



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
PEDECIBA - ÁREA BIOLÓGICA**

**TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
OPCIÓN GENÉTICA**

*Identificación de un mecanismo de segregación y eliminación de un cromosoma supernumerario en núcleos de células trisómicas humanas*

Lic. Ana Laura Reyes Ábalos

Director: Dra. Adriana Mimbacas

Co-Director: Dr. Gustavo A. Folle

Tribunal:

Dr. José Badano

Dra. Rossana Bonomi

Dra. Cristina Mazzella



---

## **AGRADECIMIENTO**

Dra. Adriana Mimbacas  
Dr. Gustavo A. Folle

Dr. José Badano  
Dra. Rossana Bonomi  
Dra. Cristina Mazzella

Dra. Graciela Piwien-Pilipuk  
Dra. Judith Toneatto

Dra. Gabriela Casanova

Dra. Silvia Villar

Dra. Alejandra Kun

Dr. Hugo Giordano

Mag. Laura Lafon-Hughes

Téc. Anat. Pat. Ricardo Larraya

A todos los compañeros del Departamento de Genética del IIBCE

A mi familia que siempre su apoyo incondicional

A mi Santo Padre que me da el ánimo diario

---

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	10
1.1 Arquitectura nuclear .....	10
1.2 Dinámica nuclear .....	15
1.3 Territorios cromosómicos y modelos de arquitectura nuclear .....	17
1.4 La línea celular HL60 .....	19
1.5 El ácido retinoico.....	24
1.6 El cromosoma X inactivo .....	26
1.9 Mecanismos de eliminación de núcleos y cromosomas .....	29
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	34
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	34
3.1 Objetivo general.....	34
3.2 Objetivos específicos .....	34
<b>4. MATERIALES y MÉTODOS</b> .....	36
4.1 Diferenciación <i>in vitro</i> de granulocitos de HL60 .....	36
4.1.1 Cultivos celulares de la línea HL60.....	36
4.1.2 Citometría de Flujo.....	37
4.1.3 Recolección y fijación de las células para <i>FISH</i> .....	38
4.2 Hibridación <i>in situ</i> fluorescente de ADN ( <i>FISH</i> -ADN) .....	38
4.2.1 Generación de sondas de ADN <i>WCP</i> para TC #18 y #19 .....	38
4.3 <i>FISH</i> en núcleos interfásicos .....	43
4.3.2 Análisis por microscopía confocal y de epifluorescencia .....	44
4.3.3 Procesamiento y análisis de imágenes.....	45
4.4 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	47
4.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y barrido (MEB) .....	49
4.5.1 Fijación de granulocitos de HL60.....	49
4.5.2 Preparación de cubreobjetos para MEB .....	49
4.5.3 Procesamiento de muestras biológicas para MEB.....	49
4.5.4 Procesamiento de muestras biológicas para MET .....	51
4.5.5 Adquisición de imágenes en MEB y MET .....	52

4.6	Microdissección y captura LASER.....	52
4.6.1	Extracción de ARN total.....	53
4.6.2	Conversión a ADNc por RT- PCR.....	53
4.6.3	Amplificación de secuencias del gen satélite mayor .....	53
4.6.4	Extracción de ARN de cultivos de HL60 y amplificación de ADNc copia .....	54
4.6.5	Conversión a ADNc por RT-PCR.....	55
4.6.6	Amplificación por PCR a tiempo final.....	55
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	56
5.1	Diferenciación de la línea HL60 con <i>ATRA</i> .....	56
5.2	Mapeo de los TC #18 y #19 en núcleos de HL60.....	60
5.3	Caracterización de las etapas del proceso de eliminación .....	67
5.4	Análisis de parámetros estereológicos y posicionales de TC #18 y #19.....	69
5.5	Perfiles de intensidad del contenido de laminas tipo A-C y B .....	73
5.6	Análisis estructural y ultraestructural de células HL60.....	77
5.7	Obtención de ARN total de núcleos completos y protrusiones de la envoltura nuclear.....	82
6.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	87
6.1	Diferenciación de HL60 a granulocitos maduros.....	87
6.2	Eliminación de un TC #18 en un entorno trisómico.....	87
6.3	Parámetros estereológicos y posicionales de los TC.....	88
6.4	Plasticidad de la arquitectura nuclear .....	89
6.5	Caracterización ultraestructural de células HL60 diferenciadas .....	91
6.6	Microdissección LASER (MDL) de núcleos de HL60 diferenciados.....	92
7.	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	94
8.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	95
	<b>ANEXO</b> .....	106

---

## Lista de abreviaturas

<b>AC</b>	Aberraciones cromosómicas
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNasa</b>	Ribonucleasa
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ATRA</b>	All Trans Retinoic Acid
<b>BrEt</b>	Bromuro de Etidio
<b>CB</b>	Corpúsculo de Barr
<b>CF</b>	Citometría de flujo
<b>CI</b>	Compartimento intercromatínico
<b>CPN</b>	Células progenitoras
<b>CNVs</b>	Copy number variations
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DEP</b>	Dilatación del espacio perinuclear
<b>ELCS</b>	Envelope Limited Chromatin Sheets
<b>EN</b>	Envoltura Nuclear
<b>ES</b>	Error estándar
<b>FISH</b>	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
<b>GISH</b>	Genome <i>In Situ</i> Hybridization
<b>GLF</b>	Modelo de bucle gigante de cromatina
<b>HC</b>	Heterocromatina constitutiva
<b>HDACs</b>	Deacetilasas de histonas
<b>HF</b>	Heterocromatina facultativa
<b>HPTMs</b>	Histone post translational modifications
<b>HL60</b>	Línea celular promielocítica humana
<b>ICN</b>	Modelo de red intercromatínica
<b>LRI</b>	Modelo de interacción de largo alcance
<b>MACs</b>	Macrocromosomas
<b>MC</b>	Microscopía confocal

<b>MICs</b>	Microcromosomas
<b>MDL</b>	Microdissección LASER
<b>MEB</b>	Microscopía electrónica de barrido
<b>MET</b>	Microscopía electrónica de transmisión
<b>NOR</b>	Región organizadora del nucleolo
<b>NPC</b>	Complejo de poro nuclear
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RAR</b>	Receptor de ácido retinoico
<b>RARE</b>	Elemento de respuesta a ácido retinoico
<b>RNP</b>	Partículas de ribonucleoproteína
<b>RP</b>	Región pericromatínica
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa empleando transcriptasa reversa
<b>RXR</b>	Receptor del retinoide X
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>SWI/SNF</b>	Complejo remodelador de la cromatina
<b>TAE</b>	Buffer tris-acético
<b>TBE</b>	Buffer tris-borato-EDTA
<b>TC</b>	Territorio cromosómico
<b>TC #18</b>	Territorio cromosómico #18
<b>TC #19</b>	Territorio cromosómico #19
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>WCP</b>	Whole chromosome probe
<b>Xa</b>	Cromosoma X activo
<b>Xi</b>	Cromosoma X inactivo
<b>Xic</b>	Centro de inactivación del X
<b>Xist</b>	Transcripto específico de inactivación del X
<b>XIST</b>	Gen que codifica para <i>Xist</i>

---

## RESUMEN

El núcleo de las células de vertebrados es una estructura compleja, altamente organizada y plástica con territorios cromosómicos (TC) bien definidos rodeados por el compartimiento intercromatínico. La heterocromatina se localiza en la periferia nuclear mientras la eucromatina mapea en las regiones centrales. En hembras de mamíferos uno de los cromosomas X sufre un proceso de condensación e inactivación (Xi) como resultado de modificaciones postraduccionales de histonas, generación de ARN *Xist*, incorporación de la variante histónica macroH2A y unión de la proteína HP1. En granulocitos humanos Xi es extruido del núcleo polilobulado generando una estructura denominada "palillo de tambor".

La línea celular promielocítica humana HL60 presenta la t(5:17) con reordenamiento del receptor *ATRA* entre otras translocaciones y una trisomía del cromosoma #18. El tratamiento de las células HL60 con ácido retinoico (*ATRA*) induce su diferenciación a granulocitos con polilobulación nuclear (HL60-*ATRA*).

Los objetivos del presente trabajo se enfocaron en verificar la existencia de un proceso inducible en la línea HL60 capaz de segregar y eliminar uno de los cromosomas 18 a través de modificaciones de la estructura nuclear. Paralelamente, se estudiaron las modificaciones estructurales y ultraestructurales a nivel de la cromatina y la envoltura nuclear inducidas por *ATRA*. El abordaje experimental incluyó cultivos celulares, citometría de flujo, inmunomarcación de laminas, FISH interfásico, microscopía confocal (MC), microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB) y microdissección LASER.

Los estudios citométricos revelaron una importante disminución de las fases S/G2/M en las poblaciones HL60-*ATRA* (16%) en comparación con los controles tratados con PBS o DMSO (48% y 54%, respectivamente), confirmando el alto grado de diferenciación con acumulación de células en G1/G0 (84%). El empleo de marcadores específicos de blastos (CD13) y granulocitos (CD11b) permitió comprobar la diferenciación inducida por *ATRA*. Con este ensayo se evidenció un claro incremento del marcador CD11b en la población diferenciada.

Se elaboraron sondas de elevada especificidad para detectar los TC #18 y #19 para los experimentos de FISH interfásico. La hibridación de las sondas a núcleos polilobulados de células HL60-*ATRA* (n = 872) reveló la existencia de un proceso (T

II a T VII) de condensación y segregación hacia un lóbulo periférico de un TC #18 que prosigue con su inclusión en una protrusión nuclear y la formación de una estructura similar al “palillo de tambor”. Este proceso, que en sus fases T IV a T VII involucró al 16,63% de las células HL60-*ATRA* analizadas, finaliza con la eliminación del TC #18. Las células control (DMSO, n = 2165) mostraron, en un bajo porcentaje (1,15%), un comportamiento similar de un TC #18 en las mismas fases.

El análisis de las imágenes obtenidas por MC permitió determinar que el TC #18 extruido presentaba una mayor distancia respecto a los restantes TC. Asimismo, el TC #18 en proceso de eliminación mostró menor área y mayor grado de circularidad comparado a los otros TC ponderados para el análisis.

La inmunolocalización de laminas mostró escasa presencia de lamina A/C y un marcado enriquecimiento en lamina B en núcleos control y HL60-*ATRA*, particularmente a nivel de las protrusiones y los micronúcleos originados como consecuencia de la eliminación del TC #18 supernumerario. La riqueza en lamina B otorga mayor plasticidad de la envoltura nuclear lo cual promovería la formación de protrusiones.

Los ensayos de MET evidenciaron la producción de protrusiones de menor tamaño a las observadas por MC y de dilataciones del espacio perinuclear vinculadas a los poros (PN) y ocupadas por cuerpos nucleares o material amorfo o fibrilar. Los estudios desarrollados con MEB mostraron la presencia de notorias invaginaciones de la membrana plasmática que parecen correlacionarse con los profundos cambios morfológicos que experimentan las células HL60 en presencia de *ATRA*.

Finalmente, se logró implementar una metodología para la obtención de muestras de protrusiones nucleares a través de microdissección LASER que permitirá profundizar el conocimiento sobre las propiedades de estas peculiares estructuras.

En suma, se verificó la existencia de un mecanismo original no reportado hasta el presente que involucra la eliminación, al parecer de carácter selectivo, de un cromosoma en condición trisómica inducida por *ATRA* en células HL60. El proceso de diferenciación granulocítica inducido sería clave para modificar las características morfológicas del núcleo y la generación de protrusiones mediante la remodelación de la EN sumada a cambios en la composición en laminas promoviendo su mayor plasticidad y flexibilidad. Los estudios por MET y MEB mostraron complejas estructuras (protrusiones y DEP) similares a las observadas por MC que corroboran

la elevada plasticidad tanto del núcleo como de la EN. Futuras investigaciones permitirán determinar el grado de similitud del proceso analizado con el correspondiente a la inactivación del cromosoma X (modificaciones epigenéticas, incorporación de variantes histónicas, ARNs no codificantes, proteínas represoras) y la presencia de este peculiar proceso en leucemias promielocíticas que exhiben otros cromosomas en condición trisómica.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Arquitectura nuclear

La mayoría de la información sobre la organización cromosómica deriva de estudios realizados sobre una estructura transitoria en la cual la cromatina alcanza su grado más elevado de condensación: el cromosoma metafásico. Sin embargo, funciones básicas en los núcleos eucariotas tales como la replicación y reparación del ADN sumados a la transcripción y procesamiento del ARN se producen durante la interfase del ciclo celular (Iborra *et al.* 2001; Spector *et al.* 2003). La arquitectura nuclear y la organización de los cromosomas en interfase siguen siendo estructuras poco conocidas a pesar de recientes progresos hacia la comprensión de su compleja configuración y función (Cremer *et al.* 2010).

La posibilidad de realizar estudios microscópicos avanzados sobre la arquitectura del núcleo celular se deben, en gran medida, al desarrollo de sondas para la detección de regiones específicas de la cromatina y dominios no cromatínicos en forma multicolor. Las herramientas incluyen sondas de ADN de variada complejidad para revelar la organización y posición de regiones específicas de la cromatina y dominios subcromatínicos preservando la disposición espacial del material nuclear (Cremer *et al.* 2010; Capodieci *et al.* 2005; Solovei *et al.* 2002). La técnica de *FISH* (*Fluorescence In Situ Hybridization*) en tres dimensiones (*FISH-3D*) empleando sondas de ARN ha permitido no sólo la identificación de patrones topográficos de la transcripción nuclear global, sino también mapear genes transcripcionalmente activos (Cremer *et al.* 2003).

Actualmente se acepta que la arquitectura del núcleo interfásico, desempeña un papel crítico en numerosos procesos nucleares tales como: la modulación de la transcripción, regulación del desarrollo embrionario, replicación y reparación del ADN, apoptosis, rearrreglos cromosómicos y envejecimiento celular (Leitch 2000; Foster y Bridger 2005; Misteli y Soutoglou 2009; Rouquette *et al.* 2010; Rajapakse y Groudine 2011).

Por otro lado, la aplicación del *FISH* interfásico a nivel clínico ha colaborado en mejorar la precisión diagnóstica de las aberraciones cromosómicas (AC) presentes

en individuos con malformaciones congénitas, retardo mental, enfermedades neurológicas, infertilidad o enfermedades neoplásicas (Yurov *et al.* 2013).

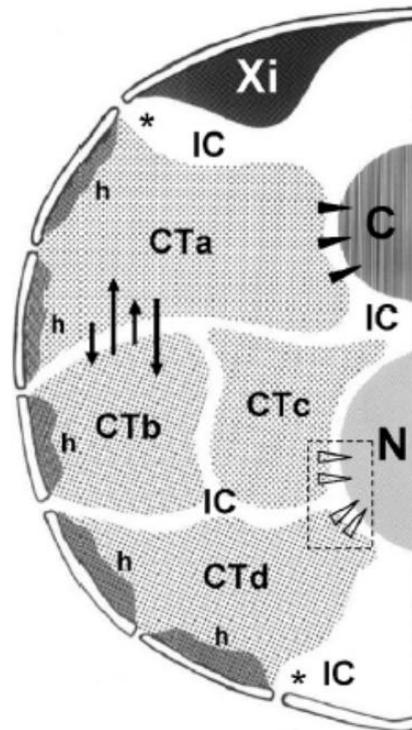
Los núcleos eucariotas son altamente compartimentalizados y se organizan en discretos dominios o territorios cromosómicos (TC) tridimensionales. Durante la interfase, los cromosomas de plantas, levaduras y *Drosophila* se organizan en una configuración denominada de *Rabl* en la cual los telómeros y centrómeros se congregan en lados opuestos del núcleo. Por el contrario, los núcleos de vertebrados exhiben una disposición radial de sus cromosomas durante la interfase. Esta particular organización no es estocástica aunque han sido observadas variaciones de acuerdo a la forma y tipo celular, grado de diferenciación, presencia de AC, senescencia y transformación. Los cromosomas ricos en genes tienden a ubicarse en la parte interior de los núcleos, mientras que los pobres en genes mapean en la periferia nuclear (Bolzer *et al.* 2005; Croft *et al.* 1999).

El posicionamiento de los diferentes tipos de cromatina (heterocromatina constitutiva y facultativa, eucromatina) refleja la disposición de los cromosomas de acuerdo a su riqueza en genes en el interior nuclear. Así, la heterocromatina facultativa (HF) y constitutiva (HC) residen en la periferia nuclear aunque esta última también se ubica en torno a los nucléolos y en los cromocentros. La eucromatina, en cambio, ocupa el interior del núcleo (Figura 1).

Un ejemplo bien documentado al respecto lo ofrecen los cromosomas humanos #18 (pobre en genes, 77 Mb, 4.3 genes por Mb) y #19 (rico en genes, 63 Mb, 5 veces más genes por Mb) (Tanabe *et al.* 2002). Este peculiar posicionamiento interfásico muestra un alto grado de conservación a lo largo de la evolución pues otros primates presentan los mismos patrones topológicos de distribución intranuclear de estos cromosomas (Habermann *et al.* 2001). Otros cromosomas humanos de elevada riqueza génica (#17, #22) o pobres en genes (#4, #13) presentan una similar ubicación nuclear (Heride *et al.* 2010).

Por otro lado, se ha observado una tendencia de los cromosomas más pequeños a posicionarse en las regiones centrales del núcleo celular. Esta configuración nuclear relacionada al tamaño cromosómico ha sido elegantemente demostrada en fibroblastos de pollo mediante *FISH* utilizando sondas para minicromosomas (MICs, ricos en genes) y macrocromosomas (MACs, pobres en genes) (Grandy *et al.* 2002). Los estudios desarrollados por Küpper *et al.* (2007) demostraron que el factor

principal para la localización de los TCs en el núcleo es la densidad génica y no el nivel transcripcional (Osborne *et al.* 2004).



**Figura 1.-** Esquema de la estructura compartimentada del núcleo de una célula eucariótica. Se representan cuatro territorios cromosómicos (CTa-d), un cromocentro (C), el nucléolo (N) y el cromosoma X inactivo o corpúsculo de Barr (Xi). Los entornos heterocromáticos de escasa o nula transcripción se localizan en la periferia nuclear (h), cromocentro y región perinucleolar. Xi replica tardíamente mientras que la cromatina rica en genes replica en forma temprana y habita el interior nuclear. Los poros nucleares se conectan con el compartimiento intercromatínico (CI) y pueden vincularse a factorías transcripcionales (asteriscos). La organización de los CT es radial y se distribuyen en el volumen nuclear de acuerdo a su riqueza génica y tamaño. CTa corresponde a un cromosoma de mayor tamaño con dominios heterocromáticos represores asociados a la membrana nuclear o integra parte del cromocentro (triángulos negros). Los cromosomas pobres (CTb) y ricos en genes (CTc) residen en la periferia y el interior nuclear, respectivamente. CTd y CTc poseen regiones organizadoras del nucléolo (NOR, triángulos blancos). Los bucles de cromatina activa mapean mayoritariamente en la superficie de los CT y protruyen en el CI. La interrelación entre subdominios limítrofes de CTa y CTb, sumado a la movilidad de loci génicos hacia regiones de alta expresión génica (*gene expression neighbourhoods*) vía la formación de bucles de cromatina de largo alcance (*giant loops*) se indican mediante flechas negras cortas y largas, respectivamente. Tomado de Folle (2008).

La estructura de los núcleos de mamíferos es sumamente plástica. Los fotoreceptores (bastones) de la retina de animales de hábito nocturno presentan una distribución invertida de la eucromatina y heterocromatina. En estas peculiares células la HC ocupa la región central del núcleo conformando un único cromocentro rodeado de HF. La eucromatina se ubica en la periferia nuclear. Este particular ordenamiento del núcleo obedecería a la necesidad de lograr un pasaje más eficiente de la luz a través de las estructuras nucleares de los fotoreceptores. Dicha reorganización nuclear aumentaría la capacidad de visión en la oscuridad lo cual es crítico para la supervivencia en estas condiciones (Solovei *et al.* 2009). Otro ejemplo lo constituyen los granulocitos que experimentan cambios radicales en la estructura del núcleo durante su diferenciación, alcanzando una forma polilobulada a partir de la forma ovoide inicial (Olins *et al.* 2001).

Por otro lado, los cambios numéricos y estructurales de los cromosomas observados tanto en individuos como en líneas celulares demuestran la capacidad del núcleo celular para manejar modificaciones drásticas en la cantidad y ordenamiento de la información genética que alberga (Harewood *et al.* 2010).

Los genes también muestran un patrón no aleatorio de ubicación dentro del volumen nuclear en interfase. Dos factores parecen determinar la posición de los genes: a) la existencia de regiones de alta densidad génica y; b) la actividad transcripcional. Los genes activos muestran una tendencia a residir en regiones centrales del núcleo y los inactivos hacia la periferia. De manera análoga, los loci génicos pueden reubicarse en el interior nuclear para su activación o dirigirse hacia zonas heterocromáticas para su silenciamiento. Las regiones eucromáticas y heterocromáticas poseen modificaciones epigenéticas características como acetilación de H3 y H4 y metilación de H3K9, H3K27 o H4K20 que contribuyen al grado de expresión o silenciamiento de la información genética (Cremer *et al.* 1993; Bártová *et al.* 2008). La proximidad espacial en una región central del núcleo podría facilitar la coordinación temporal de la transcripción de varios genes, independientemente de su ubicación en diferentes cromosomas. Esta organización contribuiría a establecer una topografía dinámica de la cromatina con alta capacidad de adaptación a los requisitos celulares (Shopland *et al.* 2006; Spilianakis *et al.* 2005; Maraldi *et al.* 2005). Una serie de estructuras anclan segmentos de cromatina pobre en genes a la lámina nuclear a través de una compleja interacción entre proteínas de la membrana nuclear y proteínas de unión al ADN. Sin embargo, no se

conocen mecanismos que anclan la cromatina densa en genes al interior nuclear (Osborne *et al.* 2004; Cremer *et al.* 2000).

La presencia de heterocromatina adyacente a la membrana nuclear y el silenciamiento de genes en este subcompartimento apoya la hipótesis que postula a la periferia nuclear como un ambiente represivo para la transcripción (Schneider *et al.* 2007). Las laminas A/C y B, que componen la lámina nuclear, se organizan en distintos microdominios y pueden contribuir a la formación de diferentes microambientes para la regulación génica (Shimi *et al.* 2008). En un estudio del genoma completo de células Kc de *D. melanogaster*, Pickersgill *et al.* (2006) detectaron aproximadamente 500 genes silenciados y de replicación tardía que presentaban interacciones con la lamina B. Los estudios en levaduras han demostrado la asociación de genes activos con el complejo del poro nuclear (NPC) (Taddei *et al.* 2007). Por otra parte, los avances logrados en el conocimiento de la compleja organización de la membrana nuclear han proporcionado valiosa información sobre un conjunto de enfermedades denominadas laminopatías causadas por mutaciones en los genes de las laminas o proteínas que interactúan con ellas como emerina, LAP2, LBR, MAN1 o nesprina-1 (Gruenbaum *et al.* 2005; Shimi *et al.* 2008) (Figura 2). Las principales características fenotípicas vinculadas con las laminopatías son a) anomalías en la morfología nuclear, b) reorganización de la heterocromatina y c) error en los sistemas de reparación del ADN e incremento de la inestabilidad genómica (McKenna *et al.* 2013)

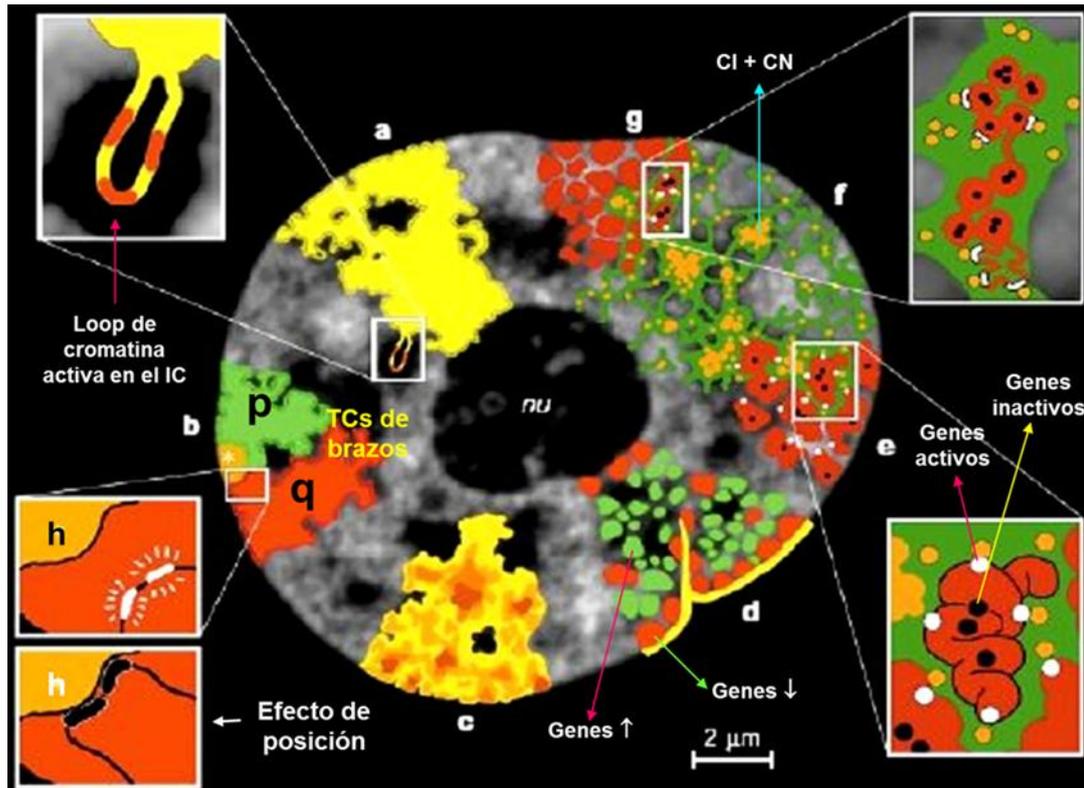
Las laminopatías causadas por mutaciones en el gen *LMNA* se denominan laminopatías primarias, mientras que las mutaciones en los genes que codifican para las laminas de tipo B (*LMNB1* y *LMNB2*), prelamina A o proteínas de unión a laminas se conocen como laminopatías secundarias. Este tipo de desórdenes son causados por un conjunto heterogéneo de mutaciones pleiotrópicas que afectan la expresión génica en forma global. Sin embargo, sus efectos pueden ser expresados en tejidos específicos, clasificándose en cinco grupos: distrofias musculares, neuropatías, lipodistrofias, síndrome de Hutchinson-Gilford (progeria) y finalmente aquellas enfermedades que presentan síntomas de más de una categoría (síndromes superpuestos) como la anomalía de Pelger-Huet (PHA) y síndrome Buschke-Ollendorff (BOS) entre otros (McKenna *et al.* 2013; Dreesen *et al.* 2013).

## 1.2 Dinámica nuclear

Características únicas identifican diferentes compartimentos cromatínicos en núcleos interfásicos. En varios tipos celulares se distingue una conformación abierta de la cromatina en interfase con elevada actividad transcripcional denominada eucromatina. En contraposición, un alto grado de compactación de cromatina y una escasa expresión génica caracterizan la heterocromatina constitutiva. La heterocromatina facultativa presenta una estructura y nivel de expresión génica que dependen de su función tejido específica, exhibiendo baja condensación y actividad transcripcional sólo en tejidos específicos (Holmquist y Ashley 2006). El compartimiento eucromático que contiene genes constitutivos conforman las bandas G claras mientras que la heterocromatina facultativa con genes tejido específicos reside en las bandas G oscuras. Finalmente, la heterocromatina constitutiva contiene escasos genes (Dimitri *et al.* 2009) y se corresponde con las bandas C (Gilbert *et al.* 2004; Holmquist y Ashley 2006).

Se ha demostrado a través de la incorporación de Br-UTP que el interior nuclear aloja la fracción más importante de la cromatina activa. Esta región del núcleo alberga, por consiguiente, la fracción isocórica H3, la cromatina hiperacetilada y las bandas R con las secuencias medianamente repetidas Alu. Por otra parte, la periferia nuclear se asocia, en general, al silenciamiento de genes. Al parecer, los complejos de poro nuclear pueden facilitar la transcripción y el procesamiento de ARNm en levaduras y *Drosophila* (Akhtar y Gasser 2007). La transcripción mapea principalmente a nivel del nucléolo y en miles de pequeños *foci* dispersos en el interior del núcleo.

Los lazos (*loops*) de cromatina pueden presentar una considerable movilidad dentro del volumen nuclear con valores que oscilan de 0.2-0.5  $\mu\text{m}$  (alcance medio) a 2.0  $\mu\text{m}$  (largo alcance). Dicha movilidad estaría vinculada al reposicionamiento de genes aislados o conjunto de genes con el fin de alcanzar regiones de elevada expresión génica o ambientes represivos (Figura 2b). Como ejemplo, el *locus* del complejo mayor de histocompatibilidad humano (*MHC*) es un *cluster* de genes que se extiende como un lazo gigante desde el TC HSA6 cuando transcribe activamente. De manera similar, el *enhancer* H posee tal grado de movilidad que logra interactuar de manera específica con sólo uno del amplio repertorio de genes receptores olfatorios ( $n = 1300$ ) en cada neurona (Lomvardas *et al.* 2006).



**Figura 2.-** Modelo TC/CI. Se ilustra la disposición radial de los TC (**a**, **b**, **c**, **d**, **e** y **g**), los brazos cromosómicos ocupando diferentes dominios nucleares (**b**) y la distribución de la heterocromatina (rojo) y eucromatina (verde) en un TC. Nótese la vinculación de la heterocromatina con la membrana nuclear y el nucleolo. La interacción de los dominios cromatínicos de 1 Mb y los cuerpos nucleares con el IC se muestra en **e** y **f**, respectivamente. Los insertos presentan la protrusión de lazos de cromatina para su transcripción (**a**), el efecto de represión o activación génica por efecto de posición (**b**) en relación a la heterocromatina (**h**), la ubicación de genes activos (círculos blancos) o inactivos (círculos negros) en el TC (**e**) y el relacionamiento de cromatina activa y la maquinaria transcripcional en la región de pericromatina (RP, **g**). Modificado de Cremer y Cremer (2001).

Branco y Pombo (2007) han propuesto la existencia de un alto grado de interacción entre los lazos de cromatina en la periferia de los TC. Esta estrecha relación espacial podría afectar la frecuencia y localización de los reordenamientos cromosómicos.

La replicación del genoma en eucariotas superiores se regula tanto espacial como temporalmente como lo ilustran los diferentes patrones topológicos de la replicación a lo largo de la fase S del ciclo celular (Leonhardt *et al.* 2000). En el orden temporal,

la síntesis del ADN fluye desde dominios de cromatina laxa y elevada riqueza génica hacia dominios de menor tenor en genes y mayor compactación de la cromatina. En el orden espacial, al inicio de la fase S la replicación se evidencia (incorporación de BrdUrd o ensayo Click iT Edu) como pequeños focos distribuidos en el interior nuclear donde reside la cromatina laxa de alta densidad y expresión génica (Woodfine *et al.* 2004; Schubeler *et al.* 2002; Gilbert *et al.* 2004). A mediados de la fase S, los focos de replicación se concentran en la periferia nuclear y nucleolar. En la fase S tardía replica la heterocromatina constitutiva localizada a nivel de los cromocentros y en regiones periféricas del núcleo. La existencia de tiempos de replicación discretos en función de las características de la cromatina abre interesantes preguntas sobre el mecanismo de regulación subyacente a tal sistema biológico (Berezney *et al.* 2000; Chagin *et al.* 2010).

### **1.3 Territorios cromosómicos y modelos de arquitectura nuclear**

Se ha postulado que los TC están rodeados por una red de canales conectados a los poros nucleares denominado compartimiento intercromatínico (CI) (Figuras 1 y 2). El CI alberga complejos de proteínas y diferentes cuerpos nucleares tales como el nucléolo, fibras de pericromatina, cuerpos de leucemia promielocítica (PML) y de Cajal, *speckles* y dominios OPT (Oct1/PTF/transcription domains) que participan en el metabolismo del ADN y ARN (Kupper *et al.* 2007; Verschure *et al.* 1999).

Los TC presentan una compartimentación de los diferentes tipos de cromatina. Se ha postulado que la HF (bandas G) y HC (bandas C) residen en las regiones centrales del TC rodeadas por eucromatina (bandas R) la cual se relaciona directamente con el CI. Los *loci* transcripcionalmente activos (eucromatina) podrían generar bucles de cromatina que invaden el CI lo que facilita el reclutamiento de los complejos de transcripción (modelo TC/CI). Los genes tejido-específicos localizados en las bandas G también podrían alcanzar el CI para ser expresados en tipos celulares determinados así como en diferentes etapas del desarrollo.

Los modelos de arquitectura nuclear desarrollados en los últimos años ponen de manifiesto el limitado conocimiento que aún existe sobre esta compleja estructura celular. Los diferentes modelos difieren con respecto a las fracciones del espacio nuclear ocupados por eucromatina transcripcionalmente activa o heterocromatina facultativa así como en los niveles de compactación de la cromatina (bucles/fibras).

