryant, "Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential.," *Chromosoma*, vol. 106, no. 7, pp. 413–21, Dec. 1997.
- [109] P. Slijepcevic and a T. Natarajan, "Fragile site at Xq21 in Chinese hamster and its implications for the in vitro chromosomal aberration test.," *Mutagenesis*, vol. 10, no. 4, pp. 353–5, Jul. 1995.
- [110] P. Slijepcevic, Y. Xiao, I. Dominguez, and A. T. Natarajan, "Spontaneous and radiation-induced chromosomal breakage at interstitial telomeric sites," *Chromosoma*, vol. 104, pp. 596–604, 1996.
- [111] C. Scheel, K. L. Schaefer, a Jauch, M. Keller, D. Wai, C. Brinkschmidt, F. van Valen, W. Boecker, B. Dockhorn-Dworniczak, and C. Poremba, "Alternative lengthening of telomeres is associated with chromosomal instability in osteosarcomas.," *Oncogene*, vol. 20, no. 29, pp. 3835–44, Jun. 2001.

- [112] P. Phatak, F. Dai, M. Butler, M. P. Nandakumar, P. L. Gutierrez, M. J. Edelman, H. Hendriks, and A. M. Burger, "KML001 cytotoxic activity is associated with its binding to telomeric sequences and telomere erosion in prostate cancer cells.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 14, pp. 4593–602, Jul. 2008.
- [113] J. Fujimori, T. Matsuo, S. Shimose, T. Kubo, M. Ishikawa, Y. Yasunaga, and M. Ochi, "Antitumor effects of telomerase inhibitor TMPyP4 in osteosarcoma cell lines.," *J. Orthop. Res.*, vol. 29, no. 11, pp. 1707–11, Nov. 2011.
- [114] A. J. Cesare and R. R. Reddel, "Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, no. 5, pp. 319–30, May 2010.
- [115] A. J. Cesare and R. R. Reddel, "Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres.," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 129, no. 1–2, pp. 99–108, 2008.
- [116] "Expression Mouse Atlas EMLB-EBI." [Online]. Available: <http://www.ebi.ac.uk/>.
- [117] X. Lin, J. Gu, C. Lu, M. R. Spitz, and X. Wu, "Expression of Telomere-Associated Genes as Prognostic Markers for Overall Survival in Patients with Non ^ Small Cell Lung Cancer," *Clin. cancer Res.*, vol. 12, no. 19, pp. 5720–5725, 2006.
- [118] A. J. Ramsay, V. Quesada, M. Foronda, L. Conde, A. Martínez-Trillos, N. Villamor, D. Rodríguez, A. Kwarciak, C. Garabaya, M. Gallardo, M. López-Guerra, A. López-Guillermo, X. S. Puente, M. a Blasco, E. Campo, and C. López-Otín, "POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia.," *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 5, pp. 526–30, May 2013.
- [119] Z. Wang, M. Gerstein, and M. Snyder, "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 10, no. 1, pp. 57–63, 2009.
- [120] R. Possemato, J. C. Timmons, E. L. Bauerlein, N. Wada, A. Baldwin, K. Masutomi, and W. C. Hahn, "Suppression of hPOT1 in diploid human cells results in an hTERT-dependent alteration of telomere length dynamics.," *Mol. Cancer Res.*, vol. 6, no. 10, pp. 1582–93, Oct. 2008.
- [121] D. Hockemeyer, J. Daniels, H. Takai, and T. De Lange, "Supplemental Data Recent Expansion of the Telomeric Complex in Rodents: Two Distinct POT1 Proteins Protect Mouse Telomeres," vol. 126.
- [122] P. Martinez, M. Thanasoula, A. R. Carlos, G. Gómez-López, A. M. Tejera, S. Schoeftner, O. Dominguez, D. G. Pisano, M. Tarsounas, and M. a Blasco, "Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 8, pp. 768–80, Aug. 2010.
- [123] B. M. Unryn, D. Hao, S. Glück, and K. T. Riabowol, "Acceleration of telomere loss by chemotherapy is greater in older patients with locally advanced head and neck cancer.," *Cancer Res.*, vol. 12, no. 21, pp. 6345–50, Nov. 2006.
- [124] Y. Begus-nahrmann, D. Hartmann, J. Kraus, P. Eshraghi, A. Scheffold, M. Grieb, V. Rasche, P. Schirmacher, H. Lee, H. A. Kestler, A. Lechel, and K. L. Rudolph, "Brief report Transient telomere dysfunction induces chromosomal instability and promotes carcinogenesis," *J. Chem. Investig.*, vol. 122, no. 6, pp. 2283–2288, 2012.

- [125] M. Liu, B. F. Hales, and B. Robaire, "Effects of four chemotherapeutic agents, bleomycin, etoposide, cisplatin, and cyclophosphamide, on DNA damage and telomeres in a mouse spermatogonial cell line.," *Biol. Reprod.*, vol. 90, no. 4, p. 72, Apr. 2014.
- [126] T. Ishibashi and S. J. Lippard, "Telomere loss in cells treated with cisplatin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 8, pp. 4219–23, Apr. 1998.
- [127] P. Li, M. Hou, F. Lou, M. Björkholm, and D. Xu, "Telomere dysfunction induced by chemotherapeutic agents and radiation in normal human cells.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 44, no. 9, pp. 1531–40, Sep. 2012.
- [128] F. Wang, E. R. Podell, A. J. Zaug, Y. Yang, P. Baciu, T. R. Cech, and M. Lei, "The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor.," *Nature*, vol. 445, no. 7127, pp. 506–10, Feb. 2007.
- [129] J. P. Murnane, "Telomere dysfunction and chromosome instability," *Mutat. Res.*, vol. 730, no. 415, pp. 28–36, 2012.
- [130] Y. Nozaki, T. Liu, K. Hatano, M. Gharaee-Kermani, and S. H. Phan, "Induction of telomerase activity in fibroblasts from bleomycin-injured lungs.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 23, no. 4, pp. 460–5, Oct. 2000.
- [131] M. A. Rubio, S. Kim, and J. Campisi, "DNA: REPLICATION REPAIR AND RECOMBINATION: Reversible Manipulation of Telomerase Expression and Telomere Length: IMPLICATIONS FOR THE IONIZING RADIATION RESPONSE AND Miguel A . Rubio , Sahn-Ho Kim and Judith Reversible Manipulation of Telomerase Expres," *J. Biol. i Chem.*, no. 227, pp. 26609–28617, 2002.
- [132] M. A. Rubio, A. R. Davalos, and J. Campisi, "Telomere length mediates the effects of telomerase on the cellular response to genotoxic stress," *Exp. Cell Res.*, vol. 298, pp. 17–27, 2004.
- [133] C. M. Counter, W. C. Hahn, W. Wei, S. D. Caddle, R. L. Beijersbergen, P. M. Lansdorp, J. M. Sedivy, and R. a Weinberg, "Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 95, no. 25, pp. 14723–8, Dec. 1998.
- [134] V. . Linscombe, B. . Gollapudi, and A. . Sinha, "Cytogenetic damage and cytokinetics in streptonigrin-treated human lymphocytes," in *In vitro cellular & Developmental Biology*, vol. 27, no. 8, 1991, pp. 603–605.
- [135] M. . Testoni, M. . Bianchi, and N. . Bianchi, "Clastogenesis induced by streptonigrin in CHO cells," *Vitr. Cell. Dev. Biol.*, no. August, pp. 623–624, 1993.
- [136] M. I. Testoni, N. O. Bianchi, and M. S. Bianchi, "The kinetics of chromosome and DNA damage by streptonigrin in CHO cells.," *Mutat. Res.*, vol. 334, no. 1, pp. 23–31, Feb. 1995.
- [137] K. Tanaka, T. S. Kumaravel, S. Ihda, and N. Kamada, "Characterization of late-arising chromosome aberrations in human B-cell lines established from alpha-ray- or gamma-ray-irradiated lymphocytes.," *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 187, no. 2, pp. 112–24, Dec. 2008.
- [138] C. Cifuentes-Rojas and D. . Shippen, "Telomerase Regulation," *Mutat. Res.*, vol. 730, pp. 20–27, 2012.