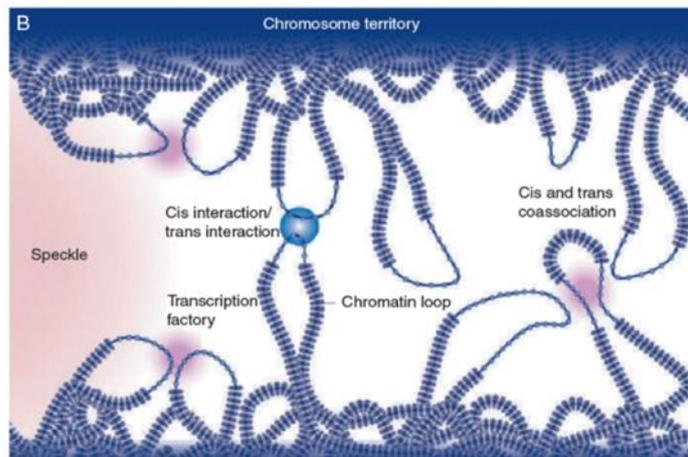
El modelo TC-CI (Figura 2) propone que los núcleos se hallan integrados por dos componentes principales, los TC y el CI (Cremer *et al.* 2010; Berr *et al.* 2006; Solovei *et al.* 2002). La organización de tipo territorial de los cromosomas en interfase es ahora aceptada como un principio básico de la organización nuclear, tanto en animales (Solovei *et al.* 2002) como en plantas (Berr *et al.* 2006; Pecinka *et al.* 2004; Shaw *et al.* 2002).

Las observaciones realizadas en diferentes organismos multicelulares mostraron la organización en dominios de 1Mb de una importante fracción de la cromatina (núcleos en fase S). Más tarde, se demostró que tales fracciones de cromatina eran estructuras persistentes de orden superior (Jackson *et al.* 1998; Visser *et al.* 1999; Albiez *et al.* 2006). Los niveles mayores de organización de la cromatina podrían estar integrados por subgrupos de dominios de 1 Mb. De acuerdo con el modelo TC-CI, los dominios de cromatina de 1 Mb constituyen una estructura básica de los TC pero su organización ultraestructural no se conoce cabalmente (Albiez *et al.* 2006; Berezney *et al.* 2005).

El concepto de CI describe un espacio contiguo y aparentemente libre de ADN, que se expande entre los poros nucleares y los TC. Como se mencionó, el CI alberga dominios nucleares (nucleolo, fibras de pericromatina, cuerpos PML y de Cajal, *speckles* y dominios OPT) que desempeñan un rol crítico en la regulación y procesamiento de los ARN. El CI está separado de los dominios de cromatina más condensada correspondiente a los TC por una capa de cromatina laxa denominada región pericromatínica (RP) (Fakan y Van Driel 2007). Topográficamente, la RP representa el dominio de cromatina en la periferia más extrema de cada TC. Desde el punto de vista funcional se ha postulado que en la RP confluyen los componentes esenciales para la replicación, transcripción y reparación del ADN así como de la maduración de pre-ARNm. Si bien el concepto de RP es cardinal dentro del modelo TC-CI, no se ha postulado su existencia en otros modelos de arquitectura nuclear (Fraser y Bickmore 2007; Fedorova *et al.* 2008; Branco y Pombo 2006).

El modelo de *red intercromatínica* (*Interchromatin Network* o ICN) predice que los lazos que componen dicha red pueden expandirse de un TC hacia otros TC (Branco y Pombo 2006). De esta manera, los genes activos en los bucles de cromatina pueden extenderse fuera de los TC y colocalizar (*cis* o *trans*) en regiones o factorías de expresión. La presencia estructural y funcional de los compartimentos CI y RP del modelo TC/CI no se consideran dentro del diseño de red intercromatínica.

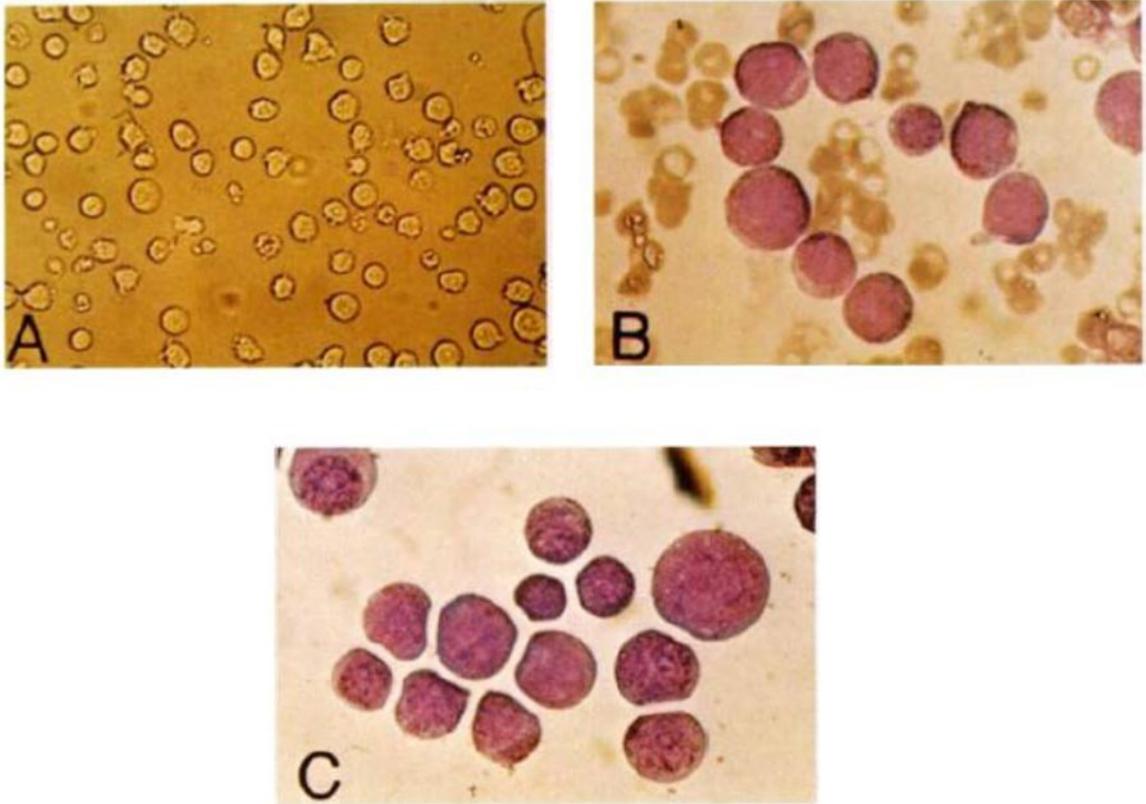
Otros modelos hacen hincapié en la importancia funcional del *lazo gigante de cromatina*, que emergen de los TC y migran a través del espacio nuclear (Chubb y Bickmore 2003; Fraser y Bickmore 2007; Alberts *et al.* 2008) (Figura 3). De acuerdo a estos modelos, los lazos gigantes pueden llevar genes a distancia, incluso hacia centros remotos de expresión por corregulación (Kosak y Groudine 2004). Cuando la transcripción cesa, el bucle gigante colapsa en el dominio de cromatina correspondiente del TC. Por otra parte, los lazos de gran tamaño pueden transportar genes activos hacia una región de silenciamiento génico (Fraser y Bickmore 2007).



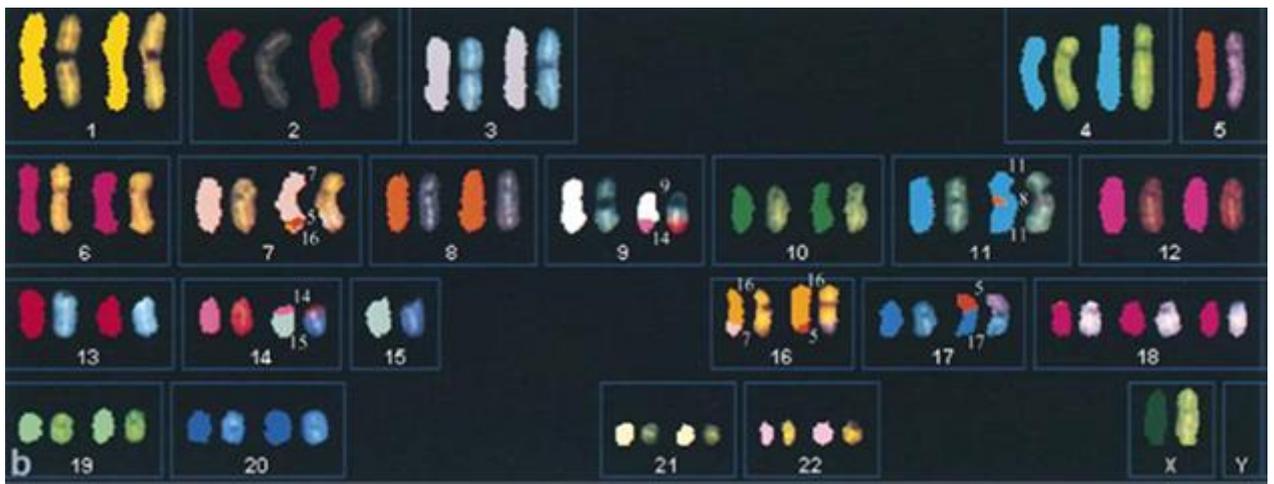
**Figura 3.-** Lazos de cromatina y diferentes tipos de interacciones génicas (*cis* y *trans*) ocurriendo en el interior del espacio intercromatínico (Fraser y Bickmore 2007). El modelo postula que la interacción génica es funcionalmente importante sin relación con un compartimiento nuclear determinado. En contraste, el modelo de TC-CI predice que los lazos de cromatina se localizan a nivel de la región periférica de los TC (*RP*) que corresponde a la interfase con el CI.

#### 1.4 La línea celular HL60

La línea celular continua HL60 (ATCC CCL-240) se originó a partir de un cultivo de sangre periférica de una paciente portadora de una leucemia promielocítica (M3). Las células crecen en suspensión con cierta tendencia a formar acúmulos. Los núcleos son ovoides y presentan límites bien definidos, estructura fina de la cromatina y 2-4 nucléolos (Figura 4). El citoplasma es muy basófilo y contiene múltiples gránulos azurófilos (Gallagher *et al.* 1979).



**Figura 4.-** Análisis microscópico de células HL60. (A) Cultivo de HL60 en suspensión observado en un microscopio invertido (x160); (B) Frotis de médula ósea del paciente portador de leucemia promielocítica que originó la línea HL60; (C) Promielocitos de la línea celular HL60 (citocentrifugación) (tomado de Gallagher *et al.* 1979).



**Figura 5.-** Cariotipo espectral de una metafase de la línea celular HL60. *FISH* con 24 sondas WCP específicas. Para cada par de homólogos se presenta a la izquierda la imagen procesada de *FISH* espectral y a la derecha la imagen de microscopía de fluorescencia. Se observan las diversas translocaciones y la trisomía del cromosoma 18. Obsérvese que la línea HL60 ha perdido un cromosoma X (Liang *et al.* 1999).

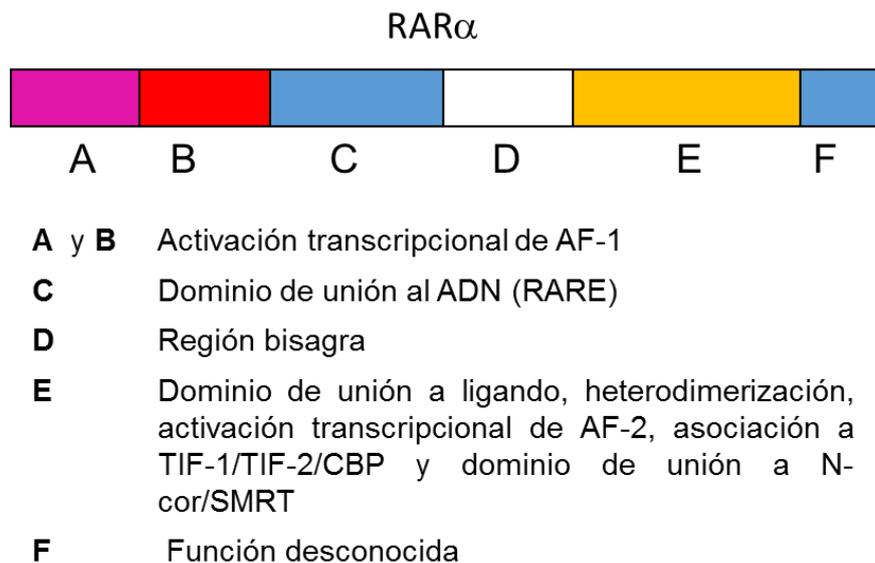
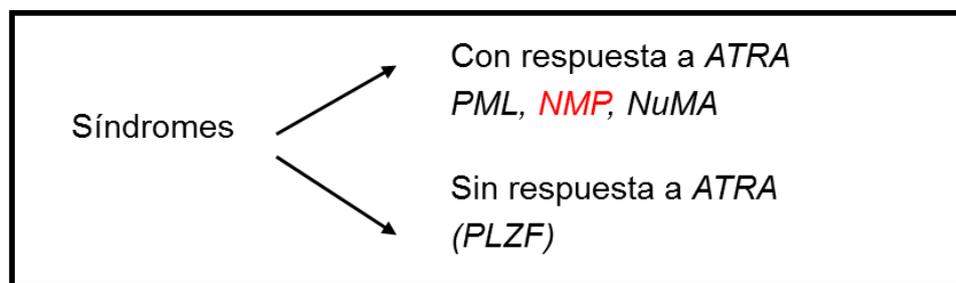
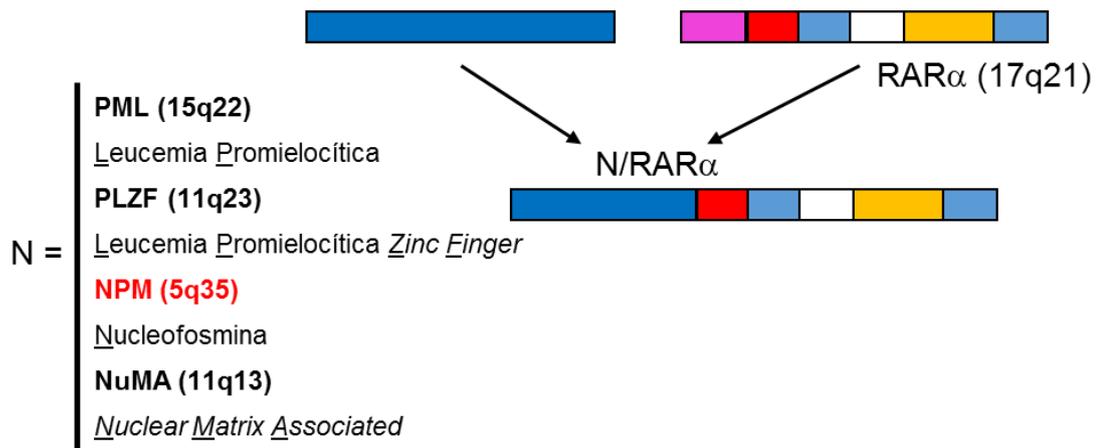
El fenotipo de la células HL60 se ha mantenido estable presentando cambios cromosómicos característicos detectados por *FISH* espectral que incluyen 7 translocaciones recíprocas que involucran a los cromosomas 5, 7, 8, 9, 11, 14, 15, 16 y 17 así como trisomía del 18 y pérdida de un X (Gallagher *et al.* 1979; Liang *et al.* 1999) (Figura 5).

La línea celular HL60 presenta la translocación t(5;17) (q35;q21) que involucra el gen que codifica para el receptor nuclear del ácido retinoico (RAR $\alpha$ ) y el gen de la nucleofosmina (NPM) (Redner *et al.*1996; Shipley *et al.*1996; Cho *et al.* 2011). No exhibe la translocación típica t(15;17) (q22;q21) que genera la proteína quimérica PML-RAR $\alpha$  de la leucemia promielocítica (PML, M3) como tampoco otras translocaciones características de la PML que reordenan RAR $\alpha$  con PLZF o NuMA. Al igual que las translocaciones que reordenan a RAR $\alpha$  (PML-RAR $\alpha$  y PLZF-RAR $\alpha$ ), el producto de la t(5;17) comparte la capacidad de actuar como activador transcripcional dependiente de ligando de genes de respuesta al ácido retinoico (Hummel *et al.* 1999) (Figura 6). Las secuencias de ADNc de NPM-RAR $\alpha$  y su recíproco RAR $\alpha$ -NPM mantienen marcos de lectura abiertos capaz de codificar proteínas de 52 y 24 kD, respectivamente. La proteína de fusión NPM-RAR $\alpha$  es capaz de unirse al ADN junto con RXR, ya sea como un homodímero o heterodímero (Melnick y Litch 1999) (Figura 7).

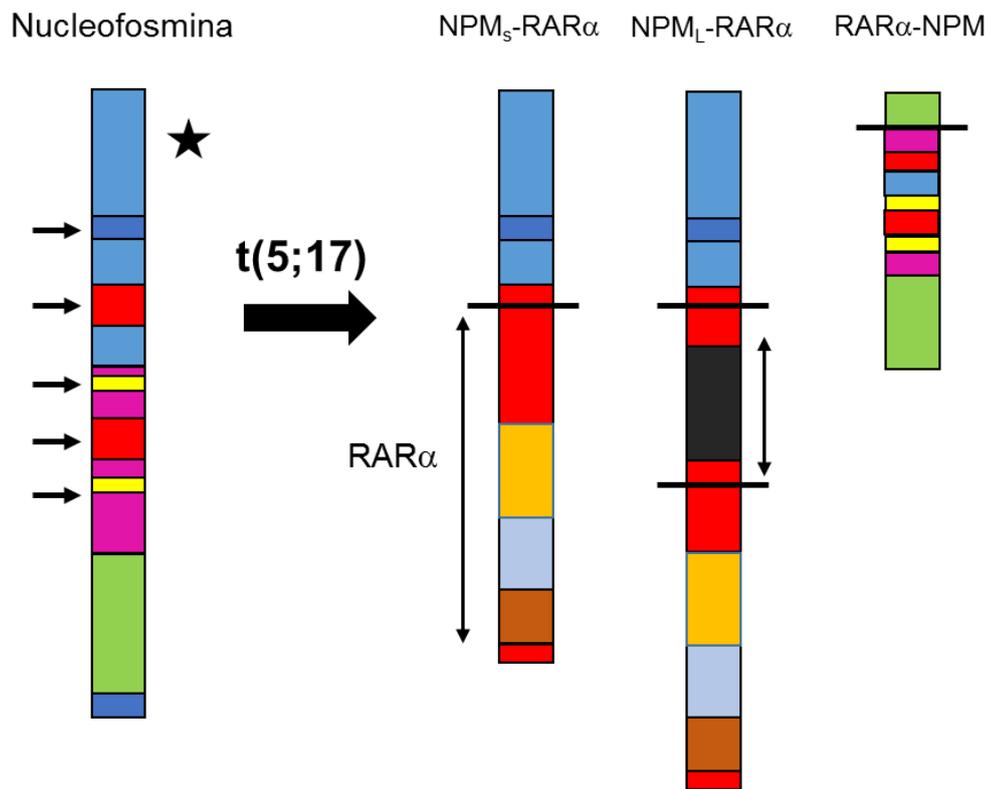
Para determinar la importancia biológica de la interacción NPM-RAR $\alpha$ /RXR, Rush *et al.* (2013) desarrollaron dos mutantes de NPM-RAR $\alpha$  con disminución en la capacidad de unión a RXR. Los ensayos con estos mutantes demostraron que la interacción de NPM-RAR $\alpha$  mediada por RXR es un elemento clave en la detención de la maduración mieloide. La expresión de NPM-RAR $\alpha$  inhibe la diferenciación ( $\cong$  50%) de células U937 *vía* TGF- $\beta$  y mediada por la vitamina D3. En cambio, la expresión RAR $\alpha$ -NPM no lo modificó. Estos resultados indican que la NPM-RAR $\alpha$ , no RAR $\alpha$ -NPM, es el principal mediador de la detención de diferenciación mieloide en PML con t(5;17) (Pollock *et al.* 2013).

*ATRA* juega un rol crítico en la diferenciación mieloide a través de sus receptores nucleares agonistas (RAR $\alpha$ / RXR) para modular la expresión de los genes blanco (Zhang *et al.* 2000). La detención en la maduración mieloide determinada por la t(5;17) puede ser superada con dosis suprafisiológicas de *ATRA* lográndose la diferenciación de las células HL60 a granulocitos maduros (Adamson 1996)

## Patogénesis molecular en PML



**Figura 6.-** Las cuatro translocaciones cromosómicas asociadas con PML dan lugar a proteínas de fusión que abarcan los dominios **B** a **F** de RAR $\alpha$ , incluyendo la unión al ADN y dominios de unión a ligando de proteínas, a través del extremo C-terminal para las cuatro proteínas nucleares diferentes que contiene dominios de auto-asociación. La translocación t(11;17) que reordena PLZF y RAR $\alpha$  es la única que presenta resistencia a la diferenciación con la terapia ATRA o quimioterapia convencional. Modificado de Melnick y Licht (1999).



**Figura 7.-** Dominios funcionales de la proteína NPM (flechas horizontal) y las estructuras de las proteínas quiméricas NPM-RAR $\alpha$  y RAR $\alpha$ -NPM generadas en la t(5;17). La porción N-terminal relativamente corta de NPM contiene el dominio de oligomerización (estrella) de la proteína que está ligada a RAR $\alpha$ . Se identificó una proteína de fusión larga, que contiene secuencias adicionales de origen incierto (flecha vertical). Modificado de Melnick y Licht (1999).

Una característica notable del cultivo de células HL60 es su capacidad de diferenciación terminal *in vitro*. Los cultivos de células de esta línea tienen la propiedad de diferenciarse desde promielocito a granulocito mediante la incorporación al medio de cultivo de sustancias exógenas promotoras como el ácido retinoico (*ATRA*). Este tratamiento modifica la forma nuclear ovoide característica de las células HL60 a polilobulada, típica de los granulocitos diferenciados, presentando en general 3 a 5 lobulaciones unidas por delgados filamentos.

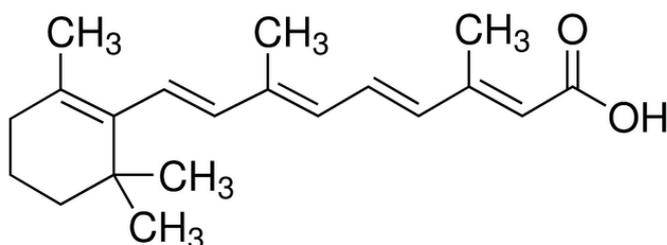
Se ha observado que los lóbulos externos portan mayor cantidad de heterocromatina que los internos (Gallagher *et al.* 1979; Olins *et al.* 2009). De manera similar a los granulocitos normales, las células HL60 diferenciadas con AR expresan el antígeno de superficie CD11b y tienen capacidad de fagocitosis.

La posibilidad de inducir *in vitro* la modificación de la arquitectura nuclear en las células HL60 (ovoide a polilobulada) convierte a esta línea en un interesante modelo para analizar la redistribución de los TC (por ejemplo de cromosomas pobres y ricos en genes) en los lóbulos nucleares.

Cabe destacar que los núcleos de los leucocitos normales, de células leucémicas (incluida la línea celular HL60) y de linfomas malignos son capaces de generar pequeñas protrusiones nucleares denominadas *Envelope Limited Chromatin Sheets (ELCS)*. Este fenómeno también se observa en granulocitos con trisomía de los cromosomas del grupo D o del #21 y en células aneuploides o que portan translocaciones o inversiones. Se ha propuesto que los *ELCS* se generan por la interacción de la heterocromatina adosada a la cara interna de la membrana nuclear y las hojas interna y externa de la misma. La generación de *ELCS* es independiente del proceso de apoptosis. Se han reportado otros tipos de protrusiones de la membrana nuclear denominadas lobulaciones, bucles, proyecciones y *blebs* aunque no se conoce si poseen un origen común con los *ELCS* (Olins y Olins 2009). La existencia de estas diferentes formas de extrusiones de la membrana nuclear evidencia su alto grado de plasticidad en determinadas condiciones.

## 1.5 El ácido retinoico

Los retinoides (retinol y sus derivados) son compuestos químicos activos derivados de la vitamina A la cual es esencial para la vida de todos los cordados con importantes funciones en la visión, epitelios, competencia inmunológica, reproducción, crecimiento y desarrollo embrionarios (Blomhoff *et al.* 2006; Ross *et al.* 1998, Ross 2003). En particular el compuesto *All Trans Retinoic Acid (ATRA)* es un metabolito endógeno del retinol que ha demostrado ser más potente que el retinol en una variedad de sistemas *in vivo* e *in vitro*.



**Figura 6.-** Estructura de la molécula de *ATRA* (C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>; PM: 300.44)

*ATRA* exhibe actividad antiproliferativa e inductora de diferenciación en líneas celulares establecidas como HL60 (Napoli *et al.* 1993; Olins *et al.* 2009). Este potente metabolito actúa como ligando de una subclase de receptores nucleares comprendida dentro de la superfamilia de tipo II. Esta subclase se compone de tres subtipos de receptores de ácido retinoico (*RAR* $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ) y tres subtipos de receptores X de retinoides (*RXR* $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) (Ross *et al.* 1998).

Estos receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares de hormonas y actúan sobre numerosos genes como factores de transcripción activados por unión específica de ligando (Mangelsdorf *et al.* 1994; Chambon *et al.* 1996). Los receptores de retinoides pueden interactuar, ya sea como homo o heterodímeros, sobre elementos de respuesta a hormona específica (elementos de respuesta al AR o *RARE* y elementos de respuesta *XR*) en promotores de genes diana (Kliwer *et al.* 1992; Leid *et al.* 1992; Zhang *et al.* 1992). La actividad transcripcional de estos receptores es positiva (holo-receptor) o negativamente (apo-receptor) modulada por la unión del ligando.

Además, la proteína intracelular *CRABPs* presenta una función reguladora en la señalización de *ATRA*. Las respuestas biológicas de *ATRA* pueden ser moduladas de diferentes formas: a) tipo de receptor nuclear presente en las células; b) participación de cofactores nucleares y enzimas y; c) disponibilidad de ligandos retinoide-específicos (Glass *et al.* 1997). Ambos tipos de receptores se asocian formando heterodímeros (*RAR/RXR*) y son considerados mediadores de la señalización celular inducida por ligando y la regulación génica a gran escala. La única propiedad de los receptores nucleares que les permite diferenciarse de otras clases de receptores es su capacidad de interactuar directamente con el ADN y controlar así la expresión génica (Ross 2003).

Las propiedades de los retinoides como promotores de la diferenciación celular e inducción de apoptosis han llevado a su inclusión en protocolos quimioterápicos en diferentes tipos de cáncer pero particularmente en el tratamiento de las leucemias promielocíticas agudas (*LAP*, M3). *ATRA* es un potente inductor de la diferenciación terminal en leucemias promielocíticas y la línea celular HL60 (Breitman *et al.* 1980). Este compuesto es 106 veces más activo en la inducción de diferenciación en células HL60 que el dimetilsulfóxido (DMSO). La diferenciación máxima

(aproximadamente el 95%) ocurre con *ATRA* tras 5-6 días de incubación a una concentración farmacológica (1  $\mu$ M) (Frolik *et al.* 1978).

## 1.6 El cromosoma X inactivo

En mamíferos, existe un mecanismo denominado compensación de dosis que equilibra el número de cromosomas X en ambos sexos. Barr y Bertram (1949) describieron la presencia en hembras de mamíferos de una masa de cromatina altamente condensada (heterocromatina facultativa) adosada a la membrana nuclear. Esta peculiar estructura fue posteriormente denominada cromatina sexual o corpúsculo de Barr (CB). El número de CB es igual al de cromosomas X menos uno. En 1961, Mary Lyon propone una hipótesis que establece que el CB corresponde al cromosoma X inactivo (Xi). Esta hipótesis implica la existencia de un mecanismo selectivo destinado a la inactivación de uno de los cromosomas X en hembras de mamíferos (Lyon 1961). La inactivación del cromosoma X se produce en el día 16 luego de la fertilización y es de carácter aleatorio ya que puede silenciarse el X de origen paterno o materno. Los linajes celulares derivados de estas células embrionarias tendrán el mismo cromosoma Xi. El fenómeno de inactivación explica la viabilidad de individuos que poseen cromosomas X supernumerarios (47,XXX; 48,XXXX; 48,XXXY) generados a través de fenómenos de no disyunción cromosómica a nivel meiótico o mitótico. Cabe recordar que el silenciamiento de Xi no es total ya que la región pseudoautosómica de este cromosoma permanece activa lo que explica la presencia de fenotipos anormales en estos individuos.

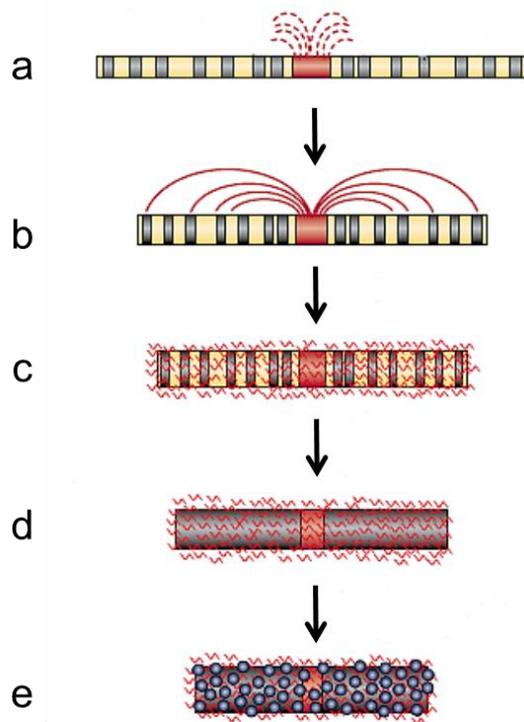
Dado que en las células se inactivan todos los cromosomas X-1, debe existir un mecanismo que permita a la célula determinar el N° total de cromosomas X para finalmente dejar uno sólo activo. El mismo debe ser capaz de discriminar de manera eficiente tanto la presencia de dos homólogos como de un número mayor de ellos como ocurre en las polisomías del X (Avner y Heard 2001).

En los granulocitos, el CB adopta una estructura muy peculiar denominada *palillo de tambor* que consiste en una pequeña protrusión del núcleo que alberga al Xi conectado a la masa nuclear principal por un delgado filamento. No se ha demostrado que exista eliminación del Xi contenido en el *palillo del tambor*.

El factor desencadenante de la inactivación del cromosoma X en los mamíferos es un ARN no codificante llamado *Xist* que se expresa exclusivamente en el Xi y lo recubre. El gene *XIST* se transcribe solamente en Xi y mapea en la región proximal del brazo largo del cromosoma X (Xq13) denominada *X-inactivation center (Xic)*. La acción del transcrito *Xist* debe estar restringida a nivel local para evitar la inactivación de otro cromosoma X o incluso un autosoma. Por lo tanto, *Xist* debe actuar en *cis* y no propagarse hacia otros cromosomas. Se ha comprobado que el ARN de *Xist* no se extiende más allá del territorio del cromosoma X donde se transcribe (Jonkers *et al.* 2008).

La acción de *Xist* es seguida por modificaciones postraduccionales de las histonas (*Histone Post Translational Modifications* o *HPTMs*) que incluyen la metilación de lisinas (H3K9me3, H3K27me2/3, H4K20me1) e hipoacetilación de H4 entre las más importantes. En etapas más tardías de este proceso se produce la incorporación de la variante histónica macroH2A y la metilación del ADN. El proceso finaliza con la formación del CB (Brown *et al.* 1991; Jeppesen y Turner 1993; Costanzi y Pehrson 1998; Plath *et al.* 2003; Silva *et al.* 2003; Heard *et al.* 2004; Masui y Heard 2006; Chow *et al.* 2009).

La incorporación tardía de la variante de histona cuando la cromatina ya presenta un grado importante de empaquetamiento sugiere la existencia de un mecanismo de intercambio específico. Por otra parte, la cromatina reconstituida con la histona macroH2A muestra un aumento de los contactos internucleosomales comparado a la canónica H2A (Changolkar *et al.* 2002). A su vez, inhibe la unión de factores de transcripción y la actividad de complejos de remodelación de la cromatina de tipo SWI/SNF (Doyen *et al.* 2006) lo cual pone de manifiesto su rol en la represión de la transcripción y la formación de heterocromatina facultativa. La macroH2A en el Xi se halla sujeta a monoubiquitinación mediado por el complejo CULLIN3/SPOP ubiquitina ligasa E3, paso esencial para su asociación con la cromatina dentro del Xi (Hernández-Muñoz *et al.* 2005).