- [139] Y. Yamashita, S. Kawada, N. Fujii, and U. Nakano, "Induction of Mammalian DNA Topoisomerase II Dependent DNA Cleavage by Antitumor Antibiotic Streptonigrin Induction of Mammalian DNA Topoisomerase Antitumor Antibiotic Streptonigrin II Dependent DNA Cleavage by," *Cancer Res.*, vol. 50, pp. 5841–5844, 1990.
- [140] H. J. Yoon, I. Y. Choi, M. R. Kang, S. S. Kim, M. T. Muller, J. R. Spitzner, and I. K. Chung, "DNA topoisomerase II cleavage of telomeres in vitro and in vivo.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1395, no. 1, pp. 110–20, Jan. 1998.
- [141] E. M. Garland, J. M. Parr, D. S. Williamson, and S. M. Cohen, "In vitro cytotoxicity of the sodium, potassium and calcium salts of saccharin, sodium ascorbate, sodium citrate and sodium chloride," *Toxicol. Vitr.*, vol. 3, no. 3, pp. 201–205, Jan. 1989.
- [142] M. S. Capucci, M. E. Hoffmann, and a T. Natarajan, "Streptozotocin-induced genotoxic effects in Chinese hamster cells: the resistant phenotype of V79 cells.," *Mutat. Res.*, vol. 347, no. 2, pp. 79–85, Jul. 1995.
- [143] M. S. Capucci, M. E. Hoffmann, M. Z. Zdzienicka, and a T. Natarajan, "Streptozotocin-induced chromosomal aberrations, SCEs and mutations in CHO-9 parental cells and in EM-C11 mutant cell line.," *Mutat. Res.*, vol. 326, no. 2, pp. 227–34, Feb. 1995.
- [144] M. S. Capucci, M. E. Hoffmann, A. De Groot, and a T. Natarajan, "Streptozotocin-induced toxicity in CHO-9 and V79 cells.," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 26, no. 1, pp. 72–8, Jan. 1995.
- [145] E. González-suárez, F. A. Goytisolo, J. M. Flores, and E. Gonza, "Telomere Dysfunction Results in Enhanced Organismal Sensitivity to the Alkylating Agent N -Methyl- N - Nitrosourea Advances in Brief Telomere Dysfunction Results in Enhanced Organismal Sensitivity to the Alkylating," *Cancer Res.*, pp. 7047–7050, 2003.
- [146] F. a Goytisolo, E. Samper, J. Martín-Caballero, P. Finnon, E. Herrera, J. M. Flores, S. D. Bouffler, and M. a Blasco, "Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals.," *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 11, pp. 1625–36, Dec. 2000.
- [147] P. Martínez, M. Thanasoula, C. Liao, A. Tejera, M. Tarsounas, C. Mcnees, J. M. Flores, O. Ferna, and M. A. Blasco, "Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice," *Genes Dev.*, vol. 2, pp. 2060–2075, 2009.
- [148] A. Alterman, D. Fornabalo, and C. W. Stackpole, "Metastatic Dissemination of 816 Melanoma : Pattern and," *JNCI*, vol. 75, no. 4, pp. 691–702, 1985.
- [149] C. W. Stackpole, E. F. Valle, and A. L. Alterman, "B16 Melanoma Metastasis to an Artificial Organ Implant B16 Melanoma Metastasis to an ' Artificial Organ ' Implant1," pp. 2444–2450, 1991.
- [150] X. Lin, J. Gu, C. Lu, M. R. Spitz, and X. Wu, "Expression of Telomere-Associated Genes as Prognostic Markers for Overall Survival in Patients with Non ^ Small Cell Lung Cancer," *Clin. cancer Res.*, vol. 12, no. 19, pp. 5720–5725, 2006.
- [151] P. Martínez, I. Ferrara-Romeo, J. M. Flores, and M. a Blasco, "Essential role for the TRF2 telomere protein in adult skin homeostasis.," *Aging Cell*, vol. 13, no. 4, pp. 656–68, Aug. 2014.

- [152] A. M. Tejera, M. Stagno, M. Thanasoula, R. M. Marion, P. Martinez, C. Liao, J. M. Flores, M. Tarsounas, and A. Maria, "Europe PMC Funders Group TPP1 Is Required for TERT Recruitment , Telomere Elongation during Nuclear Reprogramming , and Normal Skin Development in Mice," *Eur. PMC Funders Gr.*, vol. 18, no. 5, pp. 775–789, 2013.

## ANEXO I: Resultados

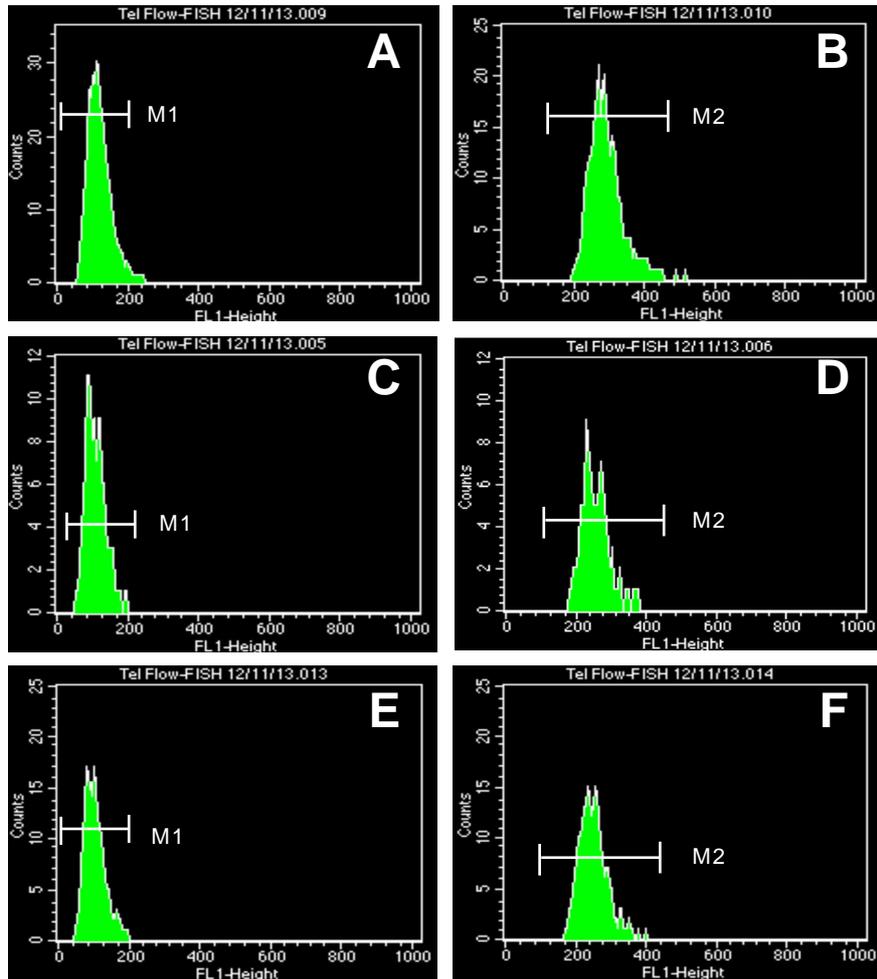
### A1) Tabla 1 complementaria de la sección 5.1.2 de Resultados

Identificación Cromosoma	Longitud total	Longitud Relativa (%)	Brazo Largo (q)	Brazo Corto (p)	Índice Braquial (L/C)	Índice Centromérico C/(L+C)	Clasificación Braquial	Clasificación Centromérica
34	69,456	5,526	53,794	15,661	3,435	22,549	Acrocéntrico	Acrocéntrico
12	60,455	4,810	50,126	10,330	4,853	17,087	Acrocéntrico	Acrocéntrico
10	58,515	4,655	50,704	7,811	6,491	13,349	Acrocéntrico	Acrocéntrico
8	55,126	4,386	47,708	7,418	6,431	13,457	Acrocéntrico	Acrocéntrico
3	41,641	3,313	33,275	8,365	3,978	20,089	Acrocéntrico	Acrocéntrico
37	41,584	3,308	35,020	6,564	5,336	15,784	Acrocéntrico	Acrocéntrico
25	46,185	3,674	43,150	3,035	14,216	6,572	Subtelocéntrico	Subtelocéntrico
6	41,151	3,274	38,306	2,845	13,465	6,913	Subtelocéntrico	Subtelocéntrico
7	34,488	2,744	29,243	5,246	5,575	6,698	Subtelocéntrico	Subtelocéntrico
41	33,319	2,651	31,088	2,232	13,930	6,698	Subtelocéntrico	Subtelocéntrico
27	37,643	2,995	29,108	8,534	3,411	22,672	Acrocéntrico	Acrocéntrico
36	31,531	2,509	26,145	5,386	4,854	17,082	Acrocéntrico	Acrocéntrico
26	32,854	2,614	30,167	2,687	11,226	15,210	Acrocéntrico	Acrocéntrico
17	29,444	2,342	24,306	5,138	4,731	17,449	Acrocéntrico	Acrocéntrico
28	27,883	2,218	23,419	4,463	5,247	16,008	Acrocéntrico	Acrocéntrico
4	27,543	2,191	23,997	3,546	6,767	12,875	Acrocéntrico	Acrocéntrico
5	26,480	2,107	16,247	10,233	1,588	20,897	Acrocéntrico	Acrocéntrico
31	25,385	2,020	22,816	2,569	8,882	10,120	Acrocéntrico	Acrocéntrico
29	28,026	2,230	24,498	3,529	6,943	12,590	Acrocéntrico	Acrocéntrico
40	23,860	1,898	12,786	11,074	1,155	13,586	Acrocéntrico	Acrocéntrico
35	22,588	1,797	13,061	9,527	1,371	10,120	Acrocéntrico	Subtelocéntrico
30	21,122	1,680	12,126	8,996	1,348	20,064	Acrocéntrico	Acrocéntrico
24	17,950	1,428	10,893	7,057	1,544	25,555	Submetacéntrico	Submetacéntrico
20	15,593	1,241	11,074	4,519	2,451	28,979	Submetacéntrico	Submetacéntrico
9	27,487	2,187	21,743	5,744	3,785	20,897	Submetacéntrico	Submetacéntrico
1	26,145	2,080	20,899	5,246	3,984	20,064	Submetacéntrico	Submetacéntrico
21	25,788	2,052	13,282	12,505	1,062	48,490	Metacéntrico	Metacéntrico
18	24,074	1,915	12,624	11,450	1,102	47,560	Metacéntrico	Metacéntrico
16	26,702	2,124	14,685	12,017	1,221	45,010	Metacéntrico	Metacéntrico
19	23,611	1,878	13,725	9,886	1,388	41,870	Metacéntrico	Metacéntrico
15	20,9889	1,670	11,5207	9,4682	1,2168	45,110	Metacéntrico	Metacéntrico
11	23,8603	1,898	12,7859	11,0744	1,1546	46,410	Metacéntrico	Metacéntrico
39	21,1224	1,680	12,1262	8,9962	1,3479	42,590	Metacéntrico	Metacéntrico