**Figura 7.-** Formación del Xi. **a.** Producción basal ARN *Xist* a partir de *Xic*; **b.** regulación positiva de *Xist* y; **c.** *Xist* recubre a todo el cromosoma X; **d.** establecimiento de Xi con un patrón de replicación asincrónica; **e.** Hipoacetilación de histonas H3 y H4, metilación de H3K27, metilación del ADN, ingreso de histonas macroH2A. Modificado de Avner y Heard (2001).

Dentro del proceso de inactivación del cromosoma X uno de los factores necesarios incluye un número de proteínas del grupo Polycomb (PcG), originalmente identificadas en *Drosophila* como reguladores de genes homeóticos (HOX) así como regulador de blancos involucrados en la diferenciación y proliferación celular. El complejo *Polycomb Repressive Complex2* (*PRC2*) es reclutado hacia el Xi junto con su subunidad catalítica EZH2 en forma dependiente de *Xist* (Marks *et al.* 2009) y media la di- y trimetilación de la histona H3 a nivel de la lisina 27 (H3K27me<sub>2/3</sub>). El Xi se enriquece en PRC1, que se asocia con PRC2 y H3K27me<sub>3</sub> (Plath *et al.* 2004).

Un posible mecanismo molecular por el cual las proteínas PcG median el silenciamiento génico y establecen un entorno de heterocromatina facultativa, implica el reconocimiento, por parte de Polycomb (PC), de *HPTMs* específicas (H3K27me) a través de su cromodominio (Plath *et al.* 2004).

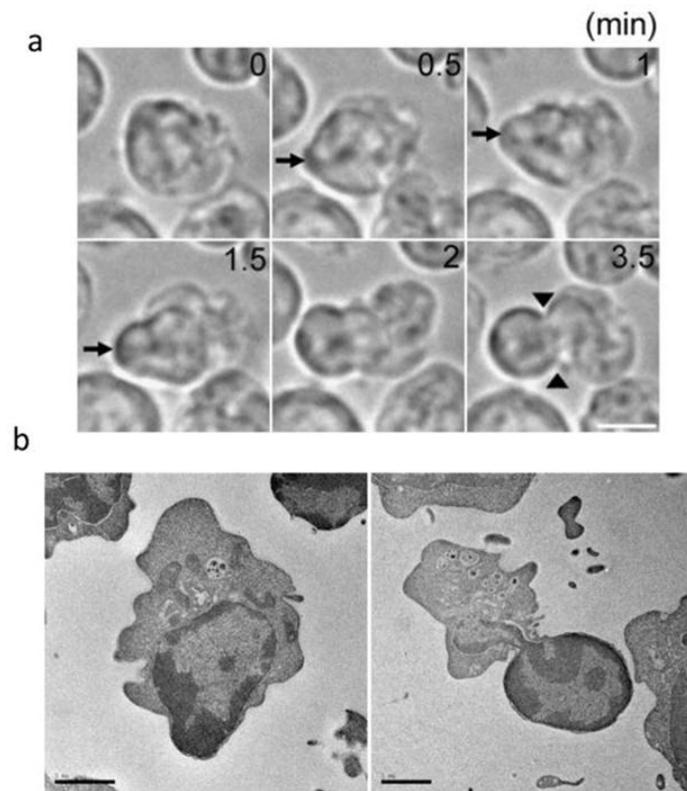
Las diferentes estrategias (*Xist*, *HPTMs*, metilación del ADN, macroH2A, PRC1 y PRC2) utilizadas para inactivar Xi y formar el CB plantea la interrogante si el campo de aplicación de las mismas se halla limitado a este cromosoma o si la célula comparte al menos parte de estos mecanismos en la identificación y segregación (*palillo de tambor*) de cromosomas supernumerarios (ej. trisomías) con el fin de paliar los efectos del desbalance genético (compensación de dosis).

## 1.9 Mecanismos de eliminación de núcleos y cromosomas

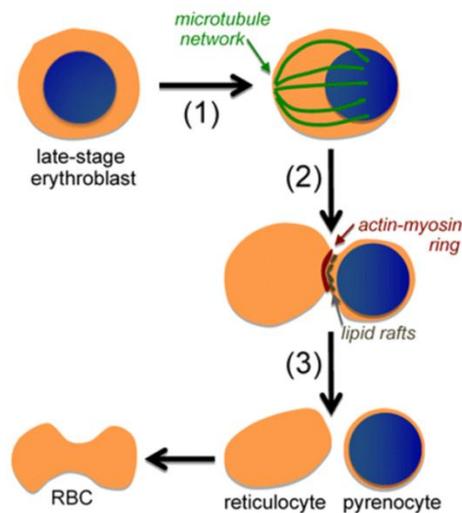
Las células eucarióticas poseen mecanismos que las facultan a desprenderse de material nuclear en determinadas condiciones. En algunos casos obedece a la necesidad de generar células anucleadas extremadamente dúctiles para el transporte de oxígeno en la microcirculación. En otros casos, la eliminación de los cromosomas se halla vinculada a la edad. Un particular interés presentan los procesos cuyo fin parece centrarse en la generación de un nuevo balance genético a nivel celular como se observa en algunos híbridos interespecíficos.

Durante el proceso de enucleación de los eritroblastos tardíos, el núcleo es extruido prontamente de la célula a través de una estructura semejante a un *bleb* abarcando una región limitada de la membrana celular. En la figura 8a se ilustran imágenes de este proceso (*time-lapse live-cell imaging*) desde la deformación inicial de la membrana plasmática (0.5 min) hasta la inclusión total del núcleo en la creciente protrusión (3.5 min). El núcleo del eritroblasto sobrelleva un importante grado de deformación en el breve curso de su completa extrusión (< 10 min). Las micrografías electrónicas ilustran con mayor detalle (Figura 8b) las etapas inicial y tardía del proceso de eliminación del núcleo (Ji *et al.* 2011).

El mecanismo de extrusión nuclear total comprende una acción de carácter mecánico por parte de los microtúbulos (posición excéntrica del núcleo) y la formación de un anillo integrado por actina-miosina y lípidos en el cuello de la estructura *bleb*-símil (Figura 8). El producto final lo conforman un pirenocito nucleado que es prontamente englobado por un macrófago y un reticulocito que evoluciona a eritrocito maduro bicóncavo (Figura 9). El proceso global también se caracteriza por una creciente condensación de la cromatina nuclear mediada por deacetilasas de histonas (*HDACs*) desde la etapa de eritroblasto temprano (Palis 2012).



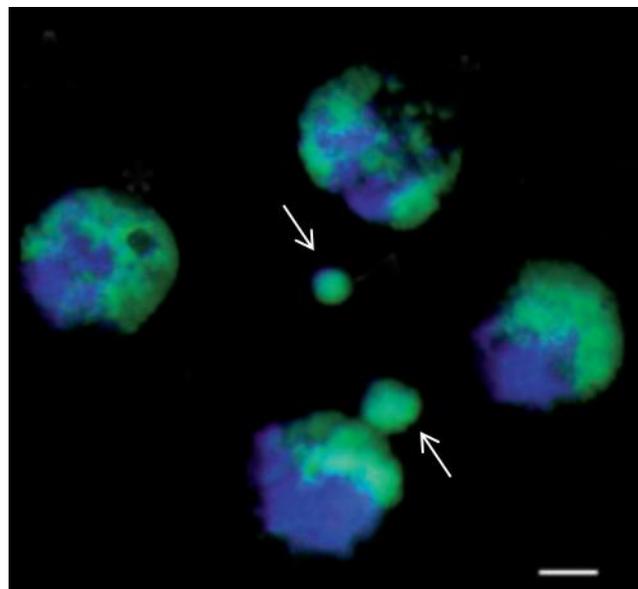
**Figura 8.-a.** Proceso de extrusión del núcleo celular en eritroblastos tardíos empleando *time-lapse live-cell imaging*. Nótese que la duración de las etapas presentadas no supera los 3.5 min; **b.** Micrografías electrónicas obtenidas *in vitro* a partir de un cultivo de eritroblastos que ilustran el comienzo y el desenlace del referido proceso. Barra: 5 µm. Tomado de Ji *et al.* (2011).



**Figura 9.-** Esquema de eliminación nuclear en un eritroblasto tardío. El proceso implica la acción mecánica de los microtúbulos sobre el núcleo celular, la posterior conformación de un anillo de actina-miosina asociado a lípidos en el cuello de la protrusión y culmina con la generación de un pirenocito nucleado y un reticulocito sin núcleo. Tomado de Palis (2012).

En la especie humana se ha comprobado que existe pérdida de los cromosomas sexuales X e Y asociada a la edad. En el caso de los autosomas, en cambio, las pérdidas observadas no tienen relación con la edad ni con el tamaño cromosómico (Guttenbach *et al.* 1995).

Existen a la par mecanismos que habilitan fenómenos de eliminación selectiva de un conjunto de cromosomas en general vinculado a etapas del desarrollo. Un ejemplo claro de este peculiar mecanismo lo constituyen los embriones de híbridos interespecíficos de cebada *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum*. Estos embriones experimentan durante el desarrollo un proceso de eliminación selectiva de cromosomas que incluye: a) rápida y selectiva eliminación de los cromosomas de *H. bulbosum* dentro de los nueve días post-polinización; b) comportamiento mitótico diferencial de los cromosomas de *H. bulbosum* pues las cromátidas segregan asimétricamente en anafase; c) en interfase, se elimina cromatina bajo la forma de micronúcleos generados por el comportamiento anormal de los cromosomas de *H. bulbosum* durante la mitosis y a través de la formación de extrusiones nucleares en un contexto de elevada heterocromatinización (Figura 10).



**Figura 10.-***GISH* (*Genome In Situ Hybridisation*) de núcleos interfásicos de híbridos interespecíficos *H. bulbosum* (verde) / *H. vulgare* (azul). El ADN de *H. bulbosum* se marcó con Biotina y se detectó con Estreptavidina-Alexa 488 (verde) y DAPI como contratinción. Se ilustra la eliminación de cromosomas de *H. bulbosum* bajo la forma de extrusiones nucleares (flechas). Modificado de Gernand *et al.*(2006).

De manera similar, en los híbridos celulares ratón/humano se produce una pérdida progresiva de cromosomas humanos hasta quedar siete de ellos por término medio (con valores extremos de 1-20). La posibilidad de generar híbridos con un sólo cromosoma permitió avances considerables en el mapeo de genes humanos. La eliminación ocurre en principio al azar aunque tienden a quedar retenidos de preferencia los cromosomas 7 y 11 y se elimina con mayor frecuencia el # 9.

Se ha demostrado que durante el desarrollo neural humano, cerca de 1/3 de las células progenitoras (CPN) son aneuploides (en general por pérdida de cromosomas). Pese a su carácter aneuploide, las CPN logran sobrevivir y se integran a los circuitos de redes neurales. La tasa de aneuploidía se duplica al tratar con *ATRA* las CPN para inducir su diferenciación. El aumento en la aneuploidía se correlaciona con un incremento en la formación de micronúcleos y disminución en la expresión de survivina pero sin inducción de apoptosis. Estas modificaciones cromosómicas en una fracción importante de las CPN podría generar subpoblaciones celulares con diferentes perfiles de expresión lo cual llevaría a una amplia capacidad de respuesta frente a cambios ambientales (Yurov *et al.* 2007; Sartore *et al.* 2011). Esta hipótesis se ha visto reforzada con los hallazgos de McConnell *et al.* (2013) sobre la existencia de variaciones en el número de copias (*copy number variations* o *CNVs*) en hasta un 41% de las neuronas humanas provenientes de la corteza frontal secuenciadas en forma individual. Los *CNVs de novo* poseían al menos una megabase de extensión predominando las deleciones sobre las duplicaciones. Los autores concluyen que el cerebro humano constituye un verdadero mosaico de *CNVs* neuronales.

De acuerdo a las evidencias presentadas, existen a nivel celular mecanismos destinados a eliminar por completo el núcleo celular o bien regular la cantidad de cromatina (cromosomas) presente en el núcleo. Estos mecanismos operan en condiciones normales (generación de glóbulos rojos), en híbridos generados experimentalmente (híbridos de *Hordeum* o ratón/humano) o durante el desarrollo (neurogénesis) y su función parece estar dirigida a lograr un nuevo balance genético y/o un amplio abanico de expresión génica.

## Problema de investigación

En el curso de investigaciones preliminares cuyo propósito era analizar mediante *FISH* (sondas WCP) la localización de los tres TC #18 (pobre en genes) y los dos TC #19 (rico en genes) en núcleos polilobulados de la línea HL60 diferenciados a granulocitos maduros por la acción de *ATRA*, se observó una peculiar segregación de uno de los cromosomas #18. La presente Tesis abarca los estudios llevados a cabo con el fin de identificar las características morfológicas y dinámicas de este peculiar proceso.

Nos planteamos analizar en estas células diferenciadas la posible existencia de un mecanismo de condensación y extrusión de un TC 18 supernumerario, similar al que origina el corpúsculo de Barr (Xi) y la protrusión nuclear denominada “palillo de tambor” en granulocitos periféricos. A su vez, intentamos determinar si este mecanismo culmina con la eliminación del TC supernumerario.

---

## **2. HIPÓTESIS**

Los granulocitos de mamíferos poseen un mecanismo inducible a nivel nuclear capaz de reconocer, condensar, segregar, extruir y finalmente eliminar el autosoma supernumerario en células trisómicas.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Confirmar la existencia de un proceso de condensación, segregación y eliminación de un cromosoma supernumerario empleando como modelo la línea celular humana HL60 (trisomía 18).

### **3.2 Objetivos específicos**

- 1) Analizar en poblaciones de células HL60 diferenciadas y control: a) el ciclo celular para determinar la proporción de la subpoblación no proliferante y, b) el grado de maduración granulocítica.
- 2) Caracterizar las etapas del proceso de condensación, segregación, extrusión y eliminación del TC #18 supernumerario en núcleos diferenciados polilobulados de células HL60.
- 3) Determinar la frecuencia de las diferentes etapas del fenómeno en núcleos controles y polilobulados de células HL60.
- 4) Estimar parámetros de localización intranuclear y estereológicos de los TC #18 y #19.
- 5) Evaluar modificaciones en las laminas de la membrana nuclear en la región de la protrusión que contiene el TC #18 supernumerario.

- 6) Caracterizar la ultraestructura tanto externa como interna de células de la línea HL60 diferenciada a granulocitos y controles.
  
- 7) Implementar una técnica que permita analizar las características genéticas y epigenéticas de las protrusiones nucleares generadas durante el proceso de diferenciación.

---

## 4. MATERIALES y MÉTODOS

La estrategia experimental desarrollada en el marco de la Tesis consistió en la aplicación de diferentes técnicas para alcanzar los objetivos trazados. Las mismas incluyeron: a) citometría de flujo (CF) para analizar el ciclo celular en células tratadas con DMSO o *ATRA*; b) CF combinada a inmunomarcaciones específicas con el objetivo de determinar el grado de diferenciación granulocítica alcanzado por la células HL60 tratadas con *ATRA*; c) microscopía confocal (MC) y sondas *WCP* (*Whole Chromosome Probes*) en técnicas de *FISH* de 2 dimensiones (2D) para mapear los TC #18 y #19; d) MC e inmunomarcación (3D) para estudiar la composición en laminas de la envoltura nuclear y modificaciones inducidas por *ATRA*; e) microscopía electrónica de transmisión y barrido para estudiar los cambios ultraestructurales producidos por *ATRA*; f) microdissección LASER, extracción de ARN total y su amplificación por RT-PCR con el fin de implementar un método destinado a determinar las características genéticas y epigenéticas de las protrusiones nucleares.

### 4.1 Diferenciación *in vitro* de granulocitos de HL60

#### 4.1.1 Cultivos celulares de la línea HL60

Los cultivos de células HL60 se desarrollaron en medio RPMI 1640 (PAA glutamina estable) suplementado con 20% SFB (PAA Gold, inactivado), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (125 mg/mL). Las células ( $2 \times 10^6$ ) fueron incubadas en estufa a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub> en frascos T25 (Nunc). La diferenciación *in vitro* de células HL60 a granulocitos se obtuvo tratando los cultivos (5 mL de medio de cultivo completo) con 5 µL (1 µM) de *ATRA* (Sigma) disuelto en DMSO puro (Life Technologies) a una concentración final de  $1 \times 10^{-9}$  M) durante 6 días sin exposición a la luz. Los cultivos control fueron tratados con DMSO o PBS (5 µL) durante el mismo período. Dado que los cultivos control continúan proliferando y los tratados con *ATRA* se diferencian se llevaron a cabo 1 o 2 pasajes de los cultivos control para asegurar una correcta viabilidad celular. Con este fin, los cultivos (control y tratados) fueron centrifugados

(800 rev, 5 min) y el sobrenadante descartado para agregar medio de cultivo + SFB fresco y DMSO o *ATRA*. Se realizaron cuatro desarrollos de cultivo por triplicado y seguidamente se procedió a la inducción de la diferenciación.

#### 4.1.2 Citometría de Flujo

Para estudiar las diferencias en el ciclo celular entre los cultivos de la línea celular HL60 controles y tratados con *ATRA* (6 días) se estudiaron las subpoblaciones en fases G0/G1, S y G2/M mediante citometría de flujo (CF). Con ese propósito se centrifugaron los cultivos celulares (800 rpm, 5 min) y luego de descartar el sobrenadante se resuspendieron en PBS (4°C). Las células fueron nuevamente centrifugadas, resuspendidas en etanol 70% y conservadas a -20°C hasta la realización de los estudios citométricos. Previamente al análisis por CF, las células fueron lavadas en PBS, tratadas con ARNasa (1 mg/mL), filtradas con membranas de acetato ( $\varnothing$  poro: 50  $\mu$ m) y finalmente teñidas con 25  $\mu$ L de yoduro de propidio (IP, 1 mg/mL) durante 10 min. Los estudios se realizaron en un citómetro y clasificador celular FACSVantage (BD) con un LASER de argón con 488 nm de emisión a 100 miliWatts de potencia. Se utilizó el Kit QC *Particles* (BD) a fin de comprobar la calibración y linealidad del equipo. Para las mediciones se emplearon gráficos biparamétricos de dispersión lateral y dispersión frontal (SSC/FSC), dispersión lateral y área del pulso (SSC/FL2-A), ancho *versus* área del pulso (FL2-W/FL2-A) e histogramas de área del pulso (FL2-A).

Con el fin de determinar el grado de maduración granulocítica de las células HL60 expuestas a *ATRA* (6 días), se marcaron células tratadas y control (DMSO) con los siguientes anticuerpos conjugados a fluorocromos (Beckman Coulter; 1:200): HLADR (IM2659U, PE-Cy5), CD13 (IM1427U, PE), CD16 (IM0814U, FITC), CD45 (IM2710U, PE-Texas Red) y CD11b (A54822, PE-Cy7) y se examinaron por CF en gráficos biparamétricos combinados.

#### 4.1.3 Recolección y fijación de las células para *FISH*

Los cultivos de células HL60 controles (DMSO) y tratados con *ATRA* fueron centrifugados, expuestos a una solución hipotónica (PBS 1/3, 1 min, 37°C) para conservar la forma nuclear, centrifugados nuevamente y fijados (2x) con metanol-acético (3:1). Las células se resuspendieron en 200-300  $\mu$ L de fijador, se tomaron 10-20  $\mu$ L y se extendieron en el centro de portaobjetos precalentados (1 min) en un soporte metálico en baño a 55°C. Se controló la calidad de la dispersión celular por microscopía de contraste de fases seleccionando los preparados en base a la calidad y densidad celular.

Finalmente, las preparaciones fueron envejecidas a temperatura ambiente (TA, 24 h) y acondicionadas en cajas selladas con Parafilm para su almacenamiento a -20°C. Las cajas retiradas del freezer para *FISH* se mantuvieron 30 min a TA antes de retirar los preparados. El área para *FISH* se delimitó inicialmente con marcador permanente en la cara sin células para la hibridación y con lápiz de diamante en la etapa de lavados.

## 4.2 Hibridación *in situ* fluorescente de ADN (*FISH-ADN*)

### 4.2.1 Generación de sondas de ADN *WCP* para TC #18 y #19

Para la generación de sondas *WCP* se utilizó la técnica de amplificación *in vitro* basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando un único *primer* degenerado (DOP-PCR) (Telenius *et al.* 1992). Se utilizó un protocolo específico de la reacción de PCR con dos temperaturas de *annealing* diferentes. La estructura del *primer* (6WM) consiste de tres regiones: a) un extremo 5' que porta una secuencia de reconocimiento para *Xho*I (5' C/TCGAG 3'), una endonucleasa de restricción con escasos sitios de corte en el genoma humano; b) esta región es seguida por una porción central que contiene seis nucleótidos de secuencia degenerada (NNNNNN, donde N= A, C, G, o T en proporciones aproximadamente iguales) y; c) un extremo 3' con seis bases específicas (ATGTGG).

### Amplificación por DOP-PCR

A partir de una muestra de 500 cromosomas clasificados por CF (Biozentrum, Munich), se procedió a su amplificación mediante la técnica DOP-PCR (Cremer *et al.* 2008). Este ensayo es un PCR basado en la amplificación de genoma completo (WGA) empleando pequeñas cantidades de material de partida (pg o ng). Las concentraciones de las muestras de ADN genómico (100 ng/mL) se ajustaron de acuerdo a las medidas obtenidas en un equipo Nano-Drop 1000 (Thermo Scientific, Versión 3.7.1). Se amplificó cada cromosoma por separado en microtubos para ADN (Eppendorf, 0,2 mL) preparándose la siguiente mezcla de reacción de PCR: 48,5  $\mu$ L de *Master Mix* para DOP-PCR (mantenido a  $-20^{\circ}$  C), 1  $\mu$ L de ADN de amplificación y 0,5  $\mu$ L de ADN Taq polimerasa y su correspondiente Buffer D (Invitrogen) (Tabla 1). La composición de *Master Mix* para el DOP-PCR es crítica para que el primer 6MW mantenga su estabilidad en presencia de 1% éter polioxietileno (detergente W1, Sigma-Aldrich). Tras uniformizar la mezcla con micropipeta (100  $\mu$ L), se centrifugó en minífuga (1000 rpm; 5 min) y se amplificó en un termociclador Applied Biosystems 2720 (Versión 2.09). El programa de ciclado para la amplificación por DOP-PCR (Tabla 2) consta de dos rondas de amplificación claramente diferentes en el grado de astringencia para lograr una buena calidad de las sondas de ADN. El grado de astringencia se refiere al grado de especificidad en el apareamiento mutuo de las secuencias híbridas en una posterior etapa de la hibridación *in situ*.

**Tabla 1.-** *Master Mix* para DOP-PCR primario. Secuencia del primer universal  
6 MW: CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG

Reactivos	Volumen	Concentración final
Buffer D (5X)	10 $\mu$ L	1 X
Primer 6MW (100 mM)	1 $\mu$ L	2 mM
Detergente W1 (1%)	5 $\mu$ L	0,10 %
Mezcal de dNTPs (2,5 mM)	4 $\mu$ L	200 mM
Taq polimerasa	0,1-1 $\mu$ L	2,5-5 U
H <sub>2</sub> O dd	para 50 $\mu$ L	

**Tabla 2.-** Programa de ciclado de primera amplificación por DOP-PCR

<b>N° ciclos</b>	<b>Pasos de Reacción</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
1	1a Desnat. inicial	95°C	3 min
8	2b Desnaturalización	95°C	1 min
(Baja astringencia)	2c Annealing	30°C	1 min
	2d Extensión	72°C	2 min
35	2b Desnaturalización	95°C	1 min
(Alta astringencia)	2c Annealing	56°C	1 min
	2d Extensión	72°C	2 min
1	3e Extensión final	72°C	5 min

El tiempo de amplificación para una corrida de 35 ciclos fue de 2 h 40 min aproximadamente (Tabla 2). Los productos de amplificación por DOP-PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer Tris-EDTA (TBE 1x) teñidos con Bromuro de Etidio (5 µg/mL) o Goodview (5 µL).

El principio de la técnica es lograr una temperatura de *annealing* lo suficientemente baja como para permitir únicamente la hibridación de los seis nucleótidos inespecíficos del *primer* degenerando el molde de ADN para iniciar la reacción de PCR. Se incrementa luego la temperatura para permitir el reconocimiento completo del *primer*.

#### *Reamplificación del producto de DOP-PCR primario*

A partir del primer producto de amplificación se procedió a su re-amplificación empleando la técnica de DOP-PCR con el primer 6MW en la mezcla de reacción que se describe a continuación. La re-amplificación incrementa el número de copias de la sonda manteniendo la especificidad de la misma. Es por este motivo que no se recomienda utilizar el molde de ADN de la amplificación inicial (DOP-PCR primario) más de tres a cuatro rondas de reamplificación. Se preparó una mezcla de PCR similar a la correspondiente a la amplificación inicial (Tabla 1), utilizando un

programa alternativo de ciclado que permite mantener un rigor de amplificación alto y conservar la especificidad de la sonda de ADN (Tabla 3).

**Tabla 3.-** Ciclos del programa para reamplificación por DOP-PCR.

<i>N° ciclos</i>	<i>Pasos de Reacción</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
1	1a Desnat. inicial	95°C	3 min
35	2b Desnaturalización	95°C	1 min
(Alta astringencia)	2c Annealing	56°C	1 min
	2d Extensión	72°C	2 min
1	3e Extensión final	72°C	5 min

Secuencia de primer 6 MW: CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG

#### *Visualización de los productos de amplificación*

Finalizada la amplificación por DOP-PCR se corrieron las muestras de ADN (5 µL) en gel de agarosa al 1% para evaluar la amplificación y estimar el tamaño de los fragmentos obtenidos mediante DOP-PCR con un marcador de peso molecular (3 µL, Biolabs) con 12 fragmentos de ADN (100 a 1517 pb).

Finalmente, se tomaron registros fotográficos digitales de los geles de corrida con una cámara Digital Kodak DC 290 EDAS empleando el programa de Kodak 1D Versión 3.5.4. Se verificó que los tamaños de las sondas correspondieran a 200-400 pb.

#### *Nick translation (NT)*

La colección de sondas de ADN (#18 y #19) fue marcada mediante *Nick Translation* (NT), un método indirecto no radiactivo. Se utilizaron como moléculas reporteras dUTPs marcados con dos diferentes haptenos (#18-Biotina y #19-Digoxigenina) empleando el Kit comercial *Nick Translation System* (Invitrogen). La reacción de *NT* incorpora nucleótidos marcados tras la generación de cortes en la secuencia de nucleótidos por la ADNasa I. La enzima remueve cortos segmentos de cadena (actividad exonucleasa 5'-3') generando sitios 3'-OH que sirven de puntos de anclaje para la ADN polimerasa que incorpora nucleótidos marcados. La cantidad final de

ADN marcado por *NT* es similar al ADN de origen. Es necesario tener en cuenta este hecho en el cálculo de la cantidad de sonda marcada para los experimentos de *FISH*.

Las mezclas para la marcación por *NT* (15°C; 100 min) se prepararon de la siguiente forma:

- 20 µL de sonda de ADN de #18 o de #19 amplificada por DOP-PCR
- 5 µL buffer *NT*
- 5 µL β-Mercapethanol (0,1 M)
- 5 µL de mezcla de dNTPs
- 2,5 µL de cada dUTP marcado con haptenos (#18-Biotina y #19-Digoxigenina)
- 1 µL ADN polimerasa
- 1 µL ADNasa I (dilución 1/200 de stock 1 mg/mL)
- H<sub>2</sub>O bidestilada para un volumen final de 50 µL.

La reacción de *NT* se detuvo almacenando los tubos a -20°C.

Para determinar los tamaños finales y el grado de marcación del conjunto de sondas se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TBE (1x) de manera similar a la empleada para visualizar los productos de amplificación de DOP-PCR.

#### *Preparación de Master Mix de Hibridación (MMH)*

El *MMH* se preparó de la siguiente manera:

- 25 µL ADN del #18 marcado con Biotina (*NT*)
- 25 µL ADN del #19 marcado con Digoxigenina (*NT*)
- 5 µL de ADN de esperma de salmón
- 60 µL ADN Cot-1 humano

Tomando como base el volumen final de la mezcla se agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla fue conservada a -20°C por >12 horas para promover una lenta precipitación de la sonda. A continuación se realizó una centrifugación a 5°C (13.000 rpm/30 min) y tras eliminar el sobrenadante se resuspendió la muestra en 50 µL de etanol frío (70%) antes de repetir la centrifugación. Eliminado el

sobrenadante, se dejó secar el pellet en Thermo-Mixer (Eppendorf) durante 15 minutos sin agitación (42-45°C). Se agregó 7 µL de formamida pura (el volumen depende del tamaño del pellet post-desección) y se agitó en Thermo-Mixer a 37°C (450 rpm) para su resuspensión (8-12 horas). Los solventes orgánicos como la formamida reducen la estabilidad térmica ( $T_m$ ) del ADN doble cadena jugando un rol crítico en la desnaturalización de la macromolécula. Durante el proceso de hibridación *in situ* la formamida actúa reduciendo las uniones inespecíficas lo cual disminuye el *background* del ensayo.

Finalmente se incorporó 5 µL de dextrán sulfato (20% en 4X SSC, Sigma) llevando la mezcla a una concentración final de 50% formamida + 10% de dextrán sulfato en 2x SSC. La concentración de la sonda en la reacción de hibridación *in situ* está directamente relacionada con la tasa de renaturalización. Es por ello que se utilizó un agente como el dextrán sulfato que promueve un ambiente adecuado para la formación de híbridos sonda-ADN del TC (incrementa 10 veces la tasa de hibridación) al favorecer la formación de una red de sondas. Este hecho redundante en una mayor sensibilidad de unión entre los ácidos nucleicos.

### 4.3 **FISH en núcleos interfásicos**

Se depositaron 5 µL de *MMH* en una región previamente seleccionada de cada preparado y se extendió empleando un cubreobjetos (15x15 mm) sellándose finalmente con cemento de contacto (FixoGum).

A continuación se realizó la desnaturalización simultánea *in situ del ADN* de núcleos interfásicos fijados y de las sondas *WCP* marcadas con haptenos (#18-Biotina y #19-Digoxigenina) utilizando una platina térmica a 75°C durante 2 min. Seguidamente los preparados se colocaron en una caja metálica en baño a 37°C (72 h) para la etapa de renaturalización *in situ*.

Finalizada la incubación, se quitó el cemento de contacto y se sumergieron las preparaciones en 2xSSC (37°C) hasta lograr desprender el cubreobjetos. A continuación se realizaron los siguientes lavados: 2xSSC (3 x 5 min, 37°C, con agitación); 0.1xSSC (3 x 5 min, 60°C, con agitación, lavados de astringencia) y 4xSSC/0.2% Tween (1 x 5 min, 37°C).

Se procedió luego al bloqueo en 4x SSC/0.2% Tween-20 + 4% BSA (37°C; 10-15 min) y un lavado final en 4xSSC/0.2% Tween (37°C) para continuar con la inmunodetección.

Las soluciones trabajo de los anticuerpos (1:200) en 4xSSC/0.2% Tween + 1% BSA fueron preparadas en el momento. Se utilizó Avidina-AlexaFluor 488 para detectar Biotina-dUTP (#18) y anti-Digoxigenina-Cy3 para visualizar el #19. Se tomaron 30  $\mu$ L de la dilución de anticuerpos, se extendió sobre la región seleccionada del preparado cubriéndose con un trozo de Parafilm. Tras 45 min de incubación en cámara húmeda (37°C) en ausencia de luz las preparaciones se lavaron en 4xSSC/0.2% Tween-20 (3 x 3 min, 37°C, con agitación). El ADN nuclear se tiñó con DAPI (0.05  $\mu$ g/mL, 10 min) y se lavó brevemente en 4xSSC/0.2% Tween-20. Finalmente, se procedió al montaje de los preparados con cubreobjetos de 20x20 mm y 5  $\mu$ L de VectaShield (Vector). Los bordes del cubreobjeto fueron sellados con esmalte. Los preparados fueron conservados a 4°C, protegidos de la luz y en posición horizontal.

#### 4.3.2 Análisis por microscopía confocal y de epifluorescencia

##### *Adquisición de imágenes*

Para el estudio imagenológico de los TC #18 y # 19 en células tratadas y control se utilizó microscopía confocal empleando un equipo Olympus (FV300, IIBCE) y/o LEICA TCS SP5 II (Facultad de Medicina, UdelaR) y Olympus de epifluorescencia directo e invertido (IX-81, IIBCE) que permite la visualización simultánea de tres canales (DAPI, FITC y Cy3). Con el equipo confocal Leica se realizó la excitación secuencial de las muestras con LASER de 405, 488 y 543 nm. Se utilizaron filtros automáticos de 430-460 nm, > 510 nm y 560-600 nm para recolectar la emisión de fluorescencia en azul (DAPI), verde (TC #18) y rojo (TC #19), respectivamente. Los núcleos fueron explorados en el eje Z (*stacks*) utilizando un objetivo 100x con una distancia axial entre planos de 0,3-0,5  $\mu$ m obteniendo aproximadamente 20-30 planos digitales por núcleo dependiendo del espesor de cada núcleo analizado.