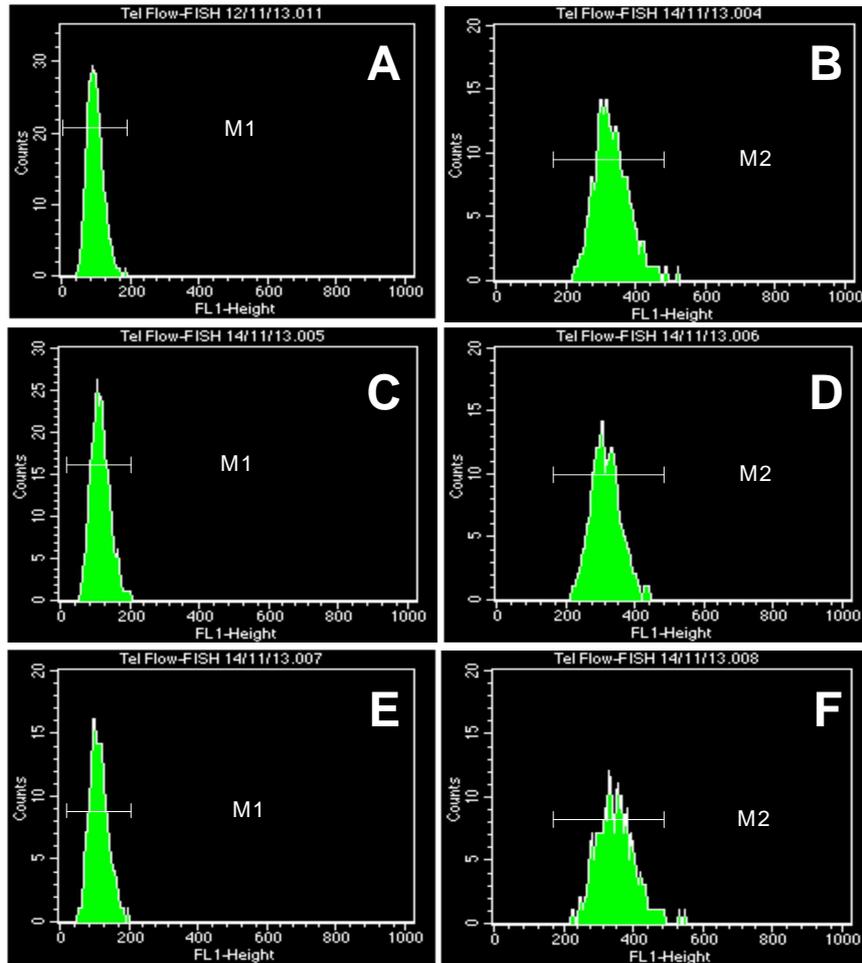
22	26,4797	2,107	16,2468	10,2329	1,5877	38,640	Metacéntrico	Metacéntrico
38	22,5877	1,797	13,0605	9,5272	1,3709	42,180	Metacéntrico	Metacéntrico
23	22,4418	1,785	12,9408	9,5010	1,3620	42,340	Metacéntrico	Metacéntrico
32	22,4418	1,785	12,9408	9,5010	1,3620	42,340	Metacéntrico	Metacéntrico
33	21,4158	1,704	12,3096	9,1062	1,3518	42,520	Metacéntrico	Metacéntrico
14	19,6700	1,565	9,9616	9,7084	1,0261	49,360	Metacéntrico	Metacéntrico
13	17,9501	1,428	10,8930	7,0572	1,5435	39,320	Metacéntrico	Metacéntrico
2 (sexual)	20,7165	1,648	14,6765	6,0400	2,4299	29,160	Acrocéntrico	Acrocéntrico
42 (sexual)	13,6601	1,087	11,4285	2,2317	5,1210	16,340	Acrocéntrico	Acrocéntrico

**Tabla 1: Clasificación de los cromosomas de células ADIPO-P2 de acuerdo a la ubicación del centrómero según la nomenclatura propuesta por Levan y cols. (1964), a partir del Índice braquial (Ib) y el Índice centromérico (IC). Largo (L), Corto (C). El orden de los cromosomas se realizó de acuerdo a la Longitud Relativa calculada con el Software MicroMeasure 3.3. Los números de cromosomas fueron asignados por el programa MicroMeasure 3.3 y se corresponden con las Figuras 6 y 7 de la sección de Resultados.**

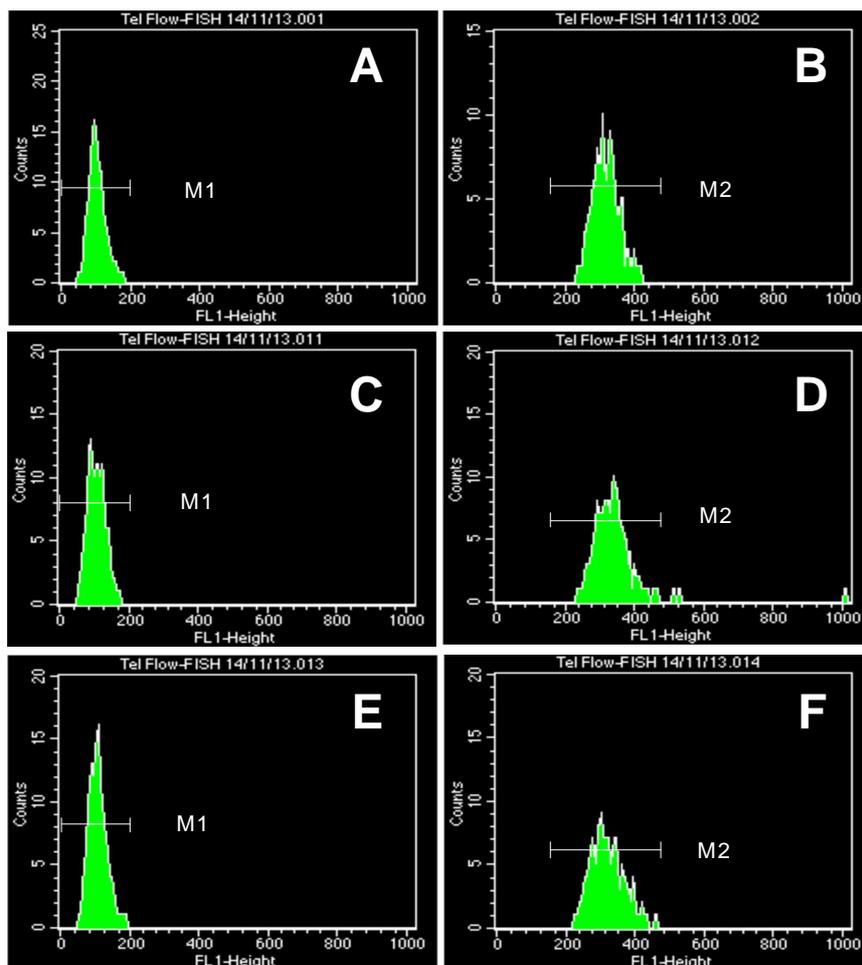
A2) Figuras complementarias de las secciones 5.3.1.2, 5.3.1.3 y 5.3.1.4 de Resultados.