Para la localización de las señales en las protrusiones nucleares se exploraron al azar (objetivo 100x) diferentes campos del área hibridada (15x15 mm) evitando los

bordes del preparado. El formato de cada imagen fue de 1024 x 1024 píxeles y la exploración se realizó en modo *slow* sin zoom digital.

#### 4.3.3 Procesamiento y análisis de imágenes

Se procesó en forma secuencial los tres canales (DAPI, FITC y Cy3) por separado abriendo los archivos de imágenes para cada canal en paralelo. Se generó un *stack* por canal, se ajustaron las condiciones basales de brillo y contraste y se almacenaron en formato de imagen de alta resolución (*.tiff*). Una vez creados los *stacks* se procedió a la generación de imágenes combinadas con los tres canales. Finalmente se aplicó un filtro gaussiano (*Gaussian Blur*, ratio = 1) para corregir las imágenes en los *stacks* de los tres canales.

Las imágenes de microscopía confocal fueron procesadas utilizando el programa *Image J* con corrección espectral para los ensayos de FISH de ADN. Se tomaron proyecciones en el eje Z para unificar las imágenes en los tres canales DAPI, FITC y Cy-3 en simultáneo. Se hicieron reconstrucciones en 2D y 3D de los núcleos y la medición de diferentes parámetros nucleares incluyendo: a) distancia entre centros de masa de los TC #18 y #19; b) distancia del centro de masa de cada TC a la envoltura nuclear; c) área y grado de circularidad de los 3 TC #18 para estimar el grado de condensación del cromosoma segregado.

#### *Clasificación de los núcleos de granulocitos de HL60 diferenciados in vitro*

Para analizar las características de los fenómenos de segregación, condensación, extrusión y posible eliminación del #18 se partió de imágenes pre-procesadas de los ensayo de FISH de ADN con sondas WCP. En una primera etapa se realizó la identificación y clasificación de los núcleos polilobulados (n = 872) según el criterio definido de acuerdo a las fases observadas (T I a T VII) que incluyen núcleos con TC con localización habitual o presentando condensación, segregación, extrusión o eliminación de un TC #18. Paralelamente, se calculó la frecuencia de cada una de dichas fases analizando la presencia de estos fenómenos en células control (n = 2165). En preparados tratados y controles se determinó la presencia de TC #18 o #19 en los núcleos que presentaron protrusiones.

### *Medición de distancias de los TC #18 y #19*

Se seleccionaron regiones de interés (*ROI*) correspondientes a cada TC (tres #18 y dos #19) y se midieron parámetros de los núcleos tales como centro de masa, centroide, circularidad y área en los tres canales empleados (DAPI, FITC y Cy3) medidos en píxeles. La operación con múltiples *ROI* se realizó con un comando específico (*Analyze/Tools/ROI Managers*) que permite guardar en forma individual las áreas definidas por canal e imagen para luego utilizarlas para realizar medidas. Una vez adquirido el conjunto de datos, los mismos fueron transferidos a una hoja de cálculo para su procesamiento.

El cálculo de distancias de los territorios se realizó aplicando trigonometría en base a dos estrategias: a) utilizando dos parámetros: el centro de masa (coordenadas XM e YM) y el centroide (coordenadas X e Y) a partir de los *ROI* para cada TC en los tres canales y; b) tomando como referencia el centro de masa del núcleo (únicamente canal de DAPI) pero definiendo un nuevo *ROI* que abarca el perímetro del mismo. En ambas estrategias se aplicó la fórmula de Pitágoras para el cálculo de la hipotenusa ( $d = \text{distancia}$ ) de un triángulo rectángulo:

$$d = \sqrt{(x_1 - x_2)^2 + (y_1 - y_2)^2}$$

Las medidas de distancia se realizaron definiendo los TC #18 extruidos, los TC #18ab (no extruidos) y ambos TC #19 en núcleos HL60-*ATRA*. En el caso de los núcleos HL60-*DMSO* se asumió para la toma de medidas como supuesto TC #18 extruido a aquel territorio #18 que se encontrara más alejado del centro del núcleo. Una vez adquirido el conjunto de datos, los mismos fueron transferidos a una hoja de cálculo para su procesamiento. En todos los casos se diseñaron gráficos comparativos y se evaluó su significancia estadística empleando test de  $t$  con alfa de 5% e IC de 95%. Todos los parámetros tomados de las imágenes fueron sometidos a tratamiento estadístico.

### *Medición de áreas y circularidad de los TC #18 y TC #19*

Fueron analizados *stacks* de núcleos tratados (T IV a T VII) y controles. A efectos comparativos, en los núcleos control se tomó como extruido (e) al TC #18 cuya posición era la más lejana de los tres cromosomas. Empleando los *ROI* ya definidos se tomaron 4 nuevos parámetros para estudiar el grado de compactación y ubicación de los TC #18 y #19 dentro del núcleo: a) centro de masa (se calcula considerando el brillo promedio ponderado de las coordenadas X e Y de todos los píxeles en la imagen o selección dada); b) centroide (definido como el punto central de la selección); c) circularidad (parámetro que varía de 0 a 1 donde 1 indica un círculo perfecto). A medida que el valor de enfoque es cercano a 0, revela una forma cada vez más alargada del *ROI* definido y un área mayor de los TC (píxeles cuadrados); siendo

$$\text{Circularidad} = 4\pi \times (\text{Área}) (1/\text{perímetro}^2)$$

d) media o MGV (Mean Gray Value) calculado como el valor medio de gris en la selección. El MGV corresponde a la suma de los valores de gris de todos los píxeles de la selección dividida por el número de píxeles y el desvío estándar en dos canales (DAPI y FITC) considerado como la desviación estándar de los valores de gris utilizados para generar el valor gris medio.

El conjunto de datos fue transferido a una hoja de cálculo para su procesamiento. La significancia estadística se analizó como en el punto anterior.

#### **4.4 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

##### *Preparación de cubreobjetos polilisinados*

Se trataron cubreobjetos nuevos (15x15 mm) en etanol 70 % por 24 h y se colocaron en placas *multiwell* (12 pocillos) en cámara de flujo laminar hasta su completo secado. Se extendió sobre cada cubreobjeto 200  $\mu\text{L}$  de polilisisina-L (dilución 1:8; stock 1,25 mg/mL, Sigma) e incubó 1 h a TA. Finalizado el tratamiento se lavaron los

cubreobjetos con H<sub>2</sub>O filtrada estéril (2 x 5 min), se dejaron secar ( $\cong$  3 h) y se procedió a la siembra de las células.

#### *Fijación de células para inmunomarcación de núcleos de HL60 (3D)*

En los ensayos de inmunomarcación las células tratadas con ATRA y los controles fueron recolectados y resembrados en medio RPMI-1640 sin SFB sobre portaobjetos pretratados con matriz de polilisina L e incubados en estufa (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 3 h). Seguidamente fueron lavados en PBS filtrado (PBSf) y fijados con PFA (4% en PBSf) durante 5 min. Finalmente se conservaron en PBS (4°C) para su posterior inmunomarcación.

#### *Inmunomarcación de laminas A-C y B*

Las células HL60 tratadas y controles adheridas a los cubreobjetos polilisinados fueron lavadas en PBS (3 x 3 min) y bloqueadas con PBT (0,15 % BSA + 0,1 % Tween 20/PBS, 10-20 min) para reducir las uniones inespecíficas. Los preparados fueron lavados nuevamente en PBS (3 min) e incubados con anticuerpos anti-lamina A-C de ratón (Abcam, 1:100 en PBT) y anti-lamina B de cabra (Abcam, 1:100 en PBT) por 30 min en cámara húmeda (TA). A continuación, se lavaron los cubreobjetos en PBS (3 x 3 min) e incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón conjugado a Cy3 (1:200 en PBT) y anti-cabra conjugado a AlexaFluor 488 (1:200 en PBT). Finalmente los preparados fueron lavados en PBS (3 x 3 min), contrateñidos con DAPI (1.5 µg/mL, 15 min, Sigma-Aldrich), montados con 5-10 µL de Vectashield (Vector) y sellados con esmalte.

#### *Perfiles de densidad de la inmunomarcación de laminas*

Se graficó el perfil de intensidad de laminas (A/B y C) en imágenes de núcleos HL60 diferenciados a granulocitos que presentaron protrusiones. Las imágenes fueron transformadas a una escala de grises (Gray value/distance) para 2 canales (DAPI y Alexa 488). Las imágenes corresponden a superficies en un espacio 3D,

equivalentes a una función escalar con rango 2D. Utilizando la herramienta *Profile 3D (Image J)* fue posible lograr la conversión de las imágenes a valores numéricos.

#### **4.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y barrido (MEB)**

##### **4.5.1 Fijación de granulocitos de HL60**

Los cultivos de células HL60 controles y tratados con *ATRA* (6 días) fueron centrifugados (800 rpm, 5 min) eliminándose luego el sobrenadante de medio de cultivo previo a su resuspensión en PBS a 37°C. El pellet obtenido se fijó empleando dos métodos: a) fijación simple en glutaraldehído 2,5% (pH 7,4) en buffer fosfato (BF) al 0,1% para preservar proteínas de membrana y; b) fijación doble con glutaraldehído 2,5% (pH 7,4) en BF (0,1%) + tetróxido de osmio al 1% (1 h) para preservar tanto proteínas como lípidos. Finalmente las muestras se mantuvieron a 4°C.

##### **4.5.2 Preparación de cubreobjetos para MEB**

El proceso de cobertura con poli-L-lisina de los cubreobjetos consistió en colocar gotas de 150 µL de poli-L-lisina hidrobromuro de alto peso molecular (Sigma) repartidas sobre una lámina de Parafilm (Sigma). Se colocaron cubreobjetos limpios (20x20 mm) sobre las gotas y se dejó incubar durante 90 min a TA. Una vez cumplido el tiempo de incubación se conservaron los cubreobjetos tratados en cajas de Petri a TA para su posterior empleo.

##### **4.5.3 Procesamiento de muestras biológicas para MEB**

###### *Deshidratación química y secado de punto crítico (SPC)*

Se sembraron 80 µL de muestras fijadas en glutaraldehído sobre cubreobjetos (20x20 mm) cubiertos con poli-L-lisina y se incubaron durante 30 min a TA evitando la desecación de las células. A continuación se procedió a la deshidratación química de las muestras utilizando como soporte sobres de papel (CL-TISSUE M97)

codificados por muestra (control PBS, control DMSO y HL60 tratadas con ATRA durante 6 días) en los cuales se introdujeron los cubreobjetos sembrados con las diferentes muestras.

La deshidratación química se llevó a cabo con una serie de concentraciones crecientes de metanol (50, 70, 90 y 100%, 5 min c/u) y 10 min en etanol absoluto. Para el secado de punto crítico (SPC), los sobres se colocaron en la cámara del equipo de secado de punto crítico (Denton Vacuum DCP-1, Critical Point Drying Apparatus), sumergidos en metanol puro. Se cerraron las válvulas y se dió entrada al CO<sub>2</sub> que sustituye progresivamente al metanol en las preparaciones. Este paso se realiza en frío y permite la vaporización del solvente orgánico disminuyendo al máximo la tensión superficial lo cual reduce la generación de modificaciones en la superficie de las muestras biológicas. Para eliminar el CO<sub>2</sub> de la cámara de muestras, se coloca agua hirviendo en una cámara externa de forma tal que aumente la presión y la temperatura. De ese modo se llega al punto crítico del CO<sub>2</sub>. Finalmente se abre el dispositivo de SPC y se retiran cuidadosamente las muestras para montarlas en tacos de aluminio de 1 cm de diámetro utilizando cinta de grafito doble faz.

#### *Criodeshidratación con N<sub>2</sub>*

Se eliminó el volumen de glutaraldehído 2,5% (pH 7,4) sin perturbar el pellet celular y se procedió al lavado con PBS. Una vez ajustado el volumen para concentrar las células se sembraron 80 µL sobre portaobjetos de 20x20 mm cubiertos con poli-L-lisina. Transcurridos 30 min para la adhesión de las células, se procedió al montaje en tacos de aluminio de las preparaciones humedeciéndolas levemente con agua ultrapura y vertiendo N<sub>2</sub> líquido sobre las mismas. Seguidamente se realizó la sublimación en bajo vacío y finalmente en alto vacío para su observación por MEB.

#### *Metalización de las muestras biológicas*

Para incrementar la definición o resolución de las imágenes aumentando la relación de la señal emitida, las muestras fueron sometidas a un proceso de metalización. Se empleó un método con oro puro en *sputter-coater* (metalizador Denton Vacuum Desk

II). El recubrimiento por pulverización catódica en microscopía electrónica de barrido (MEB) consiste en cubrir una muestra con una capa de material conductor (oro) generando así una capa conductora de electrones. El objetivo (anillo de oro puro) es bombardeado con átomos de gases pesados (argón) transformando los átomos de metal expulsados del objetivo al estado de plasma que se depositan sobre la superficie del espécimen dentro de la unidad de revestimiento. Se utilizó un entorno de bajo vacío (0,1 - 0,05 mbar), que permite cubrir por pulverización catódica en 1nm/s<sup>1</sup> y un nivel de vacío >50% (20-30 atmósferas) a los efectos de permitir el ingreso de gas argón en la cámara. Se aplicó un nivel de voltaje bajo (30 mA por 120 segundos) que permite una lluvia delgada de plasma para generar una capa fina y evitar la superposición de múltiples capas ocasionando saturación.

#### *Observación de las muestras en MEB*

Una vez colocada la platina con las muestras, se generó vacío en la columna de electrones seleccionándose un voltaje de trabajo de 20 keV y una distancia de 14 mm a la salida del haz de electrones. Se trabajó con la apertura mínima (1), que permite tomar fotografías y revisar las muestras a alta magnificación. Se tomaron imágenes panorámicas y a mayores aumentos en cada grupo de preparados. Luego de capturar imágenes de todas las muestras bajo los diferentes procesamientos y sin metalizar, los mismos preparados fueron sometidos a la incorporación de una fina cobertura de oro para aumentar la conducción e incrementar la resolución de los estudios y se captaron nuevas series de imágenes.

#### 4.5.4 Procesamiento de muestras biológicas para MET

##### *Inclusión en resina y obtención de cortes*

Las células fijadas en glutaraldehído al 2,5% en BF (0,1%) y se lavaron (3 min) en el mismo BF. Seguidamente se post-fijaron las muestras en tetróxido de osmio al 1% en BF (0,1%) durante 90 min (TA). Cumplido los plazos se lavaron nuevamente en BF (0,1%, 3 x 5 min). Para la deshidratación química fue empleada una serie creciente de etanoles 25, 50, 75% (10 min c/u) y etanol 95 y 100% (2 x 20 min c/u). Posteriormente se sumergieron las muestras en acetona (2 x 20 min). Una vez

deshidratadas las muestras se continuó con el paso de impregnación empleando acetona/araldita en proporciones crecientes de araldita a) 2:1 (30 min), b) 1:1 (30 min), c) 1:2 (30 min) y d) araldita pura (>12 horas, 4°C). Una vez a TA, se prepararon bloques de araldita pura nueva y se dejó polimerizar durante 48 horas a 58-60°C. Se obtuvieron cortes de 40-60 nm de espesor (ultramicrotomo MT-X) los cuales se montaron en grillas (200 Mesh) para su análisis por MET.

#### 4.5.5 Adquisición de imágenes en MEB y MET

Se examinaron en general de cada una de las muestras celulares tratadas con *ATRA* y DMSO a varios aumentos (550x - 9,500x) y se evaluaron los diferentes protocolos utilizados. Una vez determinadas las diferentes morfologías nucleares se tomaron imágenes a mayor aumento. El equipo empleado para el análisis de MEB fue un microscopio electrónico de barrido JEOL (JSM 5900 LV) con límite de resolución de 0,5  $\mu\text{m}$  del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de Facultad de Ciencias (UDELAR). Las imágenes se capturaron empleando un detector de electrones secundarios. El equipo utilizado para el análisis de MET fue un JEOL JEM 1010 del servicio de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) de Facultad de Ciencias (UDELAR). Las imágenes fueron tomadas con cámara digital Hamamatsu C-4742-95.

#### 4.6 Microdissección y captura LASER

Se realizaron extendidos en frío de células HL60 diferenciadas a granulocitos, no diferenciadas y controles previamente fijadas en metanol-acético (3:1) sobre portaobjetos especiales para captura LASER con lámina de acetato y posterior tinción con Giemsa (3%). Se empleó un equipo de microdissección por captura LASER Arcturus XT montado en un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti-E del IByME (Buenos Aires, Argentina). El microscopio presenta dos variantes de corte automático y manual con el LASER UV (405 nm) e infrarrojo (600 nm) con un espesor de corte de 3  $\mu\text{m}$ . Se llevaron a cabo tres tipos de muestreos (capturas con diferente carga de material): a) macroescala (núcleos enteros), b) microescala (regiones nucleares similares en tamaño a las protrusiones nucleares) y c) recorte y

captura directa de regiones nucleares con protrusiones empleando un objetivo 10x (a) y 60x (b y c). Una vez recolectadas las regiones microdisecadas de las láminas de acetato con las regiones de interés se procedió al aislamiento de ARN total y posterior amplificación de secuencias génicas específicas.

#### 4.6.1 Extracción de ARN total

A partir del material recolectado mediante captura LASER (macro y micromuestras) se procedió a la extracción de ARN total empleando un kit comercial (*RNA isolation Kit*, Pico Pure Applied Biosystems, Life Technologies). Se utilizó el ensayo de amplificación por PCR a tiempo final como paso de validación de la técnica de microdisección LASER, y comprobar la calidad de las muestras de ARN total capturado.

#### 4.6.2 Conversión a ADNc por RT- PCR

Se realizó el tratamiento térmico de las muestras de ARN en termociclador (3 min, 65°C) y se colocó de inmediato el material a 4°C para mantener las hebras de ARN desnaturalizadas. Se adicionó la mezcla de reacción N° 1: 4 µL de Buffer 5x (Promega) + 2 µL de *Random Primers* (dilución 1:100) y se trató a 42°C (7 min). Seguidamente se incorporó la mezcla de reacción N° 2: 1 µL de dNTPs (10 mM) + 1 µL de transcriptasa reversa (100 U) y se mantuvo a 42°C por 60 min. Los tubos fueron conservados en freezer a -80°C. En cada uno de las etapas se empleó un Mini Termociclador MJ (Bio-Rad).

#### 4.6.3 Amplificación de secuencias del gen satélite mayor

Una vez obtenido el ARN total se midió la concentración y la pureza (espectrofotómetro Nano-Drop 1000) empleando software ADN-50 y ARN-40 y se preparó la mezcla de reacción constituida por:

- 2 µL de ADNc
- 4µL de buffer 5x

- 3  $\mu$ L de mezcla de dNTP (10 mM)
- 1,2  $\mu$ L de ADN Taq polimerasa
- H<sub>2</sub>O libre de ARNasa para un volumen final de 20  $\mu$ L

Se aplicó el programa de ciclado *Satm62* de 35 rondas de amplificación (Tabla 6) con juego de *primers* específicos de satélite mayor +78 y +79 (dilución 1:100) en un Mini Termociclador MJ (Bio-Rad). Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa 1x en buffer TBE teñido con Sybersafe (Sigma).

**Tabla 4.-**Ciclos del programa *Satm62* para amplificación por PCR (tiempo final)

<i>Paso</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>
1	94°C	5 min
2	94°C	0,3 min
3	62°C	0,3 min
4	72°C	0,3 min
2-4	----	2,31 veces
5	72°C	5 min
6	8°C	10 min
7	Final	----
35 ciclos		

#### 4.6.4 Extracción de ARN de cultivos de HL60 y amplificación de ADNc copia

A partir de cultivos de células HL60 tratados con *ATRA* se extrajo el ARN total de  $2.25 \times 10^6$  células mediante la técnica de Trizol-Cloroformo (Sigma). El pellet obtenido fue resuspendido en 20-50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de ARNasa. Finalmente, se realizó un tratamiento sobre platina térmica a 55°C (10 min) para su correcta dilución. Se midió la concentración y pureza en un espectrofotómetro Nano-Drop 1000 empleando software ADN-50 y ARN-40. Las muestras de ARN fueron conservadas en freezer -80°C.

#### 4.6.5 Conversión a ADNc por RT-PCR

Para la conversión a cDNA se prepararon diluciones a una concentración final de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en agua libre de ARNasa y esterilizada (3x) por autoclave. El proceso de conversión a ADN copia (ADNc) se llevó a cabo en 3 pasos empleando un Mini Termociclador MJ (Bio-Rad), a saber: 1) el control positivo de amplificación, el control negativo y las muestras a amplificar fueron desnaturalizadas ( $65^{\circ}\text{C}$ , 3 min) colocándose las muestras de inmediato en hielo para mantener separadas las hebras de ARN. Se preparó la mezcla de reacción 1 constituida por el ARN + Buffer 5x Promega ( $4\mu\text{L}$ ) + *Random Primers* (dilución 1:100,  $2\mu\text{L}$ ); 2) tratamiento térmico a  $42^{\circ}\text{C}$  (7 min) y, 3) adición de dNTPs (10 mM,  $1\mu\text{L}$ ) + transcriptasa reversa (100 U,  $1\mu\text{L}$ ) para incubar las muestras a  $42^{\circ}\text{C}$  (60 min). Finalmente, las muestras se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  a corto plazo o directamente a  $-80^{\circ}$  para su empleo diferido.

#### 4.6.6 Amplificación por PCR a tiempo final

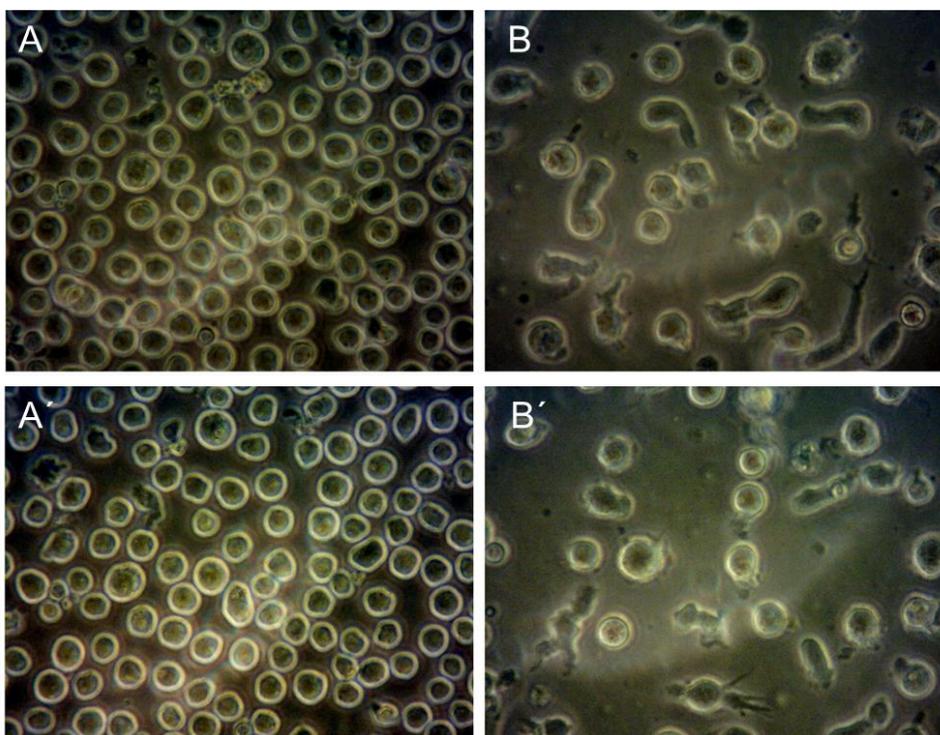
Utilizando el ADNc de las células HL60 se amplificaron por reacción de PCR a tiempo final secuencias altamente repetidas de satélite mayor murinas. La mezcla de reacción se preparó igual que en la sección **3.6.3** empleando el mismo juego de *primers* específicos de satélite mayor (+78 y +79). Posteriormente los productos finales de amplificación fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TBE, teñido con Sybersafe (Sigma).

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Diferenciación de la línea HL60 con *ATRA*

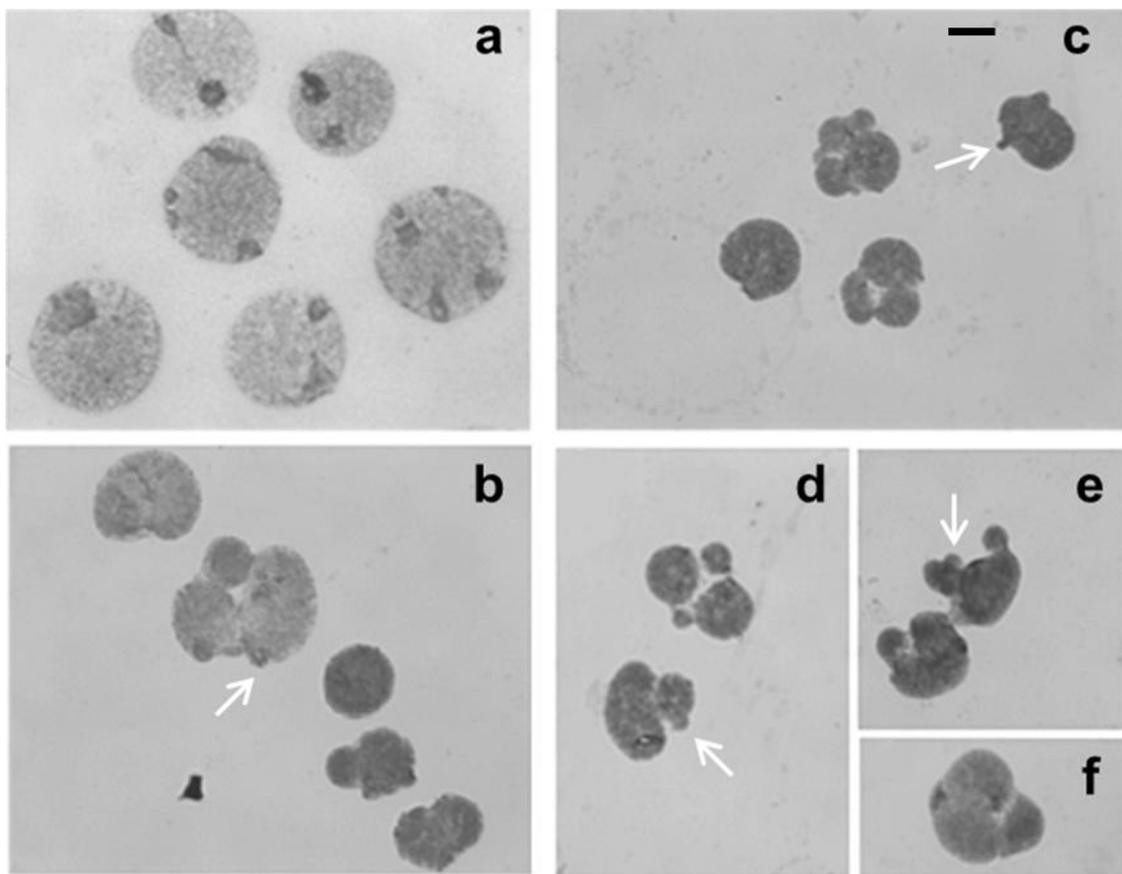
A fin de comprobar el efecto de *ATRA* en la diferenciación granulocítica de las células HL60 se realizaron estudios directos de las células en cultivo (microscopio invertido), citogenéticos y de citometría de flujo (CF). Los primeros comprendieron el análisis microscópico de núcleos controles (DMSO) y expuestos a *ATRA* (6 días) directamente en los sustratos de cultivo o en extendidos teñidos con Giemsa (3%, 10 min) y estudios cromosómicos para comprobar la estabilidad de la línea celular (no mostrados). Los ensayos citométricos tuvieron como fin: a) analizar el ciclo celular para comprobar la disminución de la proliferación como consecuencia del proceso de diferenciación y b) confirmar, empleando marcadores específicos (CD13, CD11b), la maduración a granulocitos.



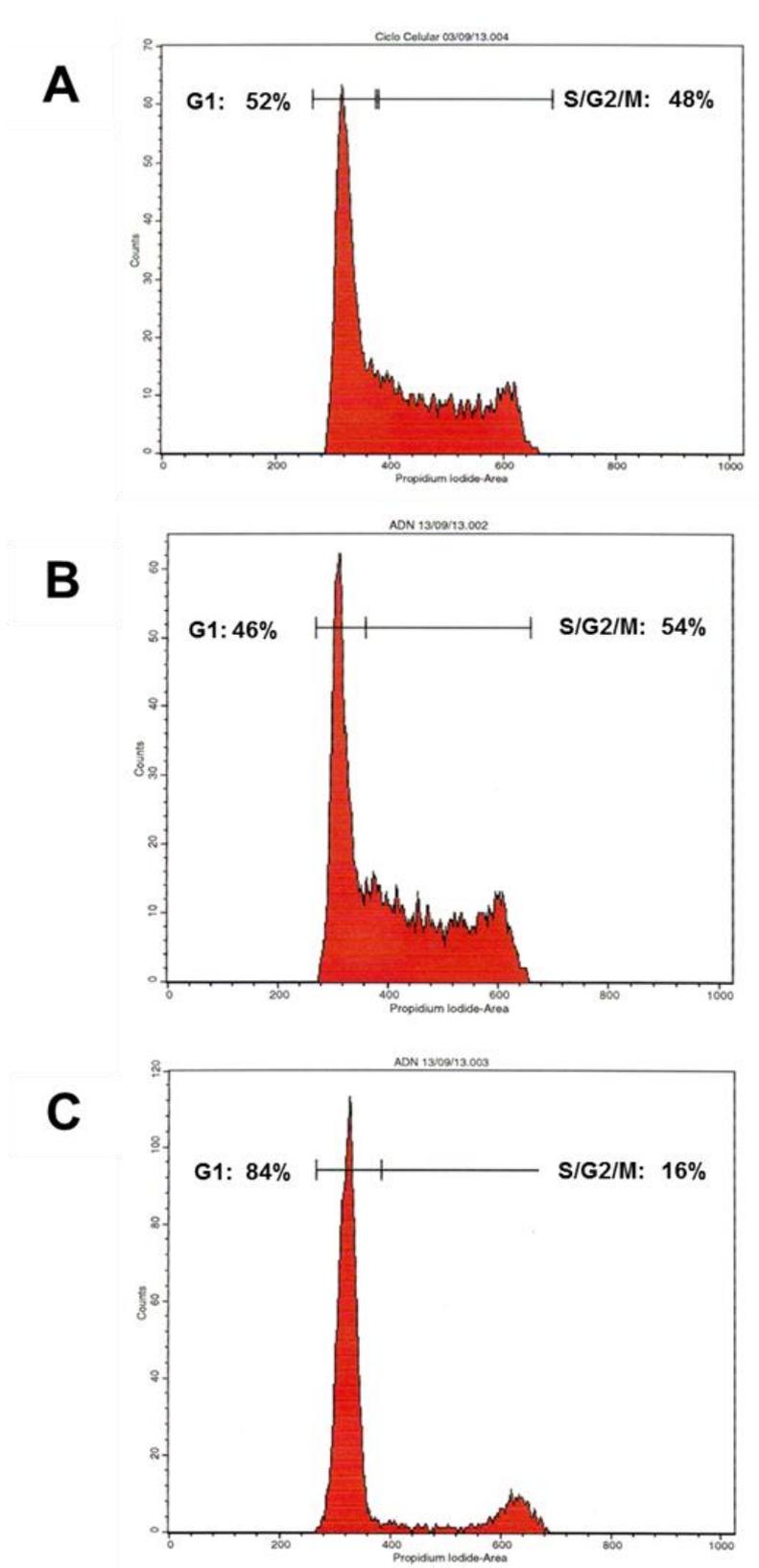
**Figura 11.-** Cultivos de la línea HL60 control expuestas a DMSO (**A** y **A'**) y diferenciadas con *ATRA* (6 días, **B** y **B'**) observadas con microscopio invertido y contraste de fases. Se observan evidentes modificaciones de la morfología celular características de los granulocitos (40x).

A los 6 días de exposición *ATRA*, las células mostraron en el microscopio invertido sustanciales cambios morfológicos característicos de los granulocitos en comparación con los controles tratados con DMSO que conservaron, en su mayoría, la habitual forma redondeada de la línea HL60 (Figura 11).

El examen mediante microscopía de contraste de fases de los núcleos teñidos con Giemsa mostró en los controles una forma generalmente ovoide, cromatina laxa y cromocentros heterocromáticos (2-5 por núcleo). Se observaron ocasionalmente núcleos de mayor tamaño que pueden corresponder a células poliploides, fenómeno *in vitro* de relativa frecuencia en algunas líneas celulares (Figura 12). Los núcleos de células HL60 tratadas con *ATRA* presentaron una gran variación en su morfología con grados diversos de polilobulación e intensa heterocromatinización. Algunos núcleos mostraron pequeñas protrusiones raramente observadas en los controles (Figura 12).



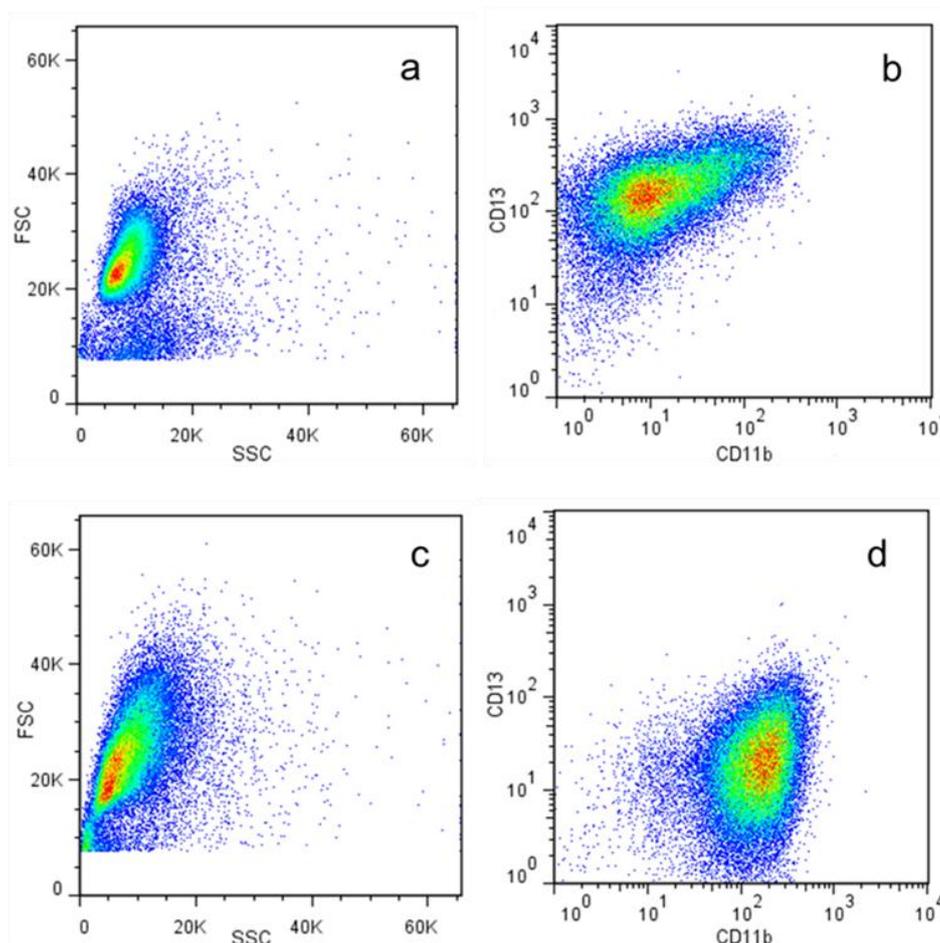
**Figura 12.-** Tinción con Giemsa de núcleos de células HL60 expuestas a DMSO (a) y diferenciados a granulocitos con *ATRA* durante 6 días (b-f). Se aprecian cambios evidentes de la forma ovoide a polilobulada, menor tamaño y mayor grado de condensación de la cromatina. Algunos núcleos polilobulados presentan pequeñas protrusiones (flechas). Tinción: Giemsa al 3%. Barra: 5  $\mu$ m.



**Figura 13.-** Análisis del ciclo celular por citometría de flujo en la línea celular HL60. Las células fueron pretratadas con ARNasa 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y teñidas con IP (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10 min). **A.** células tratadas con PBS (6 días); **B.** células tratadas con DMSO (6 días); **C.** células tratadas *ATRA* (6 días). Es evidente la diferenciación obtenida con *ATRA* con la mayoría de las células en G1 (84%) y una escasa subpoblación en S/G2/M (16%).

Los estudios citométricos revelaron una importante disminución de las fases S/G2/M en las poblaciones celulares HL 60 expuestas a ATRA (16%) en comparación con los controles tratados con PBS o DMSO (48% y 54%, respectivamente) confirmando el alto grado de diferenciación con la mayor parte de las células acumuladas en G1/G0 (84%) (Figura 13).

Se evaluó por citometría de flujo el grado de diferenciación de la línea HL60 en poblaciones tratadas con ATRA y DMSO durante 6 días empleando marcadores específicos de blastos (CD13) y granulocitos (CD11b). Con este ensayo se evidenció un incremento del marcador CD11b en la población tratada con ATRA (Figura 14, d). En cambio, los tratamientos con PBS y DMSO mostraron la situación opuesta con altos valores de CD13 y bajos de CD11b (Figura 14, b).



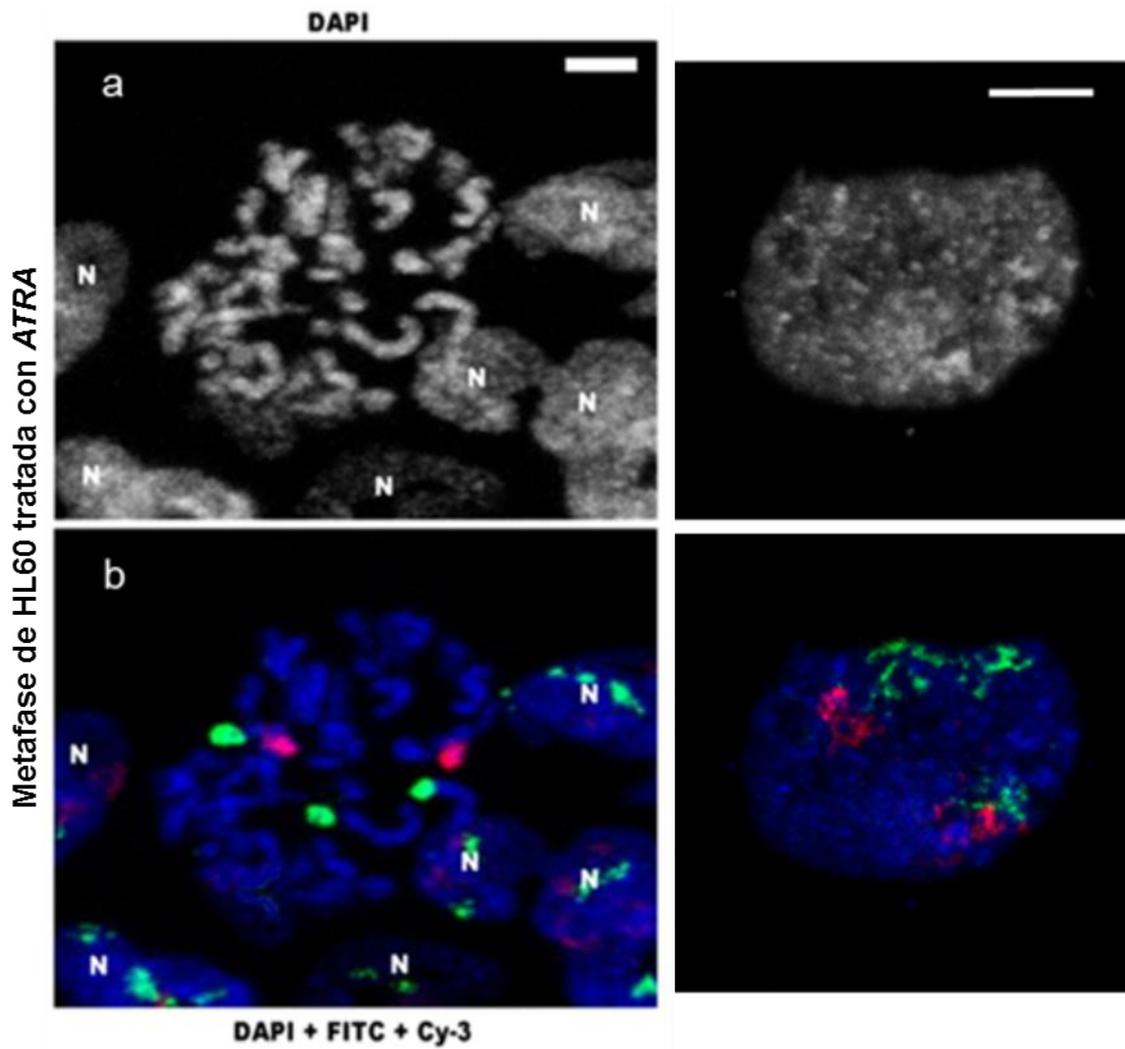
**Figura 14.-** Citometría de flujo (gráficos de densidades) en poblaciones celulares de la línea HL60 tratadas durante 6 días con DMSO o ATRA. **a y c.** Gráficos de dispersión lateral (SSC) *versus* dispersión frontal (FSC). **b y d.** Gráficos de CD11b (marcador de maduración granulocítica) *versus* CD13 (marcador de blastos). Se aprecia un claro aumento del marcador CD11b en la población tratada con ATRA **d.**

## 5.2 Mapeo de los TC #18 y #19 en núcleos de HL60

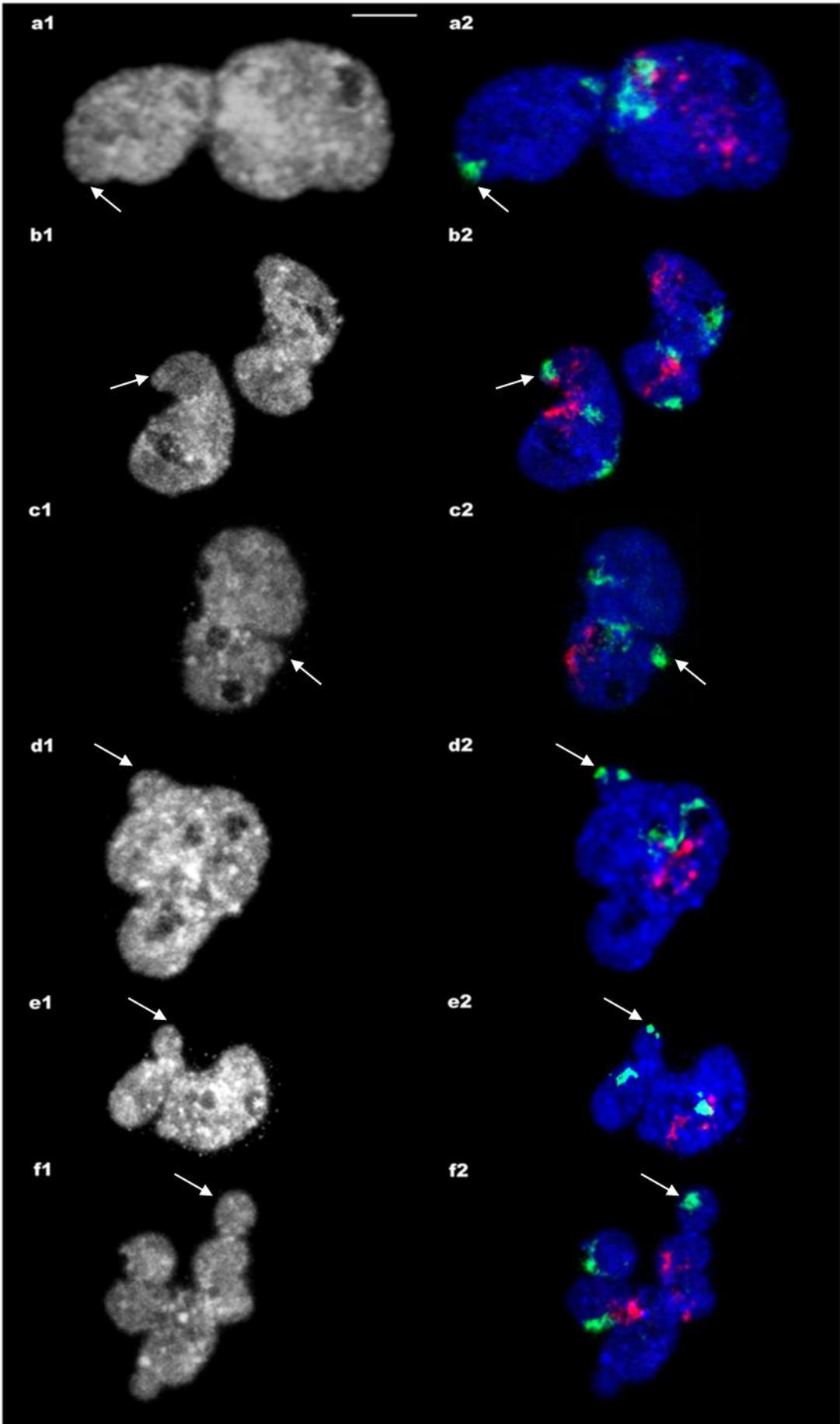
Las sondas generadas para detectar los TC #18 y #19 presentaron un buen nivel de especificidad como puede observarse en núcleos diferenciados (*ATRA*) y una metafase de HL60 exhibiendo tres señales para el #18 (FITC, verde) y dos para el #19 (Cy-3, rojo) (Figura 17).

En las preparaciones de FISH se observó que un conjunto de núcleos polilobulados de células HL60 tratadas con *ATRA* (6 días) presentaron una serie de modificaciones de uno de los tres TC #18 que exhibe esta línea celular.

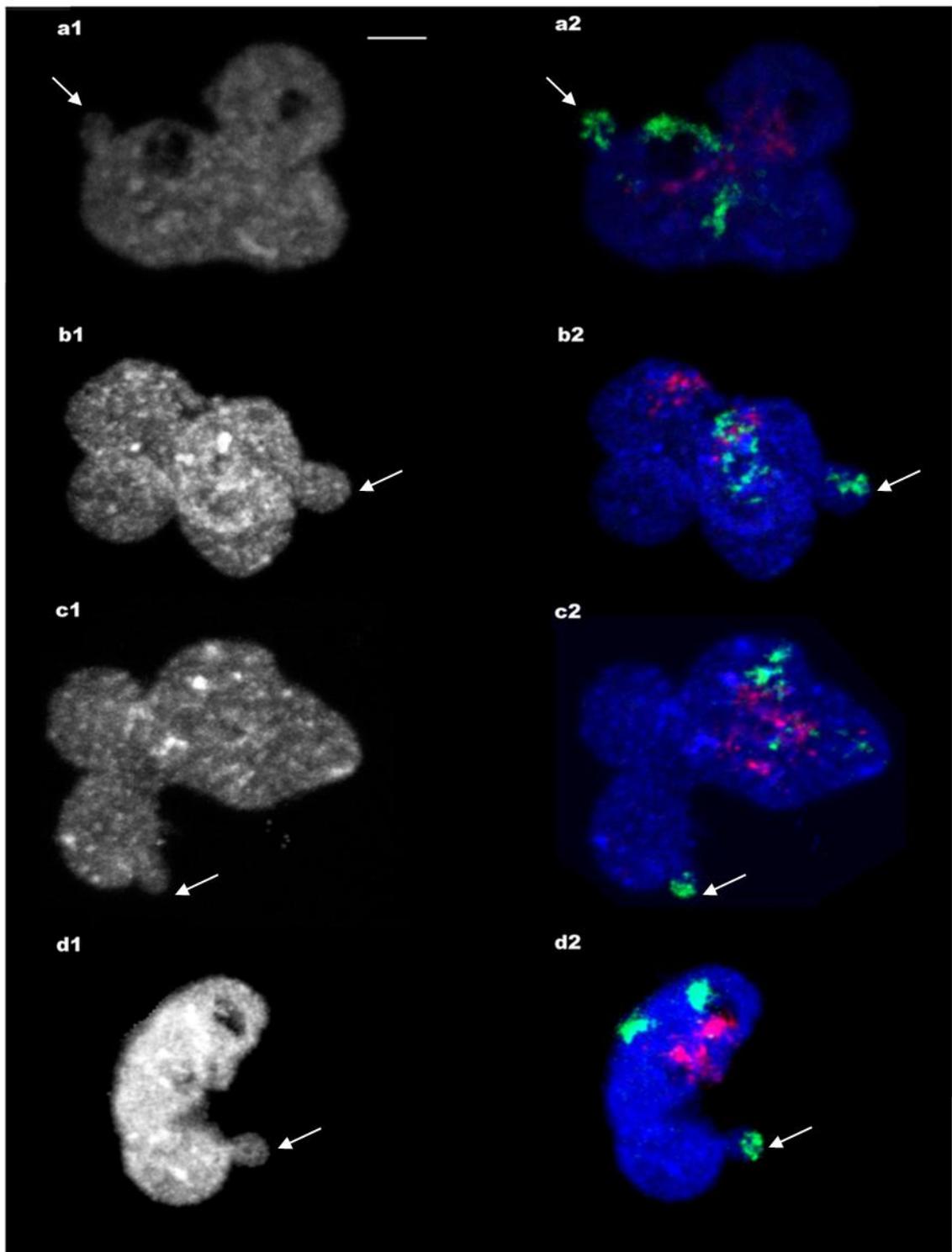
Se observó la segregación de un TC #18 hacia un lóbulo periférico del núcleo celular acompañado de un aumento del grado de condensación de la cromatina del territorio (Figura 18, flechas). En etapas más avanzadas del proceso, se detectó la deformación de la membrana nuclear en la región adyacente al TC #18 segregado y condensado que progresa hacia una verdadera protrusión que incluye progresivamente al TC#18 en su interior (Figura 19, flechas). El proceso continúa con la formación de una estructura similar al “palillo de tambor” que alberga al TC #18 condensado y culmina con su completa eliminación generando un micronúcleo (Figura 20, flechas).



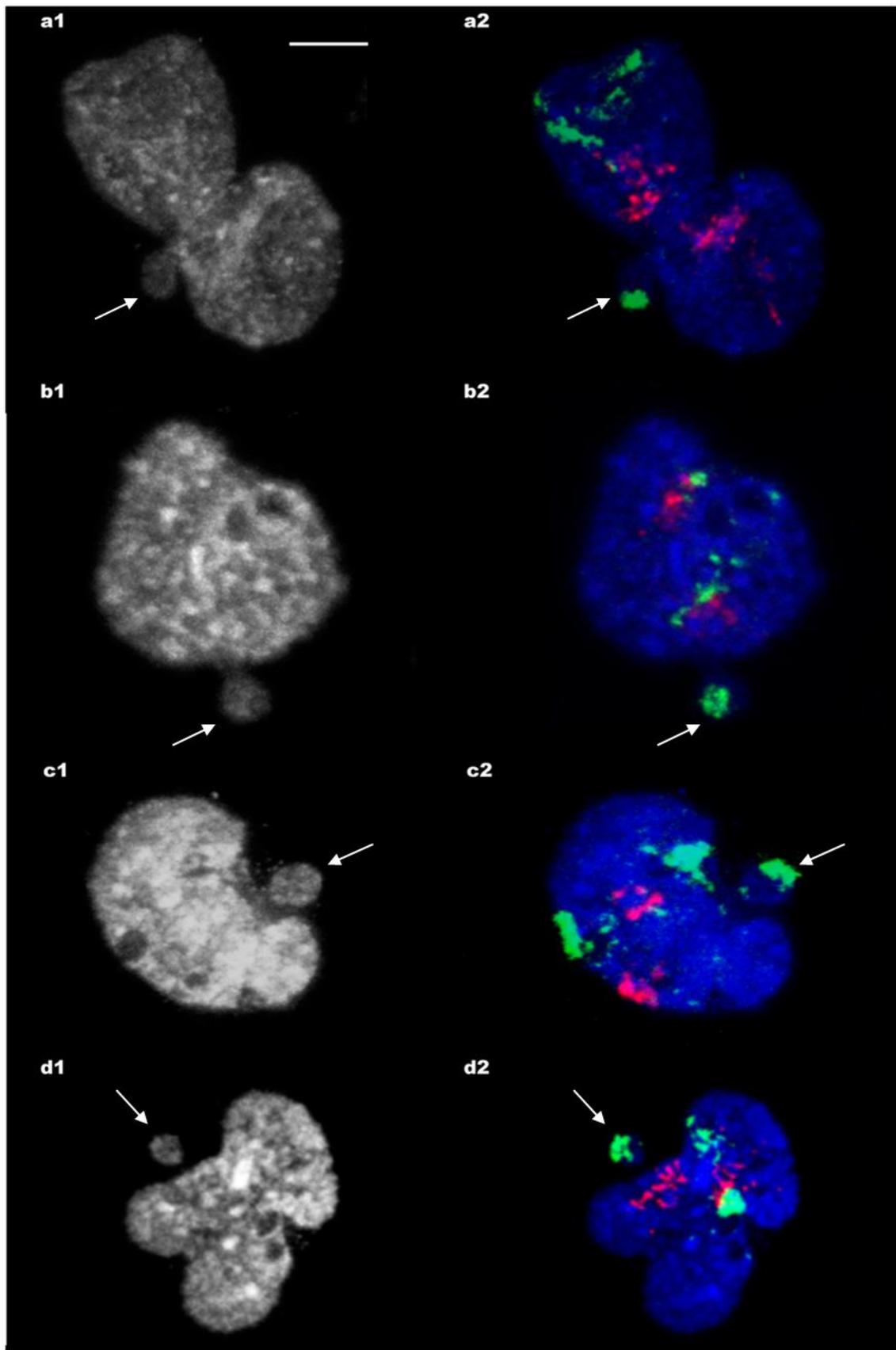
**Figura 17.-** Metafase de HL60 tratada con *ATRA* (**a** y **b**) y (**c**) núcleo de una célula control a la derecha (tratada con DMSO). Tinción con DAPI (gris y azul). FISH de TC #18 y #19 con sondas *WCP* marcadas con Biotina y Digoxigenina, respectivamente. Los haptenos fueron detectados con Avidina-AlexaFluor 488 (#18, verde) y Anti-Digoxigenina-CY3 (#19, rojo). Contratinción: DAPI (azul). Barra = 5  $\mu$ m.



**Figura 18.-** Proceso de segregación y condensación de un TC #18 supernumerario en núcleos polilobulados de la línea celular HL60 diferenciados *in vitro* con ATRA (6 días). Se emplearon sondas WCP para #18 (verde) y #19 (rojo) y DAPI como contratinción (gris y azul). Se ilustran la etapa de segregación del TC condensado a la periferia de uno de los lóbulos (**a1-b2** y **d1-f2**). La deformación de la membrana nuclear adyacente al TC segregado se aprecia en **c1-d1**. Las imágenes corresponden a *stacks* de proyecciones en el eje Z (objetivo 100x, microscopio confocal Leica SP5). Tratamiento, FISH y adquisición de imágenes como en la Figura 17. Barra: 5  $\mu\text{m}$ .



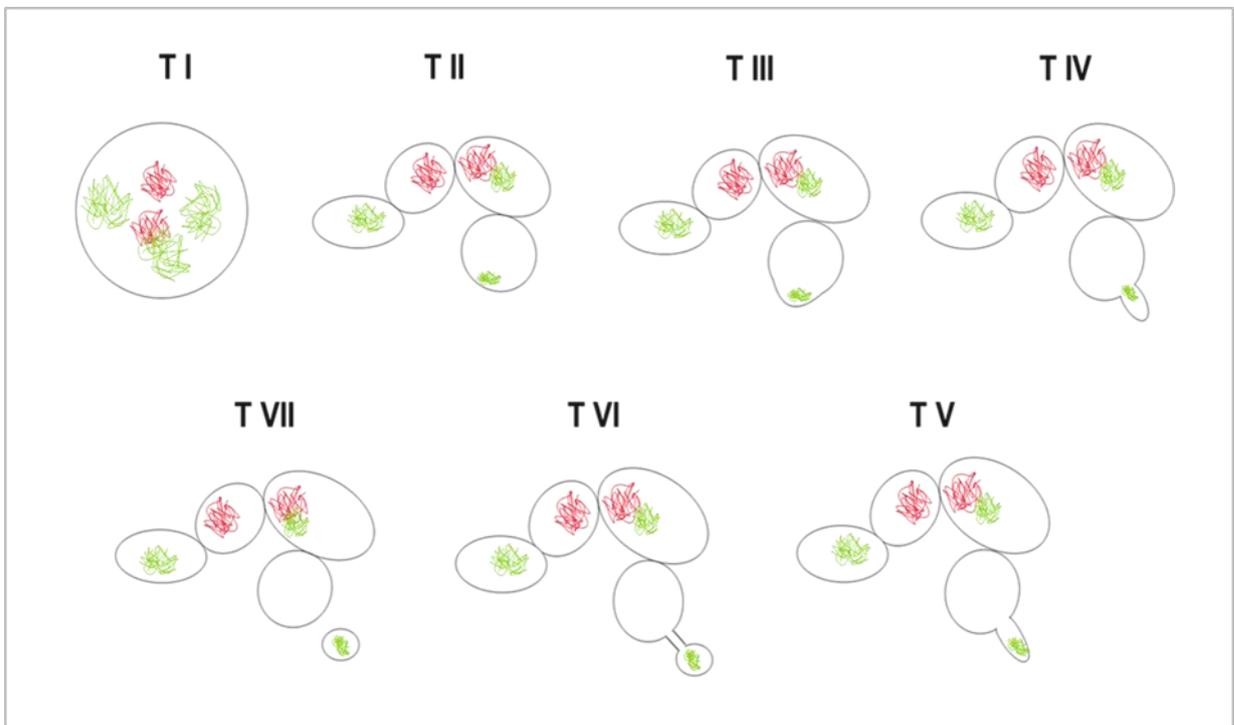
**Figura 19.-** Se presentan ejemplos de las etapas T IV, caracterizada por la migración del TC #18 condensado al interior de una protrusión nuclear (**a1-a2**) y T V con el TC #18 condensado dentro de la protrusión (**b1-d2**). Tratamiento, *FISH* y adquisición de imágenes como en la Figura 17. Barra = 5  $\mu$ m.



**Figura 20.-** Se ilustra la formación de una estructura similar al “palillo de tambor” (T VI; **a1-b2**) y la etapa T VII del proceso con eliminación parcial (**c1-c2**) y total (**d1-d2**) de un TC 18. Tratamiento, *FISH* y adquisición de imágenes como en la Figura 17. Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

El proceso antes mencionado fue subdividido en 7 tipos morfológicos principales (T I a T VII) a efectos de profundizar el estudio de este fenómeno (ver Figura 21). Se identificó una etapa inicial (T I) que corresponde a los núcleos sin modificaciones en el posicionamiento de los TC que corresponden mayormente a núcleos controles ovoides y algunos tratados polilobulados.

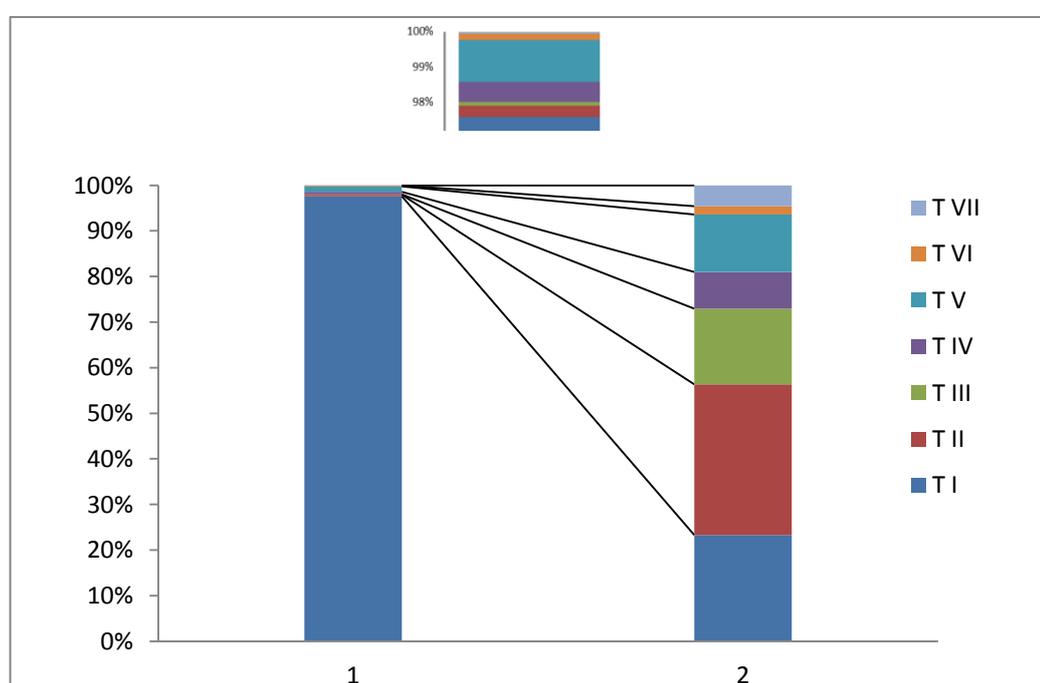
Las etapas subsiguientes corresponden a la segregación/condensación del TC #18 (T II), la deformación de la membrana nuclear vecina (T III), la formación de la protrusión (T IV), la migración del TC #18 al interior de la misma (T V), la estructuración del “palillo de tambor” (T VI) y finalmente la eliminación del TC #18 condensado incluido en un micronúcleo (T VII).



**Figura 21.-** Esquema del proceso de eliminación de un TC #18 supernumerario observado en células de la línea HL60 diferenciadas con *ATRA* (6 días) a granulocitos polimorfonucleares (núcleos polilobulados). El proceso se inicia por la combinación de condensación y segregación de un TC #18 a uno de los lóbulos en la vecindad de la membrana nuclear (T II a T III). El proceso culmina con la formación de una pequeña protrusión nuclear que incluye a un TC #18 y la posterior eliminación de este corpúsculo bajo la forma de un micronúcleo o cuerpo nuclear (T IV a T VII). T I ilustra la distribución de TC #18 y # 19 en un núcleo ovoide correspondiente a una célula no diferenciada tratada con DMSO.

### 5.3 Caracterización de las etapas del proceso de eliminación

En la población control (DMSO) se observó que la mayoría de las células presentaba núcleos ovoides (>95%) correspondientes a T I y el resto la presencia de fenómenos de segregación, condensación y eliminación de un TC #18 (TII - TVII, Gráfico 1). En cambio, las poblaciones celulares tratadas con *ATRA* mostraron un notorio incremento de núcleos polilobulados en las diferentes tipos o fases (T II 33,3 %, T III 16,6%, T IV 8%, T V 12,6%, T VI 1,8% y T VII 4,6%) con la concomitante reducción de T I (23,3%) (Tabla 1). En la población HL60-*ATRA* el tratamiento promueve la generación de protrusiones nucleares de tipo T IV a T VII ( $X = 175,928$ ,  $p = 0.0001$ ).



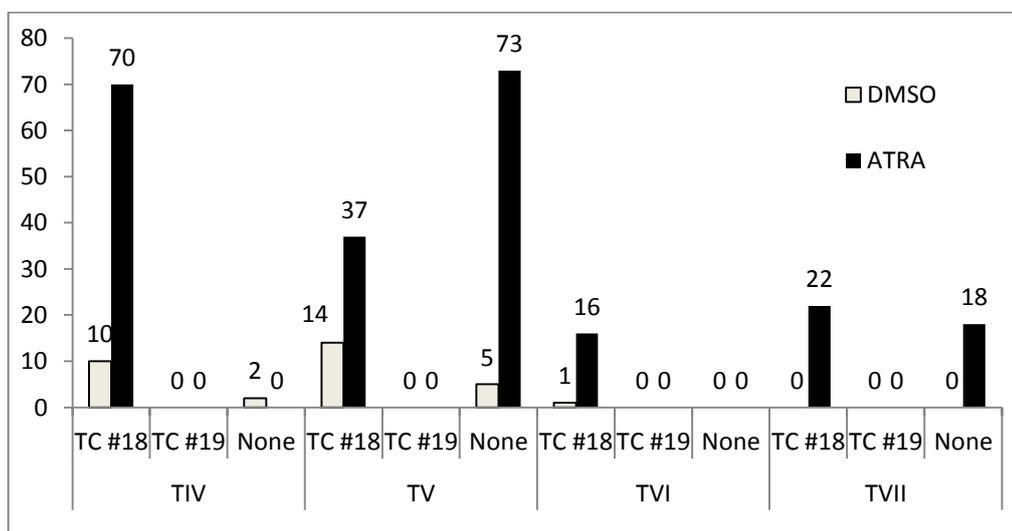
**Gráfico 1.-** Distribución de formas nucleares en células HL60 control (1) y diferenciadas con *ATRA* (2) en los diferentes tipos nucleares del proceso de segregación/condensación/extrusión y eliminación de un TC #18. El inserto en la parte superior corresponde a los tipos T II a T VII del control ampliados para su mejor visualización.

Los núcleos polilobulados de los tipos medios y avanzados (T IV - T VII) en núcleos control (DMSO,  $n = 32$ ) y tratados (*ATRA*,  $n = 236$ ) fueron estudiados en detalle a fin de analizar la distribución de los TC #18 y TC #19 en las protrusiones. En la población de núcleos tratados con *ATRA*, se detectó la presencia de un TC #18 en 61,4 % de las protrusiones (145 en 236). En cambio, no se observaron TC #19 en protrusiones de ninguno de los núcleos analizados. Un importante número ( $n = 91$ ; 38,6 %) de los núcleos tratados presentó protrusiones sin señal de FISH (sólo DAPI)

en los tipos T V (n = 73) y T VII (n = 18) (Tabla 1 y Gráfico 2). HL60-DMSO y HL60- ATRA son poblaciones diferentes ( $X = 101,456$ ;  $p = 0.0001$ ). Sin embargo, dado que el estudio se limitó al empleo de sondas WCP de los TC #18 y TC #19, no puede descartarse la presencia de algún otro TC en las protrusiones.