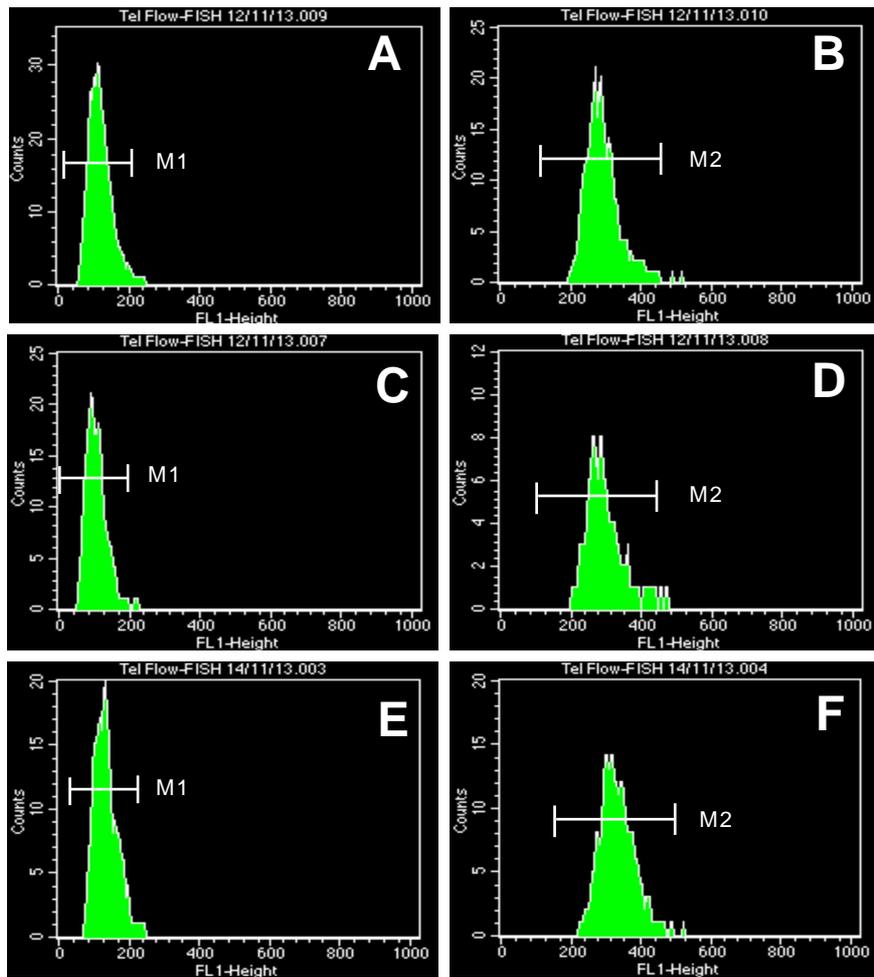
**Figura 1:** Histogramas de fluorescencia de células ADIPO-P2 sacrificadas a las 18 horas postratamiento con los mutágenos BLM y EN (A-F). (A-B) Controles (no expuestas), analizadas (A) sin sonda y (B) con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células sin sonda y con sonda fueron de 119,84 (M1) y de 291,08 (M2) respectivamente. (C-D) Células ADIPO-P2 expuestas a 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de BLM y (E-F) a 100  $\text{ng/ml}$  de EN, sacrificadas a las 18 horas postratamiento, respectivamente. (C-E) Muestras sin sonda telomérica, (D-F) muestras con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células tratadas con BLM sin y con sonda fueron de (B) 111,14 y (C) 259,52, respectivamente. En el caso de las células tratadas con EN, las medias obtenidas fueron (E) 103,59 y (F) 252,14.



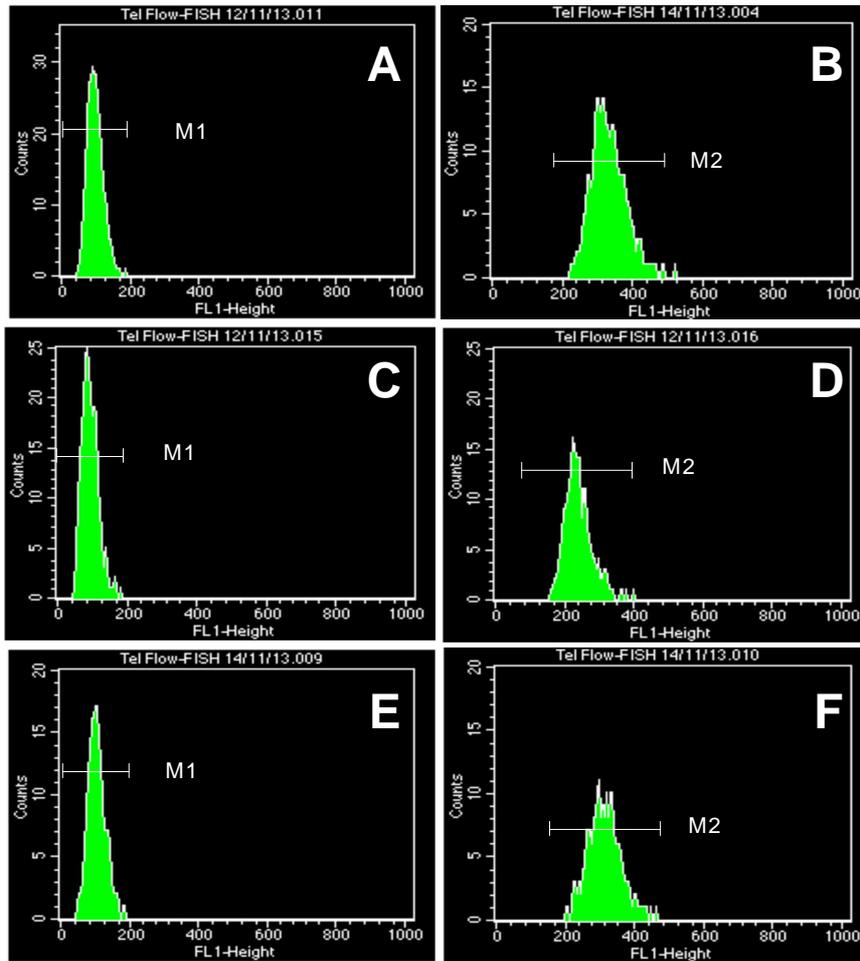
**Figura 2: Histogramas de fluorescencia de células ADIPO-P2 sacrificadas a los 10 días postratamiento con los mutágenos BLM y EN (A-F).** (A-B) Controles (no expuestas), analizadas (A) sin sonda y (B) con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células sin sonda y con sonda fueron de 98,74 (M1) y de 243,65 (M2) respectivamente. (C-D) Células ADIPO-P2 expuestas a 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de BLM y (E-F) a 100  $\text{ng/ml}$  de EN, sacrificadas a los 10 días postratamiento, respectivamente. (C-E) Muestras sin sonda telomérica, (D-F) muestras con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células tratadas con BLM sin y con sonda fueron de (B) 117,06 y (C) 319,45, respectivamente. En el caso de las células tratadas con EN, las medias obtenidas fueron (E) 114,30 y (F) 350,26.