HL60		T I	T II	T III	T IV	T V	T VI	T VII	Total
C	N	2117	14	2	12 (10)	19 (14)	1 (1)	0	2165
	%	97,78	0,65	0,09	0,55	0,88	0,046	0	
ATRA	N	203	288	145	70 (70)	110 (37)	16 (16)	40 (22)	872
	%	23,3	33,03	16,6	8,0	12,6	1,8	4,6	

**Tabla 1.-** Número (N) y porcentaje (%) de núcleos HL60 control (DMSO) y tratados con ATRA en las diferentes fases del proceso de segregación y eliminación de un TC #18. Nótese que la mayoría de los núcleos control corresponden a T I (97,78%). Se indica entre paréntesis las protrusiones conteniendo un TC #18. Los núcleos tratados se distribuyen en todas las fases exhibiendo mayores frecuencias en T I (23,28%) y T II (33,03%).



**Gráfico 2.-** Presencia de TC en protrusiones nucleares de estado medio y avanzado (T IV - T VII) en células HL60 control (DMSO) y diferenciadas con ATRA durante 6 días. En ordenadas se presenta el número absoluto de núcleos en cada tipo y tratamiento.

Las evidencias obtenidas mediante los ensayo de FISH confirman la pérdida de uno de los TC #18 en la etapa final del mencionado proceso. La existencia de

protrusiones con señal de un TC #18 en núcleos expuestos a DMSO en los tipos T IV a T VI (n = 25) podría indicar la inducción de un proceso de segregación y eliminación de este TC de escasa magnitud, fenómeno que se vería potenciado con la acción de *ATRA* (Gráfico 2).

#### **5.4 Análisis de parámetros estereológicos y posicionales de TC #18 y #19**

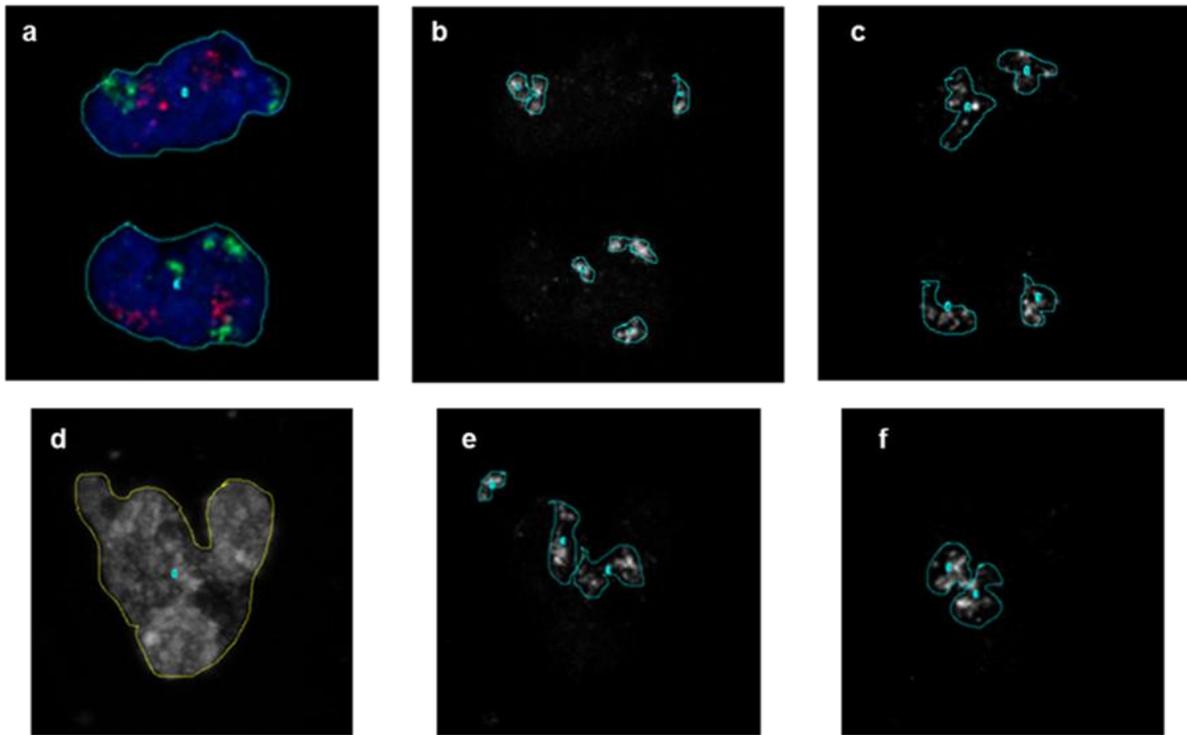
##### *Análisis de múltiples ROI en núcleos T IV a T VII*

Los parámetros utilizados para el análisis cuantitativo (*Image J*) en las imágenes de microscopía confocal fueron: posición (distancia), área y circularidad de los TC #18 y TC #19. En el caso de la estimación de distancias, se emplearon dos estrategias: a) ponderación de distancias entre *ROI* de los TC #18 y #19 (sin considerar la señal de DAPI); b) estimación de distancias de *ROI* de los TC #18 y #19 en relación al centro de masa y centroide del núcleo(*ROI* de DAPI) (Figura 22). En todos los análisis, se consideró en los controles como TC #18e al que mostraba el mayor grado de separación con respecto a los otros TC #18 y #19. La Figura 22 presenta un esquema de los datos que devuelve el algoritmo de análisis de múltiples *ROI* dentro del programa de análisis de imágenes *Image J*.

##### *Distancias del TC #18 extruido (e) y otros TC*

En los *stacks* de núcleos tratados con *ATRA* (n = 35), la estimación de distancias entre los *ROI* de los diferentes TC mostró una mayor distancia en píxeles en términos estadísticos entre el TC #18e y los otros TC #18 ( $p < 0,00001$ ). De manera análoga, los TC #18e mostraron mayor distancia con ambos TC #19 ( $p < 0,00001$ ). Cabe destacar que los TC #18 no extruidos y los TC #19 no mostraron diferencias en sus distancias respectivas ( $p = 0,91$ ) (Gráfico 3).

En estas mediciones los controles (n = 12), presentaron diferencias significativas solamente entre TC #18e y los otros TC #18 ( $p = 0,0015$ ) (Gráfico 3).

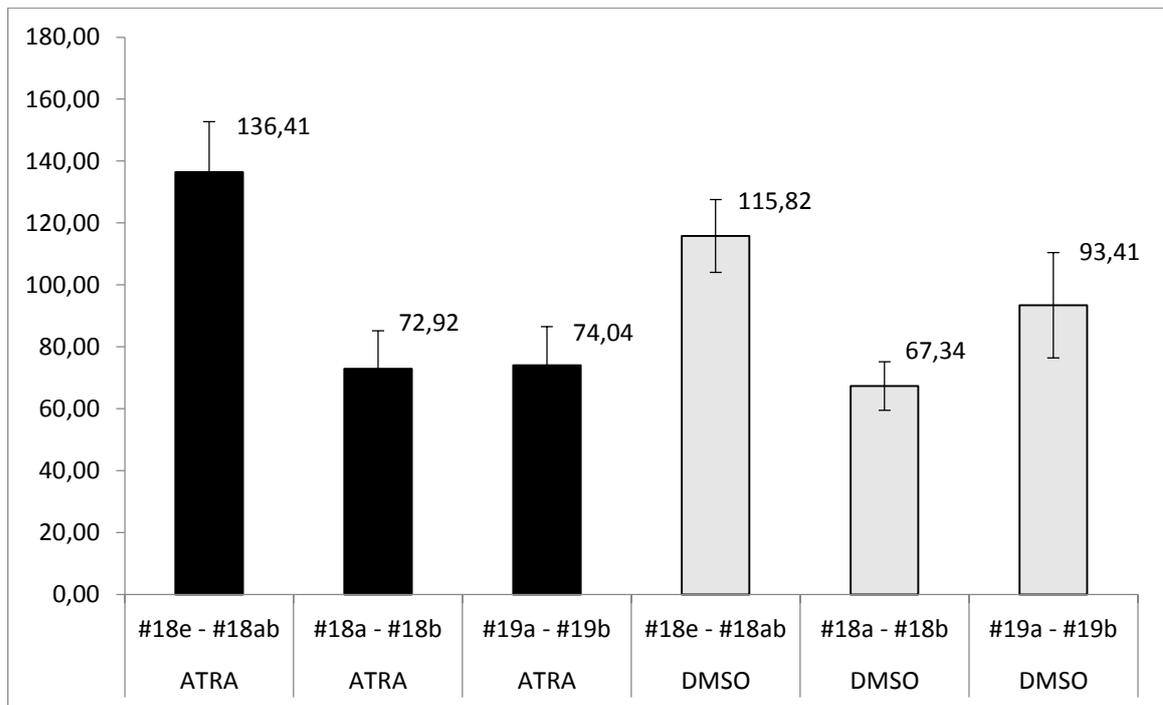


RoiSet	Figura 8b	Area	Mean	SD	X	Y	XM	YM	Perim.	IntDen
18 - Max FITC Z-Projection.tif:0211-0225		6,93E+05	8,61E+04	6,04E+04	2,25E+05	2,11E+05	2,26E+05	2,14E+05	1,19E+05	5,96E+07
28 - Max FITC Z-Projection.tif:0251-0213		1,02E+06	9,77E+04	6,71E+04	2,11E+05	2,51E+05	2,11E+05	2,54E+05	1,55E+05	9,98E+07
38 - Max FITC Z-Projection.tif:0256-0171		8,18E+05	4,17E+04	3,91E+04	1,72E+05	2,57E+05	1,76E+05	2,62E+05	1,37E+05	3,41E+07
48 - Max DAPI Z-Projection.tif:0211-0225		6,93E+05	1,31E+05	2,18E+04	2,25E+05	2,11E+05	2,25E+05	2,10E+05	1,19E+05	9,07E+07
58 - Max DAPI Z-Projection.tif:0251-0213		1,02E+06	1,24E+05	2,61E+04	2,11E+05	2,51E+05	2,11E+05	2,50E+05	1,55E+05	1,26E+08
68 - Max DAPI Z-Projection.tif:0256-0171		8,18E+05	7,92E+04	2,21E+04	1,72E+05	2,57E+05	1,73E+05	2,55E+05	1,37E+05	6,48E+07
18 - Max CY3 Z-Projection.tif:0289-0266		1,66E+06	1,02E+05	7,59E+04	2,66E+05	2,89E+05	2,63E+05	2,89E+05	1,89E+05	1,20E+08
28 - Max DAPI Z-Projection.tif:0289-0266		1,66E+06	9,57E+04	2,00E+04	2,66E+05	2,89E+05	2,66E+05	2,88E+05	1,89E+05	1,59E+08
RoiSet	Figura 10	Area	Mean	SD	X	Y	XM	YM	Perim.	IntDen
110-MAX~2.TIF:0397-0266		1,76E+06	7,12E+04	6,81E+04	2,67E+05	3,99E+05	2,63E+05	4,00E+05	1,59E+05	1,25E+08
210-MAX~2.TIF:0267-0247		4,17E+06	3,98E+04	5,10E+04	2,50E+05	2,71E+05	2,52E+05	2,70E+05	2,91E+05	1,66E+08
310-MAX~2.TIF:0156-0270		2,79E+06	3,09E+04	5,05E+04	2,53E+05	1,57E+05	2,54E+05	1,52E+05	3,20E+05	8,62E+07

**Figura 22.-** Ejemplo de información que aporta la herramienta *ROI Manager (Image J)* para el análisis de distancias, áreas y circularidad de TC #18 y TC #19 en núcleos tratados y control. **a y d.** ROI de núcleo (DAPI). **b, c, e, f.** ROI de diferentes TC.

### *Distancias de los TC al centro de masa nuclear*

En este caso se estimó el centro de masa nuclear (canal de DAPI) y a partir de ese ROI y los correspondientes a cada TC se calcularon las distancias entre los mismos (ver 3.3.3). Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre TC #18e con respecto al resto de TC #18 ( $p < 0,001$ ) y los TC #19 ( $p < 0,0001$ ). Como en la estrategia de cálculo anterior, los TC #18 no extruidos y los TC #19 tampoco presentaron diferencias en sus distancias respectivas ( $p = 0,48$ ).



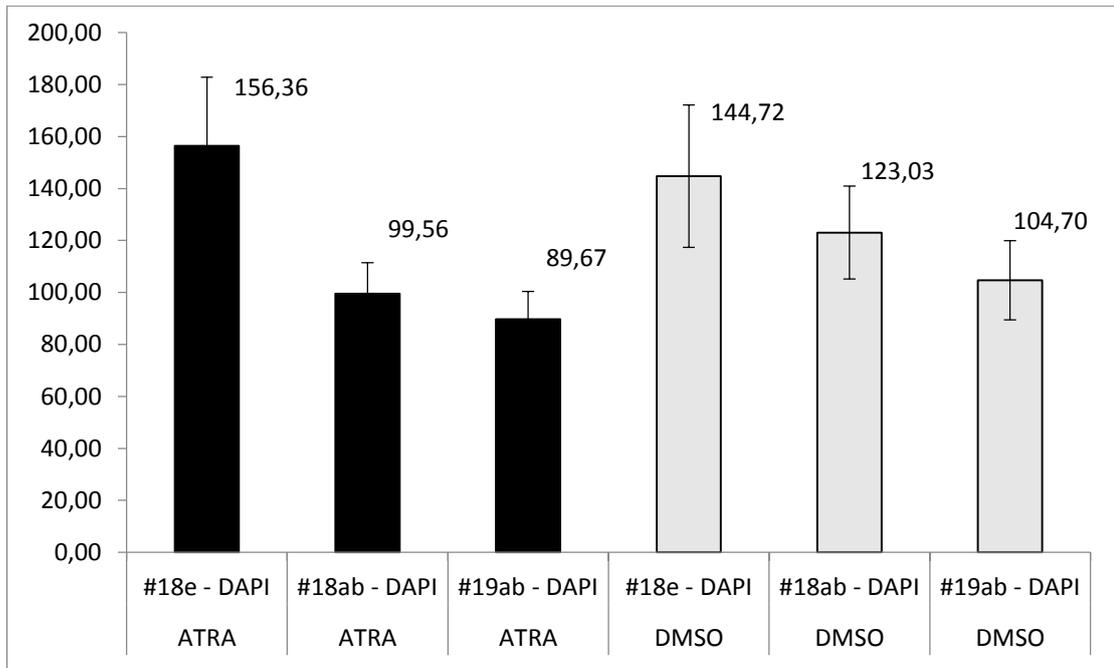
**Gráfico 3.-**Distancias medidas en pixeles de TC #18 extruido (e) y no extruidos (ab) y TC #19 (ab) en núcleos tratados y controles utilizando ROI para cada TC. Los datos se presentan como Media ± ES (pixeles).

Los controles no presentaron diferencias significativas en las distancias del TC #18e tanto con los otros TC #18 como los TC #19 (Gráfico 4).

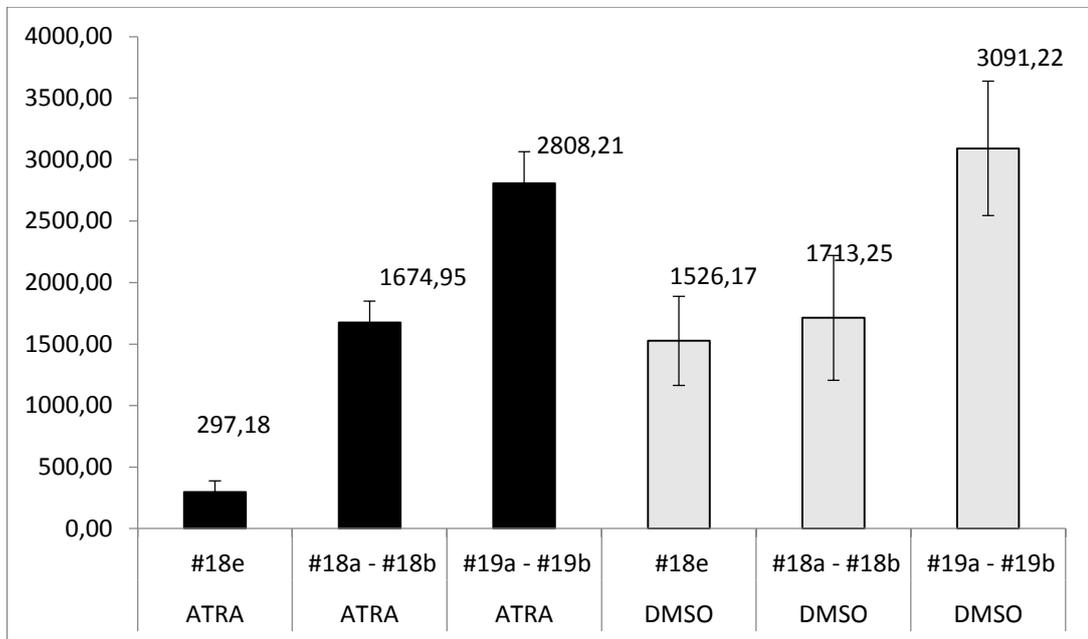
Como puede observarse, ambas herramientas analíticas aportaron resultados similares en el posicionamiento de los TC a nivel nuclear.

#### *Estimación de áreas en los TC #18 y #19*

En la población de núcleos tratados ( $n = 28$ ), el TC #18 extruido ocupa un área significativamente menor comparado a las áreas medias de ambos TC #18 y los dos TC #19 ( $p < 0,0001$ ). Del mismo modo, los TCs #18 no extruidos (#18 ab) también ocupan un área significativamente menor respecto a los TC #19 ( $p = 0,00041$ ). En los controles ( $n = 9$ ), es también significativa la diferencia de área entre TC #18e y los otros TC#18 (TC #18ab) (Gráfico 5).



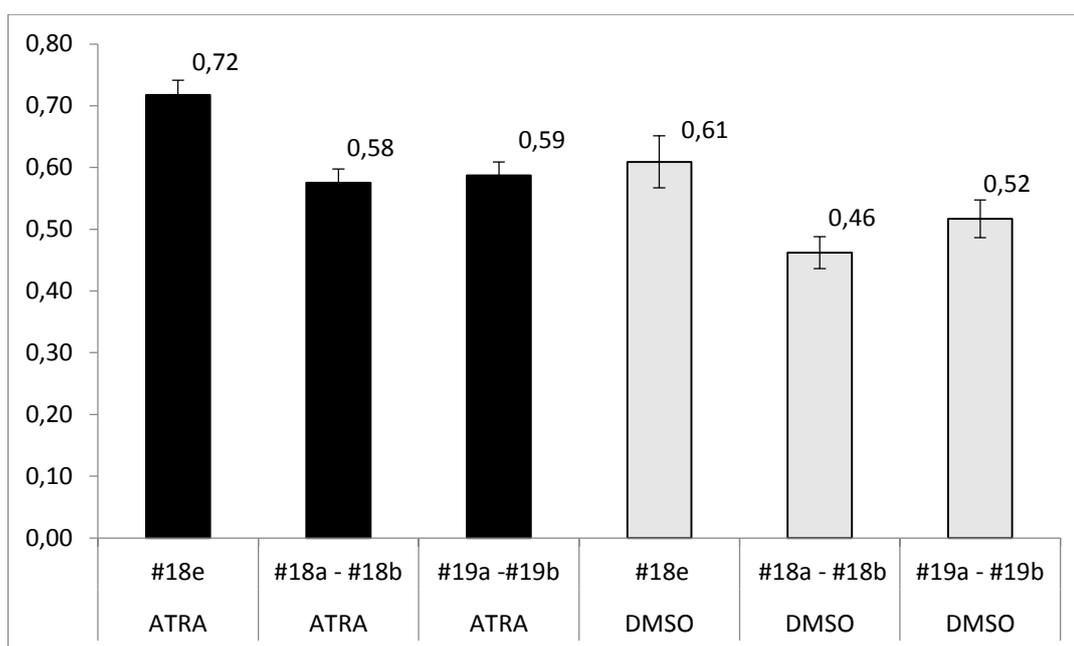
**Gráfico 4.-** Distancias medidas en pixeles de TC #18 extruido (e) y no extruidos (ab) y TC #19 (ab) en núcleos tratados y empleando un *ROI* para determinar el centro de masa nuclear. Los datos se presentan como Media  $\pm$  ES (pixeles) del TC #18e, ambos TC #18 y los dos TC #19.



**Gráfico 5.-** Áreas de TC #18 extruido (#18e), ambos TC #18 (#18a - #18b) y el par de TC #19 (#19a - #19b) en poblaciones de núcleos tratados con *ATRA* y control (*DMSO*). Los datos se presentan como Media de pixeles  $\pm$  ES.

## Circularidad de los TC #18 y #19

El grado de circularidad del TC #18 extruido (#18e) en los núcleos tratados es el que más se acerca a la unidad (0,72) mostrando diferencias significativas respecto al promedio los TC #18 no extruidos (#18a - #18b) y los dos TC #19 (#19a - #19b) ( $p < 0,0001$ ). Los TC #18 y #19 presentan similar grado de circularidad en los núcleos tratados ( $p = 0,63$ ). En los controles también es significativa la diferencia entre TC #18e y los TC #19 ( $p = 0,03$ ).

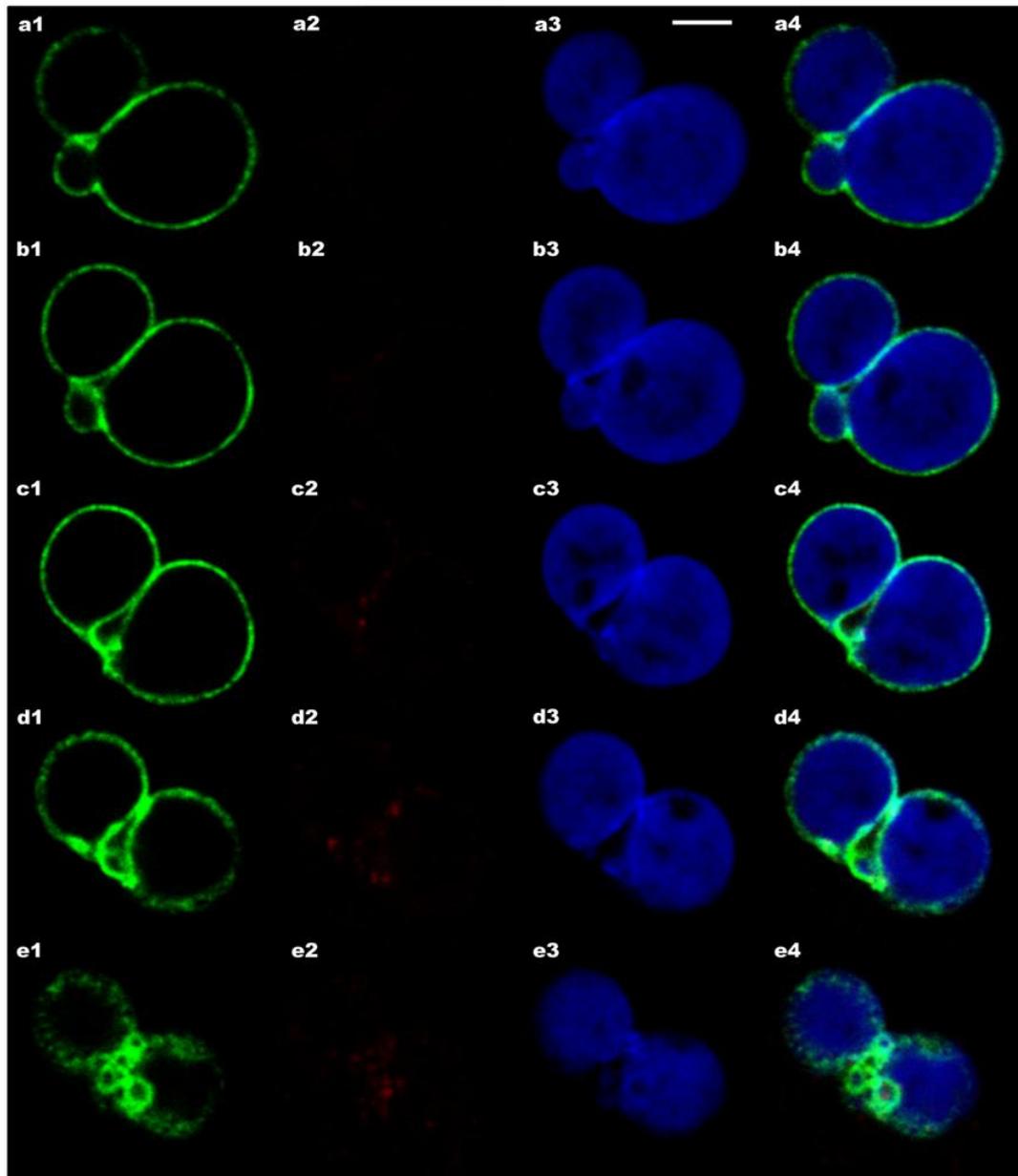


**Gráfico 6.-** Grado de circularidad de TC #18 extruido (#18e), ambos TC #18 no extruidos (#18a - #18b) y el par TC #19 en poblaciones de núcleos tratados con *ATRA* y control (*DMSO*). Los datos se presentan como Media de píxeles  $\pm$  ES.

## 5.5 Perfiles de intensidad del contenido de laminas tipo A-C y B

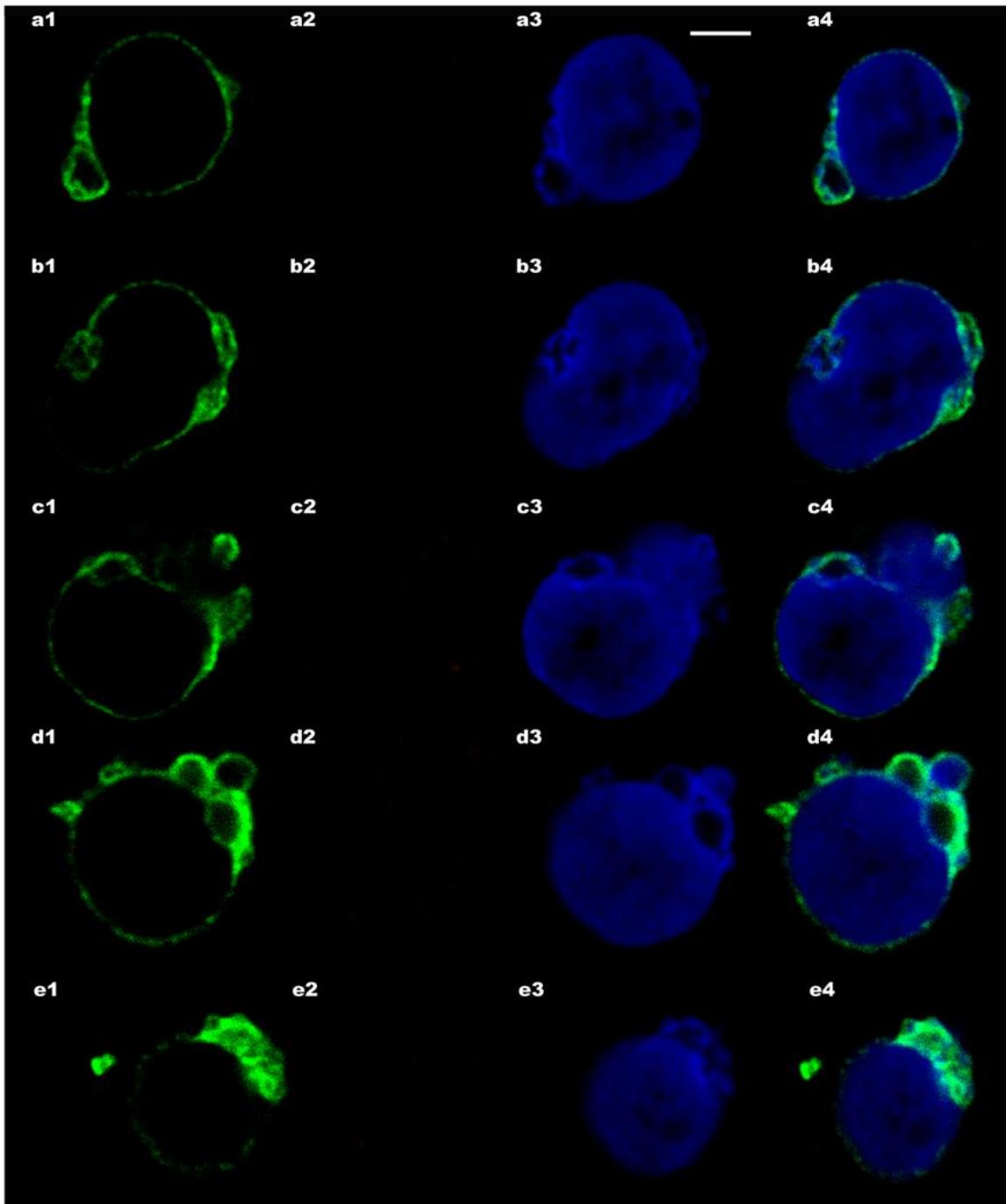
El estudio por microscopía confocal (3D) de núcleos tratados con *ATRA* y controles innumerados para laminas reveló la presencia de una intensa señal para lamina B. En cambio, se detectó una escasa marcación para las laminas A-C (Figuras 23 y 24). Los núcleos tratados mostraron numerosas protrusiones nucleares de variado tamaño cuya periferia es también positiva para lamina B. En algunos casos, se observan protrusiones de límites engrosados con mayor intensidad de la señal fluorescente. Este hecho es aún más evidente al analizar planos seleccionados del

*stack*. Las protrusiones que evolucionan y finalmente se separan de la masa nuclear principal (micronúcleos) son igualmente ricas en lamina B (Figura 24, e-1 a e-4).

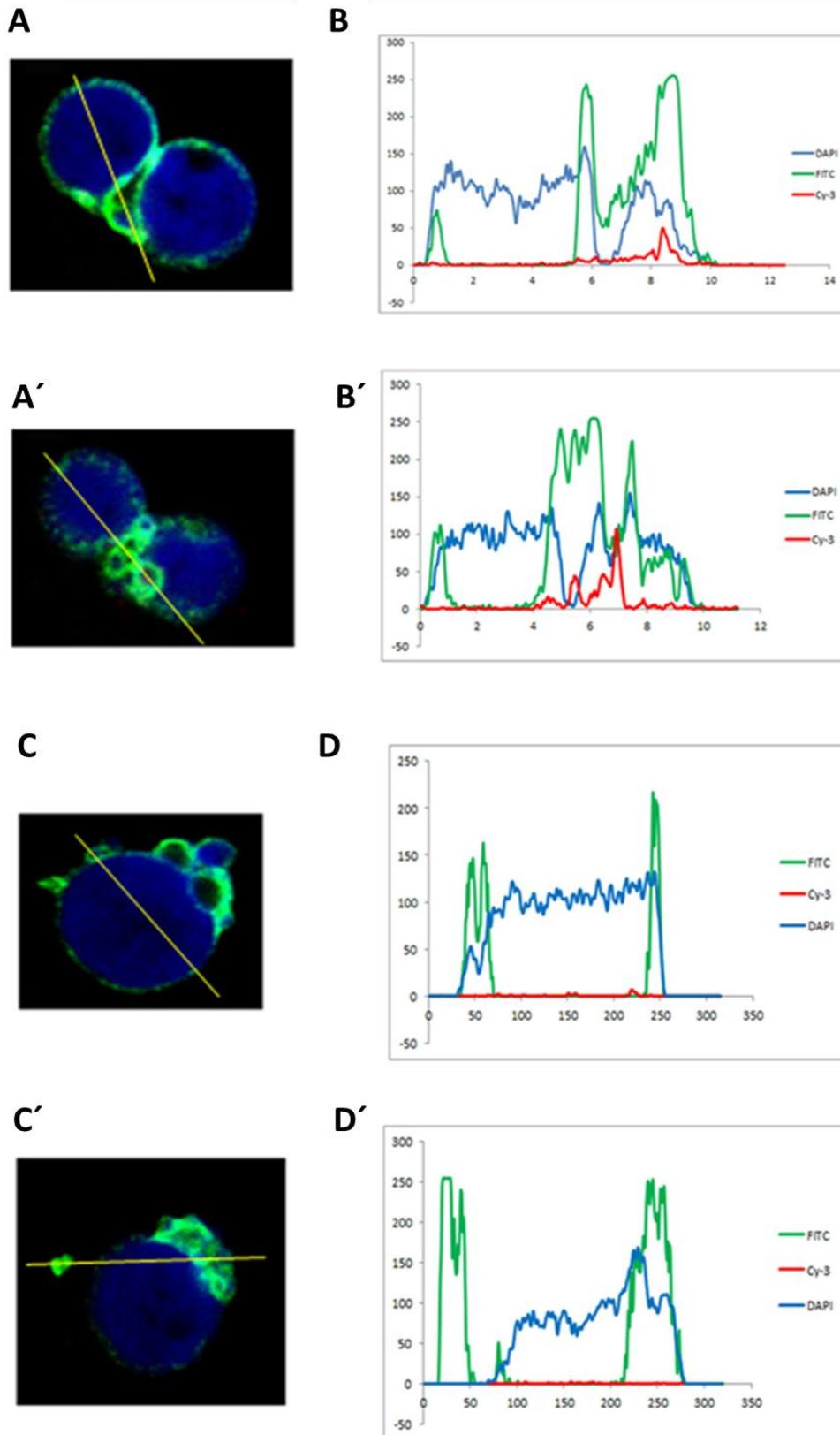


**Figura 23.-** Imágenes confocales correspondientes a 5 planos en el eje z (**z 19, 22, 30, 37 y 42**) de un núcleo de HL60 diferenciado *in vitro* con ATRA. Los paneles **a1-e1** y **a2-e2** ilustran respectivamente la marcación de lamina B (anticuerpo conjugado a FITC) y de lamina A-C (anticuerpo conjugado a Cy-3). La contratinción con DAPI se presenta en los paneles **a3-e3** mientras que los paneles **a4-e4** ilustran la superposición de las tres señales de fluorescencia. Barra = 5  $\mu$ m.

Las células HL60 adheridas a sustratos evidencian un mayor número de protrusiones que en núcleos fijados en metanol-acético (3:1) para estudios 2D mediante tinción con Giemsa o FISH. La figura 25 presenta los perfiles de intensidad de marcación de lamina B, Lamina A-C y DAPI en núcleos polilobulados con protrusiones o eliminación de material nuclear.



**Figura 24.-** Imágenes confocales correspondientes a 5 planos en el eje z (**z 19, 28, 37, 48 y 53**) de otro núcleo de HL60 diferenciado *in vitro* con ATRA. Nótese la intensa marcación de la periferia de las protrusiones (**d1**) y el micronúcleo (**e1**). Las inmunomarcaciones y contratinción como en la Figura 23. Barra = 5 $\mu$ m.



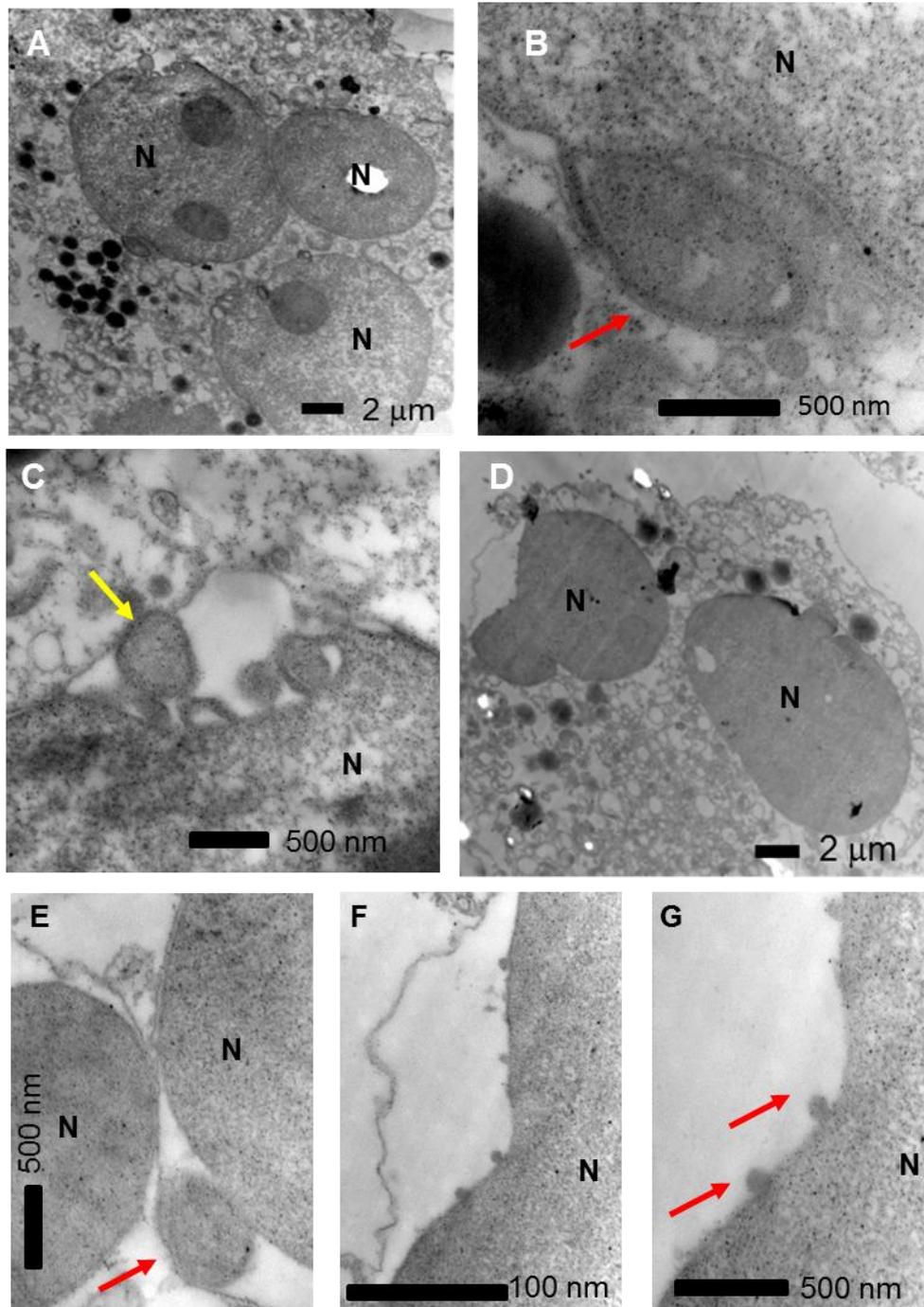
**Figura 25.-**Perfiles de intensidad de la inmunomarcación de laminas tipo A-C y B en núcleos de células HL60 diferenciadas *in vitro* con ATRA (6 días). Se ilustran los planos (z) 37 y 42 de la Figura 23 y los planos (z) 48 y 53 de la Figura 24. Se observa un enriquecimiento de la señal de lamina B en la periferia de las protrusiones (A-B y A'-B') y el micronúcleo (C-C y C'- D').

## 5.6 Análisis estructural y ultraestructural de células HL60

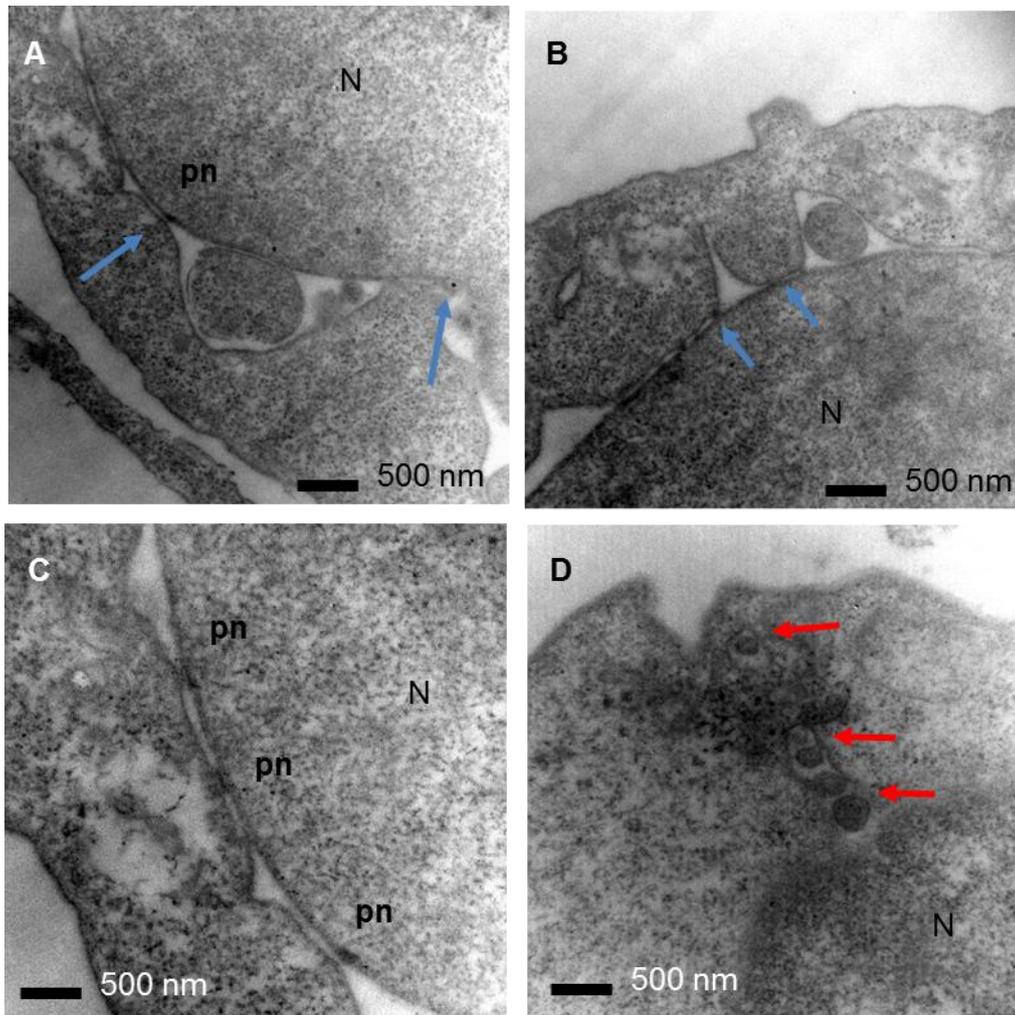
Dado que la línea celular HL60 crece en suspensión, se seleccionó el método de secado de punto crítico como el más apropiado para la conservación de las estructuras celulares. Los estudios preliminares desarrollados en células HL60 expuestas a DMSO o *ATRA* empleando MET y MEB mostraron una serie de cambios morfológicos que involucran principalmente la estructura de la envoltura nuclear (EN). Los núcleos tratados no presentan la característica distribución periférica y densa de la heterocromatina de los granulocitos normales sino cromatina homogénea y compacta y una relación núcleo-citoplasma más elevada que los controles. El examen de los cortes por MET revelaron la presencia de protrusiones nucleares de características similares a los *ELCS* (ver Introducción) de tamaños variados y patrones diversos de densidad electrónica (14/15 núcleos expuestos a *ATRA* y 20/21 tratados con DMSO). Por otra parte, se evidenciaron regiones con dilatación del espacio perinuclear y amplia separación entre las capas interna y externa de la EN.

En el neoespacio intermembrana se observaron, con relativa frecuencia, cuerpos de diferentes dimensiones ocasionalmente conectados a una de las capas de la membrana nuclear o material de tipo fibrilar o amorfo. Los cuerpos nucleares presentaron tamaño variable (0,43 - 0,56  $\mu\text{m}$ ) y diferente contenido (Figura 26). El análisis pormenorizado de los cortes ultrafinos para MET (40-60 nm) mostró la existencia de conexiones de las protrusiones con la masa nuclear principal en la mayoría de los casos. Asimismo, algunas protrusiones presentaron relación de vecindad con los poros nucleares (Figura 27, pn). Finalmente, algunas células presentaron dilataciones extremas del espacio entre ambas capas de la EN que abarcan una considerable proporción del perímetro del núcleo. Las dilataciones son más extremas en las células tratadas con *ATRA* que en los controles. ( $p = 0,01$ ) (Figura 28, A-C). En algunos casos extremos, estas estructuras se acercan a la membrana plasmática (Figura 27, D).

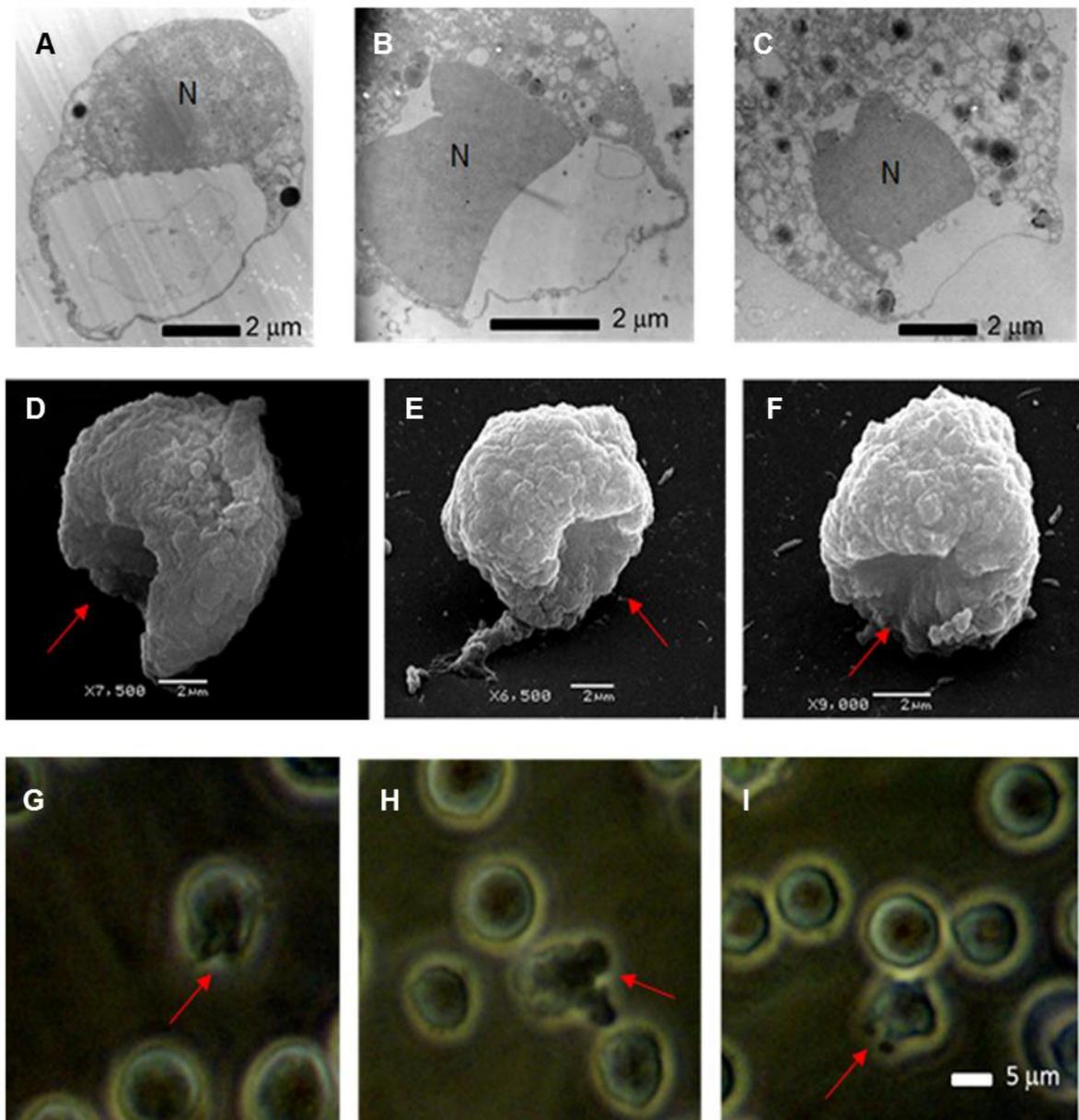
En los estudios por MEB (imágenes estereoscópicas reales) fue posible revelar drásticos cambios en la morfología externa de las células tratadas con *ATRA* generalmente constituidas por notorias invaginaciones (Figura 28, D-F) que podrían corresponder con algunas de las importantes modificaciones observadas en células HL60 en cultivo y sometidas a la acción de *ATRA* (Figura 28, G-I).



**Figura 26.-** MET de células HL60 tratadas con *ATRA* (6 días). **A.** Se observa a bajo aumento un núcleo polilobulado que exhibe una protrusión (flecha blanca) y dilatación del espacio perinuclear de la EN (flecha roja). **B-C.** Imágenes a mayor aumento de las estructuras descritas en **A** (flechas). **D.** Un lóbulo nuclear con clara dilatación del espacio perinuclear. **E** se ilustra otra protrusión nuclear adosada a la capa externa de la EN en un núcleo diferenciado (flecha roja). **E-G.** Dilatación del espacio entre las capas de la envoltura nuclear con microprotrusiones nucleares a dos diferentes aumentos (flechas rojas).



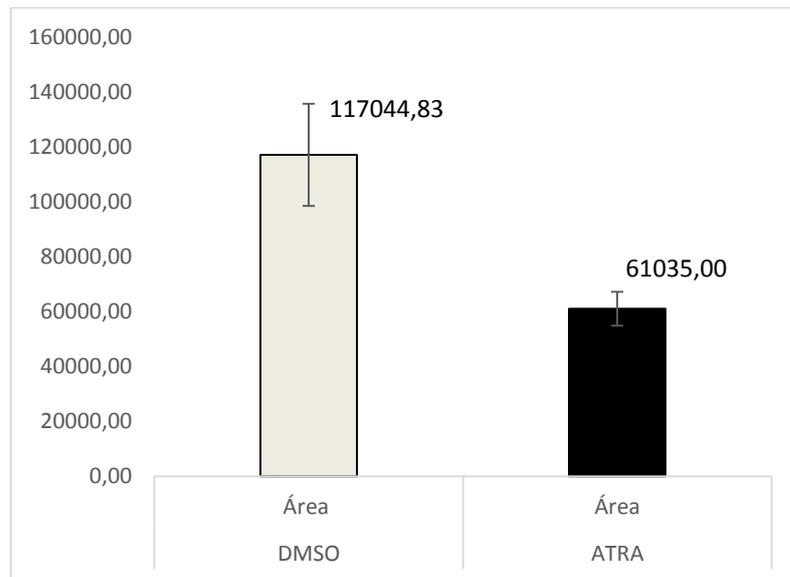
**Figura 27.-** MET de células HL60 tratadas con *ATRA* y *DMSO* (6 días). **A.** Se observa un núcleo diferenciado (N) que exhibe una protrusión prominente ubicada en el espacio intermembrana y poros nucleares contiguos (pn). **B.** Dilatación de las capas interna y externa de la EN con una protrusión nuclear en un núcleo expuesto a *DMSO*. **C.** Imágenes a mayor aumento de los poros nucleares en el núcleo diferenciado en **A.** En **D** se ilustra una serie de cuerpos (flechas rojas) saliendo del núcleo (N) en dirección a la membrana plasmática en una célula diferenciada con *ATRA*.



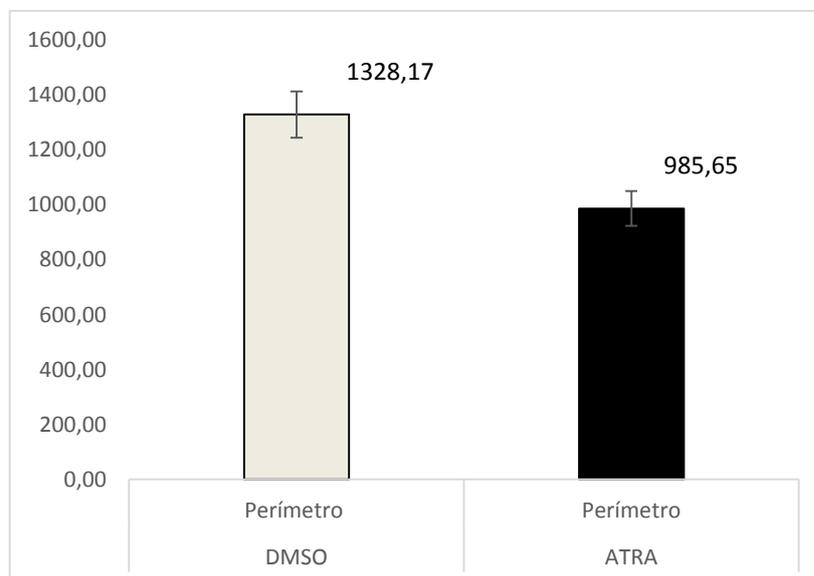
**Figura 28.- A-C.** Microscopía electrónica de transmisión (MET). Cortes ultrafinos de células HL60 (30-60 nm) diferenciadas con *ATRA* (6 días) y teñidas con acetato de uranilo. Se observa amplia separación de la membrana nuclear externa y generación de una cavidad entre las capas de la EN. **D-F.** MEB de células HL60 diferenciadas con *ATRA* (6 días) metalizadas con una capa fina de oro puro (120 segundos) en las cuales se observan claras invaginaciones. **G-I.** Imágenes obtenidas en microscopio invertido (40x, contraste de fases) ilustrando las complejas morfologías que presentan las células HL60 expuestas a *ATRA* (6 días).

En los cortes ultrafinos de núcleos tratados con *ATRA* ( $n = 29$  células), la estimación de áreas entre los *ROI* de los diferentes núcleos mostró una menor área en píxeles en términos estadísticos entre la población de núcleos diferenciados con *ATRA* y la

población control (n = 20 células) ( $p = 0,0071$ ). De manera análoga, los núcleos diferenciados mostraron menor perímetro ( $p = 0,0021$ ) (Gráficos 7 y 8).



**Gráfico 7.-** Áreas nucleares medidas en pixeles de núcleos de HL60 diferenciados con *ATRA* y control (DMSO) utilizando *ROI* para cada célula. Los datos se presentan como Media  $\pm$  ES (pixeles).



**Gráfico 8.-** Perímetro de núcleos medidos en pixeles de células HL60 diferenciadas con *ATRA* y control (DMSO) utilizando *ROI* para cada célula. Los datos se presentan como Media  $\pm$  ES (pixeles).

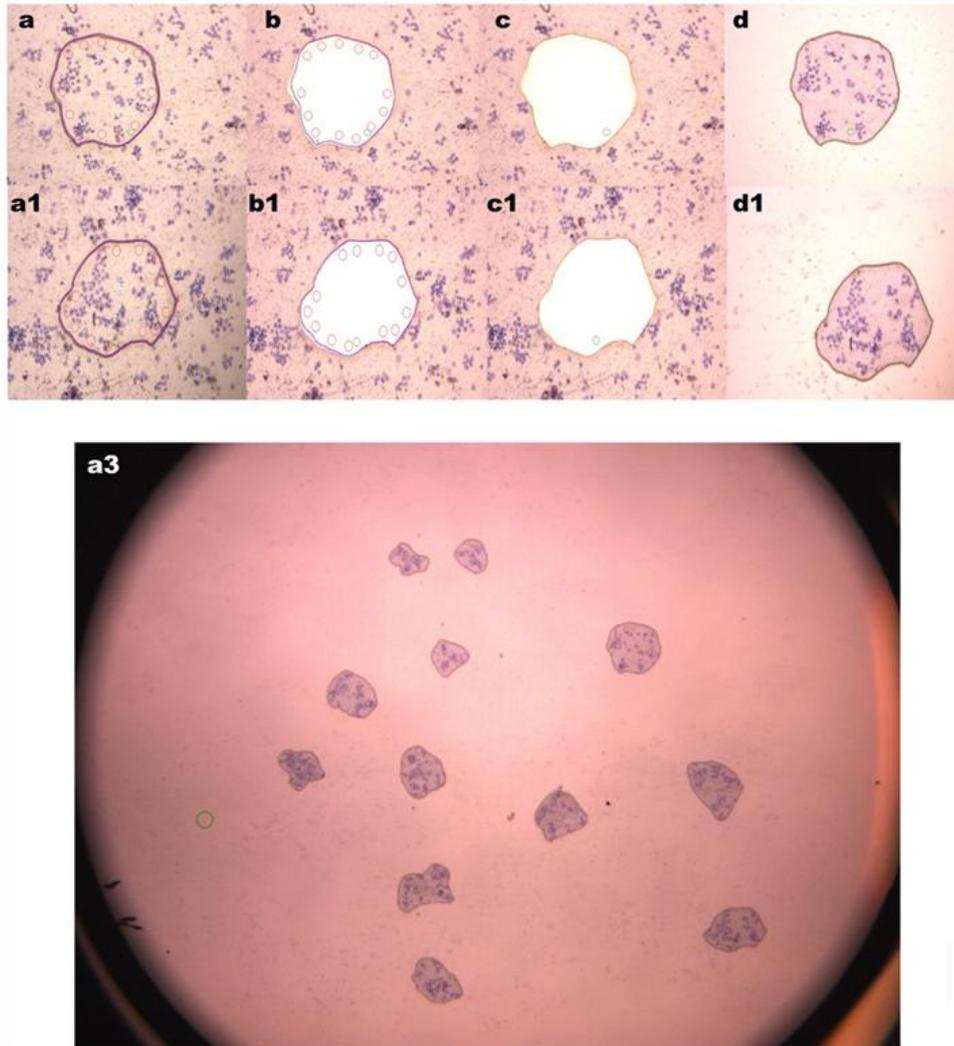
## 5.7 Obtención de ARN total de núcleos completos y protrusiones de la envoltura nuclear

Con el fin de analizar las características genéticas y epigenéticas de las protrusiones nucleares generadas durante el proceso de diferenciación de HL60 a granulocitos maduros se ajustó la técnica de Microdissección LASER (MDL). La implementación de la técnica de MDL para la captura de protrusiones nucleares permitirán avanzar en el conocimiento del contenido de dichas estructuras sobretodo en relación a la presencia de ARN específicos de tipo *Xist*.

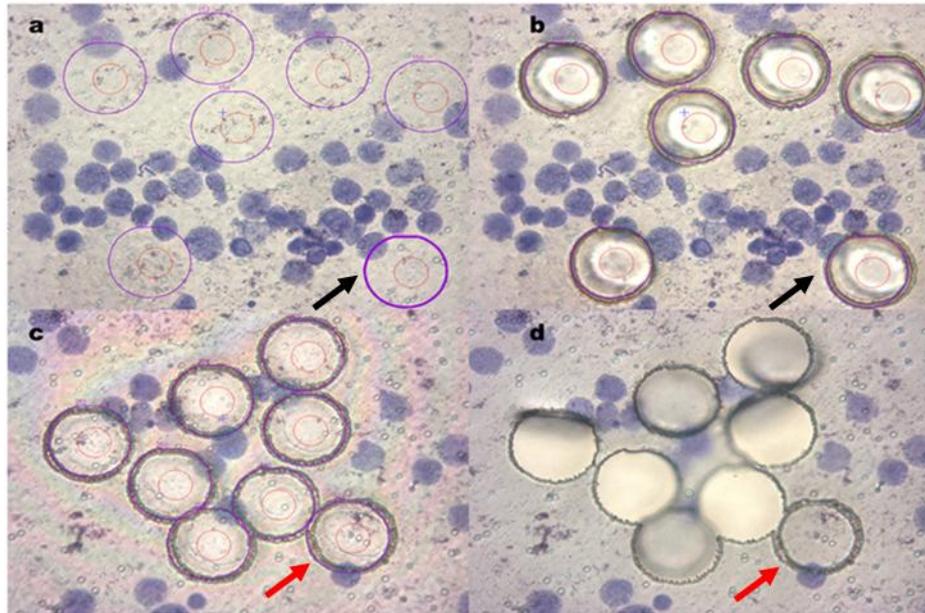
Empleando un equipo de MDL se llevaron a cabo tres tipos de capturas con diferente carga de material nuclear correspondiente a células HL60 tratadas y control: a) macromuestras conteniendo conjuntos de núcleos; b) micromuestras abarcando áreas nucleares semejantes a las protrusiones y c) protrusiones nucleares de núcleos polilobulados. En un primer ensayo se tomaron muestras nucleares para los ajustes de los LASER de corte y captura así como el tipo de corte a realizar (manual o automático) con el fin de obtener un producto en las mejores condiciones para el procesamiento del ARN. Se cuantificó el número de recortes capturados para llevar un registro de la cantidad mínima de material necesario para este tipo de ensayo. La optimización del ancho de corte e intensidad del LASER son claves a fin de maximizar el rendimiento de las capturas finales.

En el experimento de macromuestras se logró recortar y capturar 11 campos conteniendo 1057 núcleos completos que correspondió al máximo de material analizado (Figura 29). Del mismo modo, se estableció la mínima cantidad de material nuclear necesario para áreas nucleares semejantes a protrusiones ( $n = 255$ ) y para protrusiones ( $n = 255$ ) (Figura 30). Ambos tipos de muestras (macro y micromuestras) fueron utilizadas para extracción de ARN obteniéndose, en cada caso, un volumen final de extracción de 12  $\mu\text{L}$ .

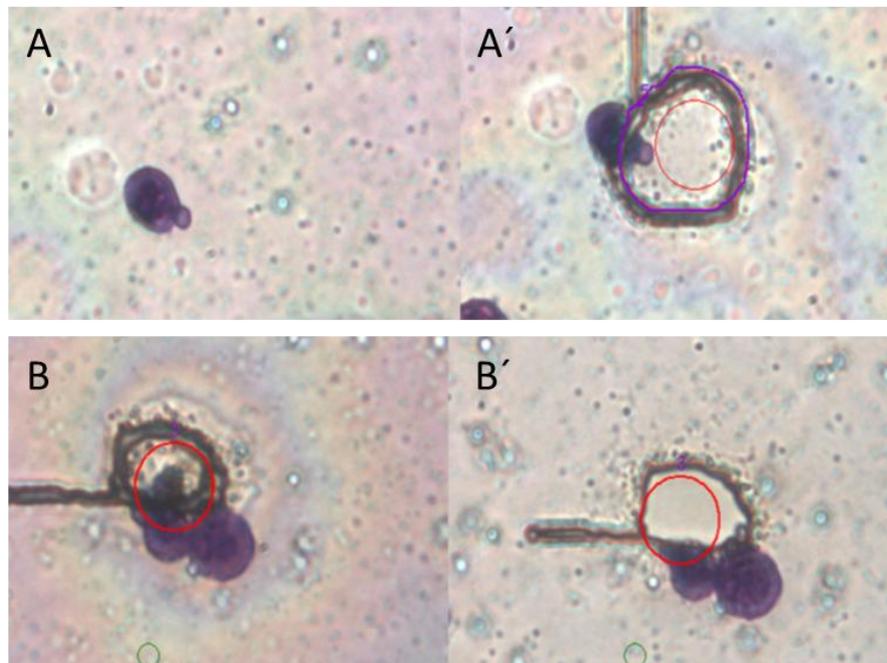
En algunos casos se evidencia en las micrografías el paso del LASER sobre el contorno del área seleccionada, aunque la misma no logra ser catapultada a la tapa del microtubo por la energía de la segunda emisión LASER (infrarrojo) perdiéndose, por tanto, su captura (Figura 31; d, flecha). Los cortes y capturas de protrusiones correspondientes a núcleos polilobulados tratados con *ATRA* se ilustran en la Figura 31.



**Figura 29.-** Micrografías de macromuestras (conjuntos de núcleos) de células HL60 control (DMSO). Los núcleos fueron fijados en metanol acético (3:1) y teñidos con Giemsa (3%; 10 min). **a-a1.**selección del área de corte de macromuestras; **b-b1.** Corte automático con el LASER UV (405 nm); **c-c1.** Captura de los recortes de la membrana de acetato con LASER infrarrojo (600 nm); **d-d1.** Imagen de las macromuestras en la cara interna de la tapa del microtubo. **a3)** vista panorámica del conjunto de macromuestras capturadas (tapa del microtubo). Equipo de MDL Arcturus XT de IByME-CONICET.



**Figura 30.-** Micrografías de microcortes (áreas similares a protrusiones) de núcleos de células HL60 expuestas a DMSO (6 días). **a.** selección de las porciones de núcleos a cortar (flecha negra); **b.** corte automático con el LASER UV (flecha negra); **c** y **d.** etapas de catapulta y captura de los recortes con LASER infrarrojo. La flecha roja en **d** indica una falla en el proceso de captura. Fijación, tinción de los núcleos y equipo empleado como en la Figura 29.



**Figura 31.-** MDL de núcleos de granulocitos HL60 diferenciados *in vitro* con ATRA (6 días). El área de corte contiene únicamente la región de la protrusión nuclear. **A-A'**. Núcleo con protrusión y corte manual de la protrusión con LASER UV; **B-B'**. Corte manual y captura de la protrusión. Fijación, tinción de los núcleos y equipo empleado como en la Figura 29.