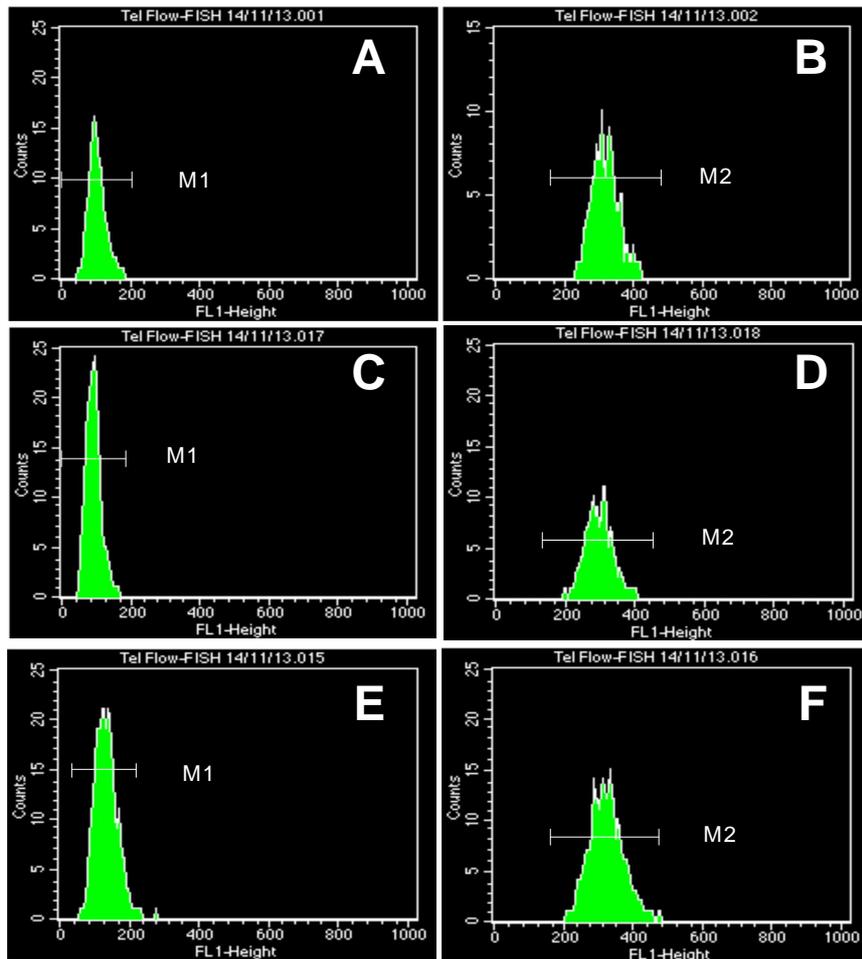
**Figura 3: Histogramas de fluorescencia de células ADIPO-P2 sacrificadas a los 15 días postratamiento con los mutágenos BLM y EN (A-F).** (A-B) Controles (no expuestas), analizadas (A) sin sonda y (B) con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células sin sonda y con sonda fueron de 103,49 (M1) y de 321,90 (M2) respectivamente. (C-D) Células ADIPO-P2 expuestas a 2,5 µg/ml de BLM y (E-F) a 100 ng/ml de EN, sacrificadas a los 15 días postratamiento, respectivamente. (C-E) Muestras sin sonda telomérica, (D-F) muestras con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células tratadas con BLM sin y con sonda fueron de (B) 109,67 y (C) 338,51, respectivamente. En el caso de las células tratadas con EN, las medias obtenidas fueron (E) 110,59 y (F) 325,41.



**Figura 4: Histogramas de fluorescencia de células ADIPO-P2 sacrificadas a las 18 horas postratamiento con EZ y *buffer* Citrato de Sodio utilizado como control negativo (A-F).** (A-B) Controles (no expuestas), analizadas (A) sin sonda y (B) con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células sin sonda y con sonda fueron de 119,84 (M1) y de 291,08 (M2) respectivamente. (C-D) Células ADIPO-P2 tratadas con 0,02 N de Citrato de Sodio y (E-F) a 2 mM de EZ, sacrificadas a las 18 horas postratamiento, respectivamente. (C-E) Muestras sin sonda telomérica, (D-F) muestras con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células tratadas con Citrato de Sodio sin y con sonda fueron de (B) 106,96 y (C) 297,26, respectivamente. En el caso de las células tratadas con EZ, las medias obtenidas fueron (E) 134,43 y (F) 332,61.



**Figura 5: Histogramas de fluorescencia de células ADIPO-P2 sacrificadas a los 10 días postratamiento con EZ y *buffer* Citrato de Sodio utilizado como control negativo (A-F).** (A-B) Controles (no expuestas), analizadas (A) sin sonda y (B) con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células sin sonda y con sonda fueron de 98,74 (M1) y de 243,65 (M2) respectivamente. (C-D) Células ADIPO-P2 tratadas con 0,02 N de Citrato de Sodio y (E-F) a 2 mM de EZ, sacrificadas a los 10 días postratamiento, respectivamente. (C-E) Muestras sin sonda telomérica, (D-F) muestras con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células tratadas con Citrato de Sodio sin y con sonda fueron de (B) 94,27 y (C) 241,74 respectivamente. En el caso de las células tratadas con EZ, las medias obtenidas fueron (E) 106,59 y (F) 313,50.



**Figura 6: Histogramas de fluorescencia de células ADIPO-P2 sacrificadas a los 15 días postratamiento con EZ y *buffer* Citrato de Sodio utilizado como control negativo (A-F).** (A-B) Controles (no expuestas), analizadas (A) sin sonda y (B) con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células sin sonda y con sonda fueron de 103,49 (M1) y de 321,90 (M2) respectivamente. (C-D) Células ADIPO-P2 tratadas con 0,02 N de Citrato de Sodio y (E-F) a 2 mM de EZ, sacrificadas a los 15 días postratamiento, respectivamente. (C-E) Muestras sin sonda telomérica, (D-F) muestras con sonda telomérica en el *buffer* de hibridación. Las medias registradas para las células tratadas con Citrato de Sodio sin y con sonda fueron de (B) 92,23 y (C) 297,32 respectivamente. En el caso de las células tratadas con EZ, las medias obtenidas fueron (E) 133,50 y (F) 326,19.

## ANEXO II: Materiales y Métodos

### A1) Protocolo de *Harvesting* o Sacrificio de Cultivos Celulares que crecen en monocapa.

1. Cultivar las células en estufa a 37°C en medio de cultivo D-MEM (10% de suero fetal bovino y 1% de glutamina) completo, sin agente mitogénico.
2. Durante la faz de crecimiento logarítmica, se realiza el tratamiento con el mutágeno correspondiente en las dosis y tiempos especificados en el apartado 2.1.3 de Materiales y Métodos.
3. Lavar las células 2-3 veces con solución salina de Hank's y se les agrega a cada cultivo 5 ml de medio fresco completo para que las células sigan en cultivo hasta la finalización del mismo.
4. Antes del sacrificio celular, se trata a las células con colchicina (0,1 µg/ml) durante 3 hs en la estufa a 37°C.
5. Retirar los frascos de la estufa y se vuelca su contenido en tubos cónicos de centrifuga etiquetados con su identificación correspondiente.
6. Lavar las células con solución salina de Hank's y agregar 1 ml. de tripsina-EDTA a cada frasco para levantar a las células.
7. Agregar aproximadamente 5 ml del medio contenido en los tubos correspondientes al cultivo en cuestión para inactivar la tripsina y colocar todo el material resuspendido en el tubo de centrifuga.
8. Centrifugar las muestras a 1.200 rpm durante 10 minutos.
9. Retirar el sobrenadante dejando 1 ml. de medio de cultivo y agregar 3 ml. de agua destilada en cada tubo (Solución hipotónica = agua destilada / medio 3:1). vortexear las muestras. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Agregar 2 ml. de fijador (metanol/ácido acético 3:1) a cada tubo, se vortexear y centrifugar a 1.200 rpm por 10 minutos.
11. Retirar el sobrenadante, dejando solamente el sedimento celular o "pellet" en cada tubo y agregar 5 ml. de fijador.
12. Vortexear y centrifugar las muestras a 1.200 rpm por 10 minutos.
13. Repetir el paso anterior dos o más veces, hasta que el "pellet" quede blanco.
14. Conservar los tubos en heladera a 4°C hasta la realización de los extendidos cromosómicos.

## A2) Protocolo de Hibridación *in situ* con sonda pantelomérica de PNA (PNA-FISH)

- **Pre-Tratamiento:**

1. Sumergir el preparado cromosómico en 40 ml de PBS 1X durante 2 minutos en Coplin.
2. Transferir los preparados a 3,7% de formaldehído en PBS durante 2 minutos
3. Lavar los portaobjetos en PBS 1X (1) y luego en PBS 1X (2), 5 minutos en cada uno.
4. Sumergir las muestras en Solución de Pre-tratamiento (Buffer de Proteinasa K\*) durante 7 minutos.
5. Lavar los portaobjetos en PBS 1X (3) y luego en PBS 1X (4), 5 minutos en cada uno.
6. Sumergir las muestras en etanol 70%, 85% y 100% a 4°C, 2 minutos en cada uno.
7. Dejar los portaobjetos en posición vertical hasta que se hayan secado por completo.

- **Desnaturalización e Hibridación:**

1. Distribuir aproximadamente 6  $\mu$ l de la sonda Cy3 PANAGENE (200 nM), disuelta en *Buffer* de Hibridación\*\* sobre los portaobjetos. Cubrir la zona marcada con la sonda con cubreobjeto de 24 x 50mm. Sellar los bordes del cubreobjetos con *rubber cement*.
2. Incubar las muestras a 85°C durante 10 minutos.
3. Incubar las muestras en cámara húmeda en oscuridad durante una hora.
4. Sumergir los portaobjetos en PBS 1X durante 1 minuto para remover los cubreobjetos

- **Lavados y Montaje:**

1. Lavar dos veces los preparados en Solución de Lavado\*\*\* con 0.1 % de Tween 20 precalentada en baño a 58°C durante 10 minutos cada uno, agitando el Coplin cada tanto.
2. Sumergir los preparados en la serie de etanoles (70%, 85% y 100%), a 4°C durante 2 minutos en cada uno.
3. Dejar los portaobjetos en posición vertical hasta que se hayan secado por completo en oscuridad.

4. Colocar una gota del *antifade* y de la contra-tinción diamidino-2-phenylindole (1:1) (DAPI) (1,5 µg/ml) (VECTASHIELD®);. Colocar un cubreobjetos de 24 x 50 mm y sellar los bordes con esmalte de uñas.
5. Dejar actuar la contra-tinción por aproximadamente 15 minutos en la oscuridad antes de analizar las muestras en el microscopio de fluorescencia.

**Soluciones utilizadas para FISH:**

\*Buffer Proteinasa K:

Tris-HCL 20 mM;  
CaCl dihidratado 0,2 mM

\*\*Buffer de Hibridación:

Tris 20 mM;  
NaHPO<sub>4</sub> 20 mM;  
formamida 60%;  
2x SSC; pH: 7,4.

\*\*\* Solución de Lavado (2XSSC):

NaCl 300 mM;  
Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 30 mM;  
0,1% Tween 20  
0.02% azida sódica;  
pH: 7,4

**A3) Protocolo de Tel-Flow-FISH:**

1. Descongelar muestras a 37°C en baño térmico. Homogeneizar con pipeta Pasteur y pasar a tubos Falcon de 15 ml con 5 ml de medio de cultivo.
2. Centrifugar 5 min a 1500 rpm. Descartar sobrenadante.
3. Resuspender en 3 ml de PBS con 0,1% de BSA.
4. Filtrar en membranas de 50 micras y centrifugar 5 min 1500 rpm.
5. Resuspender en 950 µl de PBS con 0,1% de BSA.
6. Contar células en cámara de Neubauer.
7. Agregar la cantidad de células a utilizar en epp de 1.5ml. Centrifugar a 3000 rpm durante 8 min. Obtener un pellet seco usando papel si es necesario.
8. Agregar 300µl del *buffer* de hibridación (pre-calentar la solución a 37°C). Agregar 0,33 µl de sonda PNA Bio Inc. (0,3 µg/ml).
9. Desnaturalización: Baño a 87°C durante 15 min (a gitar aprox. cada 5 min).
10. Incubar overnight en oscuridad a temperatura ambiente o en baño a 20-25 °C.
11. Resuspender las células en 1 ml de wash buffer, vortexear e incubar a 40°C en baño de agua durante 15 min.

12. Centrifugar 5 min a 10000 rpm. Descartar sobrenadante. Resuspender en 425 µl del buffer (PBS, 0,1% BSA). Pasar a tubos de citometría.
13. Agregar 25 µl de ARNasa y 5,5 µl de Ioduro de Propidio (IP, Stock: 1 mg/mL). Incubar a temperatura ambiente 15 min.
14. Analizar las células en el citómetro. Potencia LASER: 100mW. Escala lineal en FL1.

Ajustes en el Citómetro:

A: Muestra sólo con IP

B: Muestra con sonda resuspendida en PBS 0,1% BSA + IP

Utilizamos 500.000 células en cada ensayo. Lavado opcional: PBS 0,1% BSA

**A4) Obtención de esplenocitos de *Mus musculus***

1. Extraer el bazo de ratones machos de C57BL/6 (*Mus musculus*) de un mes de edad y colocarlos en Solución de digestión\* durante 20-30 minutos.
2. Cortar el bazo en pequeños trozos en Caja de Petri estéril con tijera y pinza (flameadas en el mechero)
3. Filtrar la solución obtenida en membranas de 50 micras y coleccionar la solución en tubos Falcon estériles de 15 ml. Realizar este paso varias veces hasta obtener una solución homogénea.
4. Observar el estado de las células obtenidas en Cámara de Neubauer al microscopio óptico para corroborar que no haya "clumps" o cúmulos de células.
5. Centrifugar el homogenato de células obtenido a 1200 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante.
6. Resuspender el pellet de células en medio RPMI 10% SFB.
7. Centrifugar 5 min a 1000 rpm. Descartar sobrenadante. Agregar 1,6 ml del medio de cultivo en RPMI 10% SFB, homogeneizar y pasarlo a criotubos de 2 ml. Agregar 200 µl de dimetil sulfóxido (DMSO) puro y congelar a -80°C rápidamente.

\* Solución de Digestión

RPMI 5 % SFB (Suero Fetal Bovino)

Heparina 10.000 U/ml

DNAasa 0,011mg/ml

**A5) Detección de la actividad de la enzima telomerasa mediante el *Kit* TRAPeze-RT™ (*Telomeric repeat amplification protocol*) de Chemicon (EE.UU).**

1. Descongelar el pellet de células guardadas a - 80 °C. Resuspenderlas inmediatamente en el *buffer* de lisis CHAPS, incluido en el kit. Resuspender el pellet en 100µl de buffer de lisis CHAPS por cada 10<sup>5</sup>/10<sup>6</sup> células.
2. Incubar la suspensión celular por 30 min en hielo.
3. Centrifugar a 12000 g en microcentrífuga durante 20 min a 4 °C.
4. Transferir 80 µl del sobrenadante a un tubo nuevo y congelar rápidamente, utilizando hielo seco en ultrafreezer de -80 °C.
5. Tomar una alícuota determinar la concentración de proteínas.

**A6) Determinación de la concentración de proteínas**

La cuantificación de la concentración proteica se realizó utilizando el *Kit Quant-iT Protein Assay* de Invitrogen. El protocolo se detalla a continuación:

1. Preparar la solución de trabajo a partir de la dilución 1:200 del reactivo *Quant-iT™*

*Protein* en el *buffer Quant-iT™*. Se utilizaron 200 µl de la solución de trabajo para cada muestra y los reactivos standards (incluidos en el *Kit*) utilizado para realizar la curva de concentración standart en el Qubit Fluorometer 2.0 (Invitrogen). Los tubos de ensayo utilizados en las mediciones, se prepararon según el siguiente cuadro:

	<b>Reactivos Standart</b>	<b>Muestra para medir</b>
Volumen a agregar de la Solución de trabajo	190µl	190µl
Volumen a agregar de la solución standart del <i>Kit</i>	10µl	---
Volumen a agregar de la muestra	---	1-20 µl
Volumen Final	200µl	200µl

2. Vortexear los tubos 2-3 segundos

3. Incubar los tubos 15 minutos a temperatura ambiente (TA).
4. Realizar la lectura de los tubos en el Fluorómetro.
5. Multiplicar los valores obtenidos en las mediciones del Qubit ( $\mu\text{l/ml}$  o  $\text{ng/ml}$ ) por el factor de dilución para determinar la concentración de la muestra original. Para calcular la concentración de la muestra, se realizó la siguiente ecuación, tal como lo describe el proveedor del *Kit Quant-iT Protein Assay* de Invitrogen.  
Concentración de la muestra= Valor QF x (200/x)  
QF: Lectura del Qubit Fluorometer.  
X:  $\mu\text{l}$  de la muestra que fueron agregados al tubo.

#### **A7) Protocolo de extracción de ARN a partir de tejidos.**

1. Colocar 300  $\mu\text{l}$  de Trizol™ (Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU.) en tubos estériles y mantenerlos en hielo hasta la toma de muestras.
2. Homogeneizar la muestra con puntas de teflón e incubar 5 min a temperatura ambiente (TA).
3. Agregar 60  $\mu\text{l}$  de cloroformo, agitar durante 15 min e incubar 2-3 min a TA.
4. Centrifugar a 12000g durante 15 min a 4°C. Se obtienen las siguientes fases:
  - Fase Acuosa: ARN
  - Interfase: ADN y Proteínas
  - Fase Fenólica Inferior: ADN y Proteínas
5. Trasferir la fase acuosa a otro tubo.
6. Agregar 150  $\mu\text{l}$  de isopropanol. Mezclar e incubar 5 min a TA (Puede ser ON si hay poco ARN en la muestra)
7. Centrifugar a 12000g durante 10 min a 4°C. Precipita en ARN (botón blanco).
8. Remover el sobrenadante.
9. Lavar el pellet con 300  $\mu\text{l}$  de etanol 75% y mezclar.
10. Centrifugar a 7500g durante 10 min a 4°C.
11. Secar a TA durante 10-15 min.
12. Resuspender en 15  $\mu\text{l}$  de agua destilada.
13. Incubar a 55-60°C durante 15 min y guardar a -80°C.

#### **A8) Protocolo de síntesis de ADN copia (ADNc) a partir de ARN, utilizando la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (RT) (Thermo Fisher Scientific, West Palm Beach, FL, EE.UU.).**

1. Utilizar 1  $\mu$ l de ARN total. Stock (500ng/  $\mu$ l)

	<b>Reactivos</b>
ARN total (500ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<i>Random Primers</i> (250ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Completar el volumen con <i>PCR Grade Water</i>	11 $\mu$ l
Volumen Final	13 $\mu$ l

2. Llevar a 65°C durante 5 min. Spin y colocar las muestras en hielo
3. Agregar 4  $\mu$ l del 5x *Reaction Buffer*
4. Agregar 2  $\mu$ l de dNTPs (10mM)
5. Agregar 1  $\mu$ l de la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (RT) (Thermo Fisher Scientific, West Palm Beach, FL, EE.UU.).
6. Darles un spin e incubar 10 min a 25°C.
7. Incubar a 42°C durante 60 min.
8. Incubar a 70°C durante 10 min.

**A9) Detección de los productos de amplificación utilizando 5x HOT FIREPol®, Evagreen®, qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne, Estonia).**

1. Preparar la solución Mix de trabajo, según la siguiente tabla:

	<b>Volumen</b>	<b>Concentración Final</b>
5x HOT FIREPol®, Evagreen®	4 µl	1 x
Mix de <i>Primers</i> (Forward/Reverse) (25 µM)	0,2 µl	0,25 µM
Templado de ADNc	1 µl	25 ng/ µl
PCR <i>Grade Water</i>	Hasta 20 µl	
Volumen Final	20 µl	

El programa de ciclado se realizó de acuerdo a lo detallado en la sección 4.2.1.3 del apartado de Materiales y Métodos.