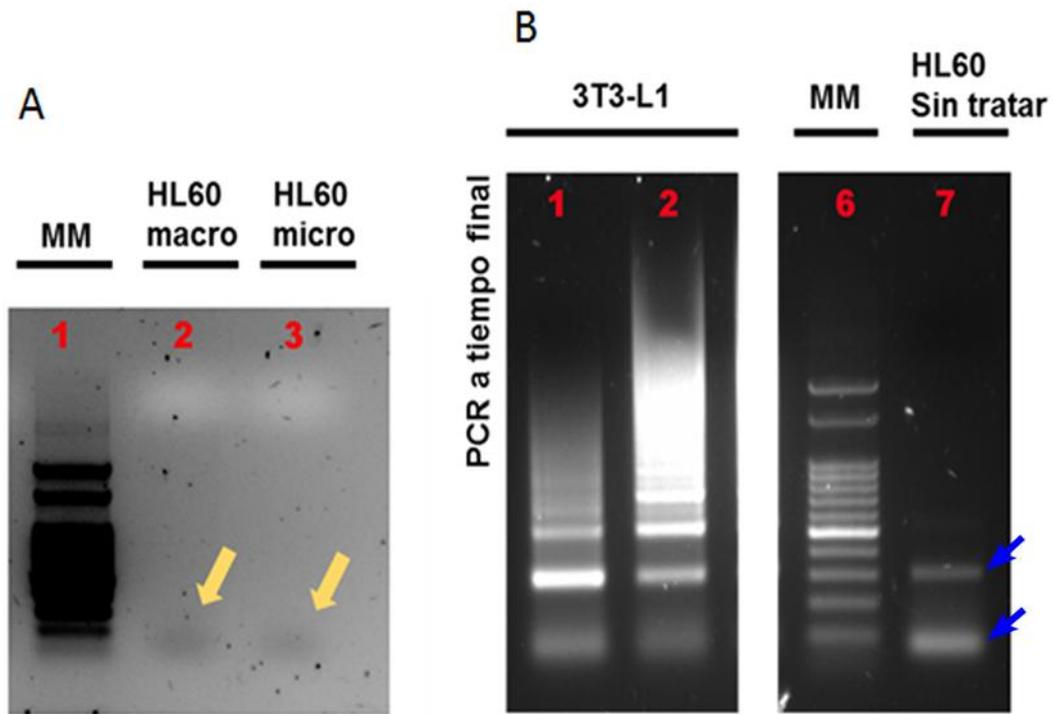
Se aisló el ARN total y se confirmó por ensayo de amplificación por PCR a tiempo final la calidad del material recolectado por MDL (Figura 32, A). Las fracciones de ARN total aislado de las macro y micromuestras (células control) obtenidas por microdissección LASER (MDL) mostraron buena integridad al amplificar el gen de satélite mayor (banda de 100 pb).

A partir de células HL60 en cultivo y diferenciadas con *ATRA*, se aisló ARN total de buena concentración y pureza. Seguidamente se procedió a la conversión del ARN (1µg/µL) a ADN copia (ADNc) mediante RT-PCR con transcriptasa reversa y *primers* de tipo universal. Se midió la concentración y pureza del ADNc.

El ADNc se utilizó como molde para amplificar el gen del satélite mayor de ratón en HL60 sin diferenciar en el rango de 300 y 100 pb. Como control positivo se utilizaron fracciones de ADNc de células pre-adipocíticas (3T3-L1). Las dos bandas que definen el perfil de amplificación para HL60 sin tratar coinciden con las últimas dos bandas en las células 3T3-L1 (Figura 32, B).

Las secuencias amplificadas de satélite mayor en las células 3T3-L1 exhiben una variación de fragmentos mientras que la línea HL60 tratada con DMSO mostró un patrón de dos bandas bien definidas (100 y 300 pb). Pese a la diferencia en la expresión de transcritos de satélite mayor en ambas líneas celulares, las dos bandas de HL60 coinciden en tamaño con las últimas dos bandas de amplificación de la línea celular 3T3-L1 (Figura 32, B).

No fue posible realizar ensayos de colecta de protusiones nucleares con extracción de ARN total en la población de células diferenciadas con *ATRA* dada la breve pasantía en IByME.



**Figura 32.-** Productos de amplificación de PCR a tiempo final para secuencias de satélite mayor (ratón) en muestras de ADNc. El ARN total fue aislado de macro y micromuestras de núcleos de HL60 (tratados con DMSO) colectados por MDL. **A.** la amplificación de macro- y micromuestras (carriles 2 y 3, respectivamente) muestra una única banda de 100 pb (flecha amarilla). **B.** Productos de amplificación por PCR a tiempo final de secuencias de satélite mayor en controles de amplificación (células pre-adipocíticas 3T3-L1: carriles 1 y 2) y células HL60 sin tratar (carril 7; flechas azules). En los carriles (1 y 2) control se observan múltiples bandas con tamaños acordes al patrón establecido en el IByME. En las células HL60 sin tratar se observan dos bandas de 100 y 300 pb. **MM:** el carril 6 corresponde al marcador de peso molecular (100-2080 pb); la banda intensa corresponde a 500 pb. Tinción: Syber Safe. (La imagen corresponde a un único gel con carriles recortados).

---

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 Diferenciación de HL60 a granulocitos maduros

Los resultados obtenidos confirman que se logró la diferenciación *in vitro* de las células HL60 a granulocitos en base a la exposición a *ATRA* durante 6 días. Se observó la inducción de cambios en la morfología celular y polilobulación nuclear características de los granulocitos. Los estudios citométricos revelaron una manifiesta detención del ciclo celular en las células HL60 diferenciadas con *ATRA* con una muy elevada proporción de células (84%) en fase G0/G1 del ciclo celular comparado con los controles (PBS y DMSO). Estas observaciones indican que las células que responden a *ATRA* alcanzan un estado no proliferativo irreversible que coincide con la generación de granulocitos maduros (Collin y Foster 1983). Sin embargo, se observa un conjunto de células en G2/M que puede corresponder a una subpoblación indiferenciada que no responde a *ATRA* y desarrolla, por tanto, un ciclo celular de características normales. Sumado a los patrones morfológicos y citométricos, la diferenciación a granulocitos fue confirmada por el inmunofenotipo de las poblaciones HL60 expuestas a *ATRA* con una marcada expresión de CD11b.

### 6.2 Eliminación de un TC #18 en un entorno trisómico

La colección de sondas para detectar los TC #18 y #19 generadas por DOP-PCR presentaron un buen nivel de especificidad mostrando señales bien definidas con microscopía de fluorescencia y confocal. Dicha especificidad permitió topografiar con precisión los tres TC #18 y el par de TC #19 en núcleos y metafases de la línea HL60 (Figura 17).

El análisis de los núcleos tratados con *ATRA* reveló la existencia de un proceso de condensación y segregación hacia un lóbulo periférico de un TC #18 que continúa con la inclusión del mismo en una protrusión nuclear y la formación de una estructura similar al “palillo de tambor”. El proceso culmina con la eliminación del TC involucrado (Figuras 18-20). Del total de núcleos diferenciados estudiados (n = 872), 145 presentaron protrusiones conteniendo un TC #18 (16,63%). Cabe destacar que

del total de protrusiones observadas ( $n = 236$ , T IV a T VII), el 61,4% contenía un TC #18 lo que implica una generación de estas estructuras superior al mecanismo de eliminación del cromosoma supernumerario. Por otro lado, no se detectó en ningún caso un TC #19 en protrusiones. Dado que no se emplearon sondas para otros cromosomas no es posible descartar la presencia de otro TC en las protrusiones libres (38,6%). Sin embargo, la elevada frecuencia del TC #18 en protrusiones sugeriría una especificidad del mecanismo de eliminación para el TC #18 en exceso.

El análisis detenido de los diferentes tipos morfológicos de la mencionada secuencia de eventos (en especial T IV a T VII), reveló que los controles expuestos a DMSO mostraron solamente 25 núcleos de 2165 (1,15%) en los cuales una protrusión contenía un TC #18. Por lo tanto, los controles presentan, con mucha menor frecuencia, las mismas etapas de eliminación del TC #18 (Gráfico 2) en núcleos ovoides o a lo sumo bilobulados. Del total de protrusiones observadas ( $n = 32$ , T IV a T VII) el 78,13% ( $n = 25$ ) contiene un TC #18. Esto indicaría la existencia de un escaso nivel de pérdida de un TC #18 producido por el DMSO que se incrementaría tras la exposición a *ATRA*.

La existencia de este original proceso abre una serie de interrogantes sobre sus características y alcance.

La secuencia detectada indicaría la existencia de un mecanismo nuclear específico que lleva a la eliminación de un TC #18 en células HL60 trisómicas para este cromosoma. Esto implicaría la acción de un mecanismo de conteo cromosómico similar a lo hallado para el X de mamíferos que inicialmente corrobora la condición trisómica y luego dispara el proceso de segregación, condensación, extrusión y eliminación. De comprobarse un mecanismo tal, apoyaría fuertemente nuestra hipótesis sobre la existencia de acciones de reconocimiento y conteo con posterior eliminación del cromosoma en exceso a nivel autosómico. Con un sentido finalista, podría pensarse en un proceso que conduce a la normalización del complemento cromosómico.

### **6.3 Parámetros estereológicos y posicionales de los TC**

La medición de distancias entre los TC utilizando múltiples *ROI* reveló una mayor distancia del TC #18 extruido respecto a los restantes TC (tanto #18 como #19)

confirmando, desde el punto de vista cuantitativo, lo observado en las imágenes de microscopía confocal. Es importante destacar que ambas estrategias, ya sea tomando en cuenta los centros de masa del núcleo y *ROI* de los TC o solamente las distancias inter-TC, generaron similares resultados.

Asimismo, el TC #18 en proceso de eliminación mostró menor área y mayor grado de circularidad con respecto a los otros TC ponderados para el análisis. Estas evidencias constituyen un sólido apoyo a la existencia de un proceso de marcada compactación de dicho TC. Como se mencionó, estas características estructurales son semejantes a las que adopta el cromosoma X inactivo *via* la formación del corpúsculo de Barr y el “palillo de tambor”.

Por otro lado, quedaría por examinar si las similitudes de este proceso autosómico con el del cromosoma X también abarcan las modificaciones postraduccionales de histonas (H3K9me3, H3K27me3, hipoacetilación de H3 y H4) y metilación del ADN (asociadas al fenómeno de condensación) así como la producción de ARN específicos (*X-ist* similar) que recubran al TC incrementado su condensación y segregación.

#### **6.4 Plasticidad de la arquitectura nuclear**

La estructura de los núcleos de mamíferos es sumamente plástica como lo demuestran la organización invertida de la eucromatina y heterocromatina en los fotorreceptores de la retina en animales de hábito nocturno. Como se mencionó, este reordenamiento de la arquitectura nuclear obedecería a la necesidad de lograr un pasaje eficiente de la luz a través de las estructuras nucleares de los fotorreceptores (Solovei *et al.* 2009). Otros ejemplos lo constituyen la polilobulación que experimentan los granulocitos en forma normal o inducida por *ATRA* y los cambios numéricos y estructurales de los cromosomas que generan profundas modificaciones en el posicionamiento de los TC cromosómicos (Olins *et al.* 2001, Harewood *et al.* 2010).

En humanos, las mutaciones en el gen del receptor de lamina B (RLB) son responsables de una laminopatía autosómica dominante que ocasiona la pérdida de lobulación nuclear en granulocitos ocasionando la anomalía de Pelger-Huët (Olins *et al.* 2010, Hoffmann *et al.* 2002).

Recientemente se identificó un mecanismo de sujeción de la heterocromatina a la envoltura nuclear donde están involucrados RLB y laminas A/C.

El mencionado mecanismo de inmovilización se comporta como pinzas moleculares durante la diferenciación celular y el desarrollo. La ausencia de ambos conduciría a la reubicación de la heterocromatina periférica hacia un cromocentro central y la generación de una arquitectura nuclear invertida (Solovei *et al.* 2013). En nuestro estudio, las poblaciones de células HL60 tratadas con *ATRA* mostraron tanto en microscopía confocal como MET cromatina homogénea con un mayor grado de compactación que los controles (DMSO).

Las células HL60 (controles y tratadas) mostraron una elevada expresión de lamina B y mínima de laminas A/C como ha sido reportado por Hoffman *et al.* (2007) y Olins y Olins (2004). Las células diferenciadas presentaron una importante producción de protrusiones cuando se inmunomarcaron con anticuerpos específicos para lamina B sobre sustratos modificados (3D) (Figuras 23 y 24). Cabe señalar que los estudios en 2D en células fijadas en metanol-acético (3:1) y extendidas sobre portaobjetos a 55°C presentaron, comparativamente, un menor número de protrusiones.

Estas observaciones reflejan lo descrito por Olins y Olins (2004) en relación al aumento de la flexibilidad de la EN por la reducción del contenido de lamina A/C y aumento de la expresión de LBR. En ese sentido, observamos un notorio enriquecimiento en la marcación de lamina B nivel en los límites de las protrusiones nucleares indicando una mayor flexibilidad de la EN en esas estructuras. Finalmente, los micronúcleos formados a partir de la eliminación del TC #18 también presentan una elevada inmunomarcación para lamina B.

Con respecto a las protrusiones nucleares, Olins *et al.* (2001) y Olins y Olins (2009) han descrito estructuras semejantes denominadas *ELCS*. Cabe destacar que las protrusiones nucleares que hemos descrito mediante microscopía de fluorescencia y confocal presentan diferencias en cuanto a sus dimensiones con los *ELCS*. No obstante, los estudios con MET permitieron poner de manifiesto formaciones nucleares similares a *ELCS* tanto en células control (DMSO) como tratadas con *ATRA*.

Los *ELCS* se han observado tanto en la serie blanca normal como en células leucémicas (incluida la línea celular HL60) y en linfomas humanos. Este fenómeno también se detecta en granulocitos con trisomía de los cromosomas del grupo D o

del #21 y en células aneuploides o que portan translocaciones o inversiones. Se ha propuesto que los *ELCS* se generan por la interacción de la heterocromatina adosada a la cara interna de la membrana nuclear y las hojas interna y externa de la misma.

En este sentido, interesa destacar que las protrusiones que incorporan al TC #18 surgen de una deformación inicial de la EN en contacto con el TC condensado y probablemente heterocromático. Además, algunos *ELCS*, como hace referencia su nombre, exhiben varias capas plegadas las cuales se hallan integradas por EN y láminas de cromatina (Olins y Olins 2009). La presencia de estructuras semejantes en la periferia de las protrusiones podría explicar el incremento de la inmunomarcación de lamina B en esa localización.

## **6.5 Caracterización ultraestructural de células HL60 diferenciadas**

Se caracterizó la línea celular HL60 diferenciada a granulocitos en un estudio que abarcó tanto su estructura interna como externa (MET y MEB). Los datos fueron obtenidos empleando diversos protocolos de procesamiento de las muestras biológicas (fijación en glutaraldehído 2,5 % y glutaraldehído + tetróxido de osmio, criodeshidratación con N<sub>2</sub>, deshidratación química y SPC, inclusión en araldita y tinción con acetato de uranilo) exhibiendo los mismos resultados. Se seleccionó, por tanto, la técnica de secado de punto crítico considerando el crecimiento en suspensión de la línea celular HL60 y la rapidez y sencillez de la técnica.

La población de HL60 tratada *in vitro* con *ATRA* durante 6 días generó granulocitos típicos presentando elevada rugosidad de la membrana plasmática y mayor relación núcleo-citoplasma. Asimismo, se observaron conspicuas invaginaciones de la membrana plasmática. El examen de cultivos mediante contraste de fases mostró complejos cambios morfológicos en las células diferenciadas que podrían relacionarse con las imágenes obtenidas con MEB.

El estudio de los cortes (40-60 nm) reveló (además de las protrusiones) la presencia de dilataciones del espacio perinuclear (DEP) que en ocasiones involucra una considerable proporción del perímetro del núcleo. Estas verdaderas cisternas perinucleares son más amplias en las células tratadas con *ATRA* pero su presencia en los controles indica una generación basal de este tipo de estructuras. Las

características de su contenido (cuerpos nucleares, material amorfo o fibrilar) son de difícil interpretación sin el aporte de técnicas especiales de MET (inmunogold, etc.). Interesa destacar la relación de las DEP con los complejos de poro nuclear (Figura 27).

Las DEP detectadas por MET no han sido observadas previamente en la línea celular HL60 tanto indiferenciada como diferenciada. Sin embargo, modificaciones semejantes han sido descritas en ovocitos humanos, monos, bovinos y roedores en diferentes etapas del desarrollo (Sotelo y Porter 1959; Sotelo 1959; Baker y Franchi 1968). Los autores describen una serie de dilataciones complejas en la EN y la presencia de material confinado en el espacio perinuclear en oocitos neonatales, en la etapa de diploteno temprano. Baker y Franchi (1968) identifican dos tipos de inclusiones a nivel de las DEP: a) material de índole fibrilar y, b) cuerpos redondeados u ovals con características semejantes a la cromatina nuclear.

Las observaciones de estos autores en ovocitos de mamíferos son coincidentes con las estructuras detectadas en células HL60 control y expuestas a ATRA y denotan un grado particular de plasticidad de la EN para producir estructuras de significado desconocido hasta el presente.

## **6.6 Microdissección LASER (MDL) de núcleos de HL60 diferenciados**

Los cortes manual y automático de porciones específicas de núcleos polilobulados de granulocitos HL60 con protrusiones nucleares fueron cuantificados para registrar la cantidad mínima de material necesario para realizar una extracción de ARN total. La optimización del ancho de LASER de corte así como de la intensidad fueron pasos clave a fin de maximizar el rendimiento de las capturas finales. Se estableció en todos los casos (macro- y micromuestras y protrusiones) la cantidad mínima de material nuclear necesario para los estudios de ARN.

Las fracciones de ARN total aislado de macro- y micromuestras por MDL amplificaron una banda de 100 pb (satélite mayor). Los resultados de este ensayo fueron comparables al *gold standard* manejado en el laboratorio (IByME). Además, las amplificaciones realizadas en paralelo con ARN total extraído de cultivos de células HL60 mostraron los mismos resultados.

En suma fue posible cortar, capturar y aislar material nuclear de diferentes regiones comprobándose la funcionalidad de las fracciones de ARN total por amplificación de la secuencia del gen del satélite mayor.

---

## **CONCLUSIÓN**

Se logró demostrar la presencia en células HL60-*ATRA* de un proceso original no descrito hasta el presente que implica la eliminación, al parecer específica, de un cromosoma en condición trisómica inducida por *ATRA* en una línea celular humana. El proceso de diferenciación granulocítica sería clave para modificar las características morfológicas del núcleo y la generación de protrusiones *via* la remodelación de la EN por cambios en la composición en laminas promoviendo una mayor plasticidad y flexibilidad de la misma. La presencia de un reducido número de núcleos control (DMSO) que exhiben el mismo proceso de eliminación de un TC #18 sugiere que el mismo opera a nivel basal en células indiferenciadas. Los estudios por MET y MEB mostraron complejas estructuras (protrusiones y DEP) que corroboran la elevada plasticidad tanto del núcleo como de la EN.

---

## 7. PERSPECTIVAS

- a) Estudiar mediante FISH en poblaciones tratadas con *ATRA* durante 12-15 días para verificar si el proceso de eliminación alcanza un mayor grado de expresión con un alto porcentaje de células con eusomía del #18.
- b) Desarrollar técnicas de inmunoFISH (3D) en células HL60 diferenciadas adheridas a sustratos modificados (*Bond Adhesion Slides*) con el fin de analizar posibles modificaciones de histonas en el TC #18 en vías de eliminación (histona macroH2A, H3K27me3, H3K9me3, hipoacetilación de histonas).
- c) La implementación de la técnica de MDL para la captura de protrusiones nucleares permitirán avanzar en el conocimiento del contenido de dichas estructuras sobretodo en relación a la presencia de ARN específicos de tipo *Xist*.
- d) Profundizar el estudio de las modificaciones que ocurren a nivel de la membrana nuclear, la cromatina y componentes del citoesqueleto durante la formación de las protrusiones (T III y T IV) y eliminación del TC #18 mediante MC y MET.

---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Adamson PC (1996) Trans-retinoic acid pharmacology and its impact on the treatment of acute promyelocytic leukemia. *The Oncologist* 1:305-314
- Akhtar A, Gasser SM (2007) The nuclear envelope and transcriptional control. *Nat Rev Genet* 8: 507-517
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York
- Albiez H, Cremer M, Tiberi C, Vecchio L, Schermelleh L, Dittrich S (2006) Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome Res* 14: 707–733
- Avner y Heard (2001) X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nature Rev Genet* 2: 59-67
- Baker TG, Franchi LL (1969) The origin of cytoplasmic inclusions from the nuclear envelope of mammalian oocytes. *Z Zellforsch* 93: 45-55
- Barr ML, Bertram EG (1949) A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 163: 676-677
- Bártová E, Krejčí J, Harnicarova A, Galiova G, Kozubek S (2008) Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J. Histochem. Cytochem.* 56: 711–721
- Berezney R, Dubey DD, Huberman JA (2000) Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma* 108: 471-484
- Berezney R, Malyavantham KS, Pliss A, Bhattacharya S, Acharya R (2005) Spatiotemporal dynamics of genomic organization and function in the mammalian cell nucleus. *Adv Enzyme Regul* 45:17-26
- Berr A, Pecinka A, Meister A, Kreth G, Fuchs J, Blattner FR, Lysak MA, Schubert I (2006) Chromosome arrangement and nuclear architecture but not centromeric sequences are conserved between *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata*. *Plant J* 48: 771-783

- Blomhoff R, Blomhoff HK (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66(7): 606-630
- Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, Muller S, Eils R, Cremer C, Speicher MR, Cremer T (2005) Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 3: 826-842
- Branco MR, Pombo A (2006) Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol*, 4: e138
- Branco MR, Pombo A (2007) Chromosome organization: New facts, new models. *Trends Cell Biol* 17: 127-134
- Breitman TR, Selonick SE, Collins SJ (1980) Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci* 77: 2936-2940
- Brown SD (1991) XIST and the mapping of the X chromosome inactivation centre. *Bioessays* 13: 607-612
- Capodici P, Donovan M, Buchinsky H, Jeffers Y, Cordon-Cardo C, Gerald W (2005) Gene expression profiling in single cells within tissue. *Nat Methods* 2: 663-665
- Chagin VO, Stear JH, Cardoso MC (2010) Organization of DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a000737
- Chambon PA (1996) Decade of molecular biology of retinoid receptors. *FASEB J* 10: 940-954
- Changolkar LN, Pehrson JR (2002) Reconstitution of nucleosomes with histone macroH2A1.2. *Biochemistry* 41: 179-184
- Cho SR, Park SJ, Kim HJ, Park IJ, Choi JR, Jung HJ, Park JE (2011) Acute promyelocytic leukemia with complex translocation t(5;17;15)(q35;q21;q22): case report and review of the literature. *Pediatr Hematol Oncol*. 33:e326-9. doi: 10.1097/MPH.0b013e31820998de
- Chow J, Heard E (2009) X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Curr Opin Cell Biol* 21: 359-366

- Chubb JR, Bickmore WA (2003) Considering nuclear compartmentalization in the light of nuclear dynamics. *Cell* 112: 403-406
- Costanzi C, Pehrson JR (1998) Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* 393: 599-601
- Cremer M, Gasser F, et al. (2008) Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes. En: *The Nucleus, Vol. 1: Nuclei and Subnuclear Components*. R. Hancock (Ed.). Humana Press, pp 205-239
- Cremer T, Cremer C (2001) Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2: 292-301
- Cremer T, Cremer M (2010) Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003889 doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A003889
- Cremer T, Kreth G, Koester H, Fink RH, Heintzmann R, Cremer M (2000) Chromosome territories, interchromatin domain compartment, and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*10: 179–212
- Cremer M, Küpper K, Wagler B, Wizelman L, von Hase J, Weiland Y, Kreja L, Diebold J, Speicher MR, Cremer T (2003) Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* 5: 809-820
- Cremer T, Kurz A, Zirbel R, Dietzel S, Rinke B, Schrock E, Speicher MR, Mathieu U, Jauch A, Emmerich P, Scherthan H, Ried T, Cremer C, Lichter P (1993) Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58: 777-792
- Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol* 145: 1119-1131
- Dimitri P, Caizzi R, Giordano E, Accardo MC, Lattanzi G, Biamonti G (2009) Constitutive heterochromatin: a surprising variety of expressed sequences. *Chromosoma* 118: 419-435

- Doyen CM, An W, Angelov D, Bondarenko V, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Roeder RG, Bouvet P, Dimitrov S (2006) Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol Cell Biol* 26: 1156-1164
- Dreesen O, Ong PF, Chojnowski A, Colman A (2013) The contrasting roles of lamin B1 in cellular aging and human disease. *Nucleus* 4: 283-290 Landes Bioscience
- Fakan S, van Driel R (2007) The perichromatin region: a functional compartment in the nucleus that determines large-scale chromatin folding. *Semin Cell Dev Biol* 18: 676-681
- Fedorova E, Zink D (2008) Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta* 1783: 2174-2184
- Folle GA (2008) Nuclear architecture, chromosome domains and genetic damage. *Rev Mutat Res* 658: 172-183
- Foster HA, Bridger JM (2005) The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. *Chromosoma* 114: 212-229
- Fraser P, Bickmore W (2007) Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447: 413-417
- Frolik CA, Tavela TE, Peck GL, Sporn MB (1978) High-pressure liquid chromatographic determination of 13-cis-retinoic acid and all-trans-retinoic acid in human plasma. *Anal Biochem* 86: 743-750
- Gallagher R, Collins S, Trujillo J (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54: 713-733
- Gernand D, Rutten T, Pickering R, Houben A (2006) Elimination of chromosomes in *Hordeum vulgare* x *H. bulbosum* crosses at mitosis and interphase involves micronucleus formation and progressive heterochromatinization. *Cytogenet Genome Res* 114(2): 169-74
- Gilbert N, Boyle S, Fiegler H, Woodfine K, Carter NP, Bickmore WA (2004) Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118: 555-566
- Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG (1997) Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol* 9: 222-232

- Grandy I, Hardt T, Schmid M, Haaf T (2002) Effects of higher-order nuclear structure and Rad51 overexpression on radiation-induced chromosome rearrangements. *Cytogenet Genome Res* 98(4): 265-269
- Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL (2005) The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1): 21-31
- Guttenbach M, Koschorz B, Bernthaler U, Grimm T, Schmid M (1995) Sex chromosome loss and aging: *in situ* hybridization studies on human interphase nuclei. *Am J Hum Genet* 57: 1143-1150
- Habermann FA, Cremer M, Walter J, Kreth G, von Hase J, Bauer K, Wiemberg J, Cremer C, Cremer T, Solovei I (2001) Arrangements of macro- and micro-chromosomes in chicken cells. *Chromosome Res* 9: 569-584
- Harewood L, Schütz F, Boyle S (2010) The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression. *Genome Res* 20(5): 554-564
- Heard E (2004) Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol* 16: 247-255
- Heride C, Ricoul M, Kiêu K, von Hase J, Guillemot V, Cremer C, Dubrana K, Sabatier L (2010) Distance between homologous chromosomes results from chromosome positioning constraints. *J Cell Sci* 123: 4063-4075
- Hernández-Muñoz I, Lund AH, van der Stoop P, Boutsma E, Muijters I, Verhoeven E, Nusinow DA, Panning B, Marahrens Y, van Lohuizen M (2005) Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7635-7640
- Holmquist GP, Ashley T (2006) Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Research (Review)* 114: 96-125
- Hummel JL, Wells RA, Dube ID, Licht JD, Kamel-Reid S (1999) Deregulation of NPM and PLZF in a variant t(5;17) case of acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 18: 633-641
- Iborra FJ, Jackson DA, Cook PR (2001) Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* 293: 1139-1142

- Jackson DA, Pombo A (1998) Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. *J Cell Biol* 140: 1285-1295
- Jeppesen P, Turner BM (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 74: 281-289
- Ji P, Murata-Hori M, Lodish HF (2011) Formation of mammalian erythrocytes: Chromatin condensation and enucleation. *Trends Cell Biol* 21(7): 409-415
- Jonkers I, Monkhorst K, Rentmeester E, Grootegoed JA, Grosveld F, Gribnau J (2008) Xist RNA is confined to the nuclear territory of the silenced X chromosome throughout the cell cycle. *Mol Cell Biol* 28: 5583-5594
- Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM (1992) Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature (Lond)* 358: 771-774
- Kosak ST, Groudine M (2004) Form follows function: the genomic organization of cellular differentiation. *Genes Dev* 18: 1371-1384
- Küpper K, Kölbl A, Biener D, Dittrich S, von Hase J, Thormeyer T, Fiegler H, Carter NP, Speicher MR, Cremer T, Cremer M (2007) Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma* 116: 285-306
- Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshatri H, Saunders M, Zacharewski T, Chen J Y, Staub A, Garnier JM, Mader S (1992) Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68: 377-395
- Leitch AR (2000) Higher levels of organization in the interphase nucleus of cycling and differentiated cells. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(1): 138-152
- Leonhardt H, Rahn HP, Weinzierl P, Sporbert A, Cremer T, Zink D, Cardoso MC. (2000) Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J Cell Biol* 149: 271-280

- Liang JC, Ning Y, Wang R, Padilla-Nash HM, Schröck E, Soenksen D, Nagarajan L, Ried T (1999) Spectral karyotypic study of the HL-60 cell line: detection of complex rearrangements involving chromosomes 5, 7, and 16 and delineation of critical region of deletion on 5q31.1. *Cancer Genet Cytogenet* 113: 105-109
- Lomvardas S, Barnea G, Pisapia DJ, Mendelsohn M, Kirkland J, Axel R (2006) Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell* 126(2): 403-413
- Lyon MF (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190: 372-373
- Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM (1994) The retinoid receptors. En: *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (Eds.), Raven, New York (2nd edition), pp 319-349
- Maraldi NM, Squarzoni S, Sabatelli P, Capanni C, Mattioli E, Ognibene A, Lattanzi G (2005) Laminopathies: involvement of structural nuclear proteins in the pathogenesis of an increasing number of human diseases. *J Cell Physiol* 203: 319-327
- Marks H, Chow JC, Denissov S, Francoijs KJ, Brockdorff N, Heard E, Stunnenberg HG (2009) High-resolution analysis of epigenetic changes associated with X inactivation. *Genome Res* 19: 1361-1373
- Melnick A, Licht JD (1999) Deconstructing a Disease: RAR $\alpha$ , Its Fusion Partners, and Their Roles in the Pathogenesis of Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood* 93: 3167-3215
- Masui O, Heard E (2006) RNA and Protein Actors in X-Chromosome Inactivation *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 419-428
- McConnell MJ, Lindberg MR, Brennand KJ, Piper JC, Voet T, Cowing-Zitron C, Shumilina S, Lasken RS, Vermeesch JR, Hall IM, F. H. Gage FH (2013) Mosaic Copy Number Variation in Human Neurons. *Science* 342 (6158): 632-637
- McKenna T, Baek J-H, Eriksson M (2013) Laminopathies. InTech Chapter 2 p27-63 (libro)
- Misteli T, Soutoglou E (2009) The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 243-254

- Napoli JL (1993) Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis. *J Nutr.* 123: 362-366
- Olins AL, Herrmann H, Lichter P, Kratzmeier M, Doenecke D, Olins DE (2001) Nuclear envelope and chromatin compositional differences comparing undifferentiated and retinoic acid- and phorbol ester-treated HL-60 cells. *Exp Cell Res* 268: 115-127 doi:10.1006/excr.2001.5269
- Olins AL, Olins DE (2004) Cytoskeletal influence on nuclear shape in granulocytic HL-60 cells. *BMC Cell Biol* 5: 30-47
- Olins DE, Olins AL (2009) Nuclear envelope-limited chromatin sheets (ELCS) and heterochromatin higher order structure. *Chromosoma* 118: 537-548
- Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W, Fraser P (2004) Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet* 36: 1065-1071
- Palis J (2012) Losing a "nucleus" to gain a cytoplasm. *Blood* 19: 5948-5949
- Pecinka A, Schubert V, Meister A, Kreth G, Klatte M, Lysak MA (2004) Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of *Arabidopsis thaliana* are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma*. 113: 258-269
- Pickersgill H, Kalverda B, de Wit E, Talhout W, Fornerod M, van Steensel B (2006) Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nat Genet* 38: 1005-1014
- Plath K, Talbot D, Hamer KM, Otte AP, Yang TP, Jaenisch R, Panning B (2004) Developmentally regulated alterations in Polycomb repressive complex 1 proteins on the inactive X chromosome. *J Cell Biol* 167: 1025-1035
- Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, de la Cruz CC, Otte AP, Panning B, Zhang Y (2003) Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 300: 131-135
- Pollock SL, Rush EA, Redner RL (2013) NPM-RAR, not the RAR-NPM reciprocal t(5;17)(q35;q21) acute promyelocytic leukemia fusion protein, inhibits myeloid differentiation. *Leuk Lymphoma* (doi: 10.3109/10428194.2013.830303)

- Rajapakse I, Groudine M (2011) On emerging nuclear order. *J Cell Biol* 192(5): 711-721
- Ross CA (2003) Retinoid production and catabolism: Role of Diet in regulation retinol esterification and retinoic acid oxidation. *J Nutrition* 133: 291-296
- Ross T, Jugert FK, Merck HF, Bickers DR (1998) Retinoid metabolism in the skin. *Pharmacol Rev* 50: 315-333
- Rouquette J, Cremer C, Cremer T, Fakan S (2010) Functional nuclear architecture studied by microscopy: present and future. *Int Rev Cell Mol Biol* 282: 1-90
- Rush EA, Pollock SL, Abecassis I, Redner RL (2013) Interaction with RXR is necessary for NPM-RAR-induced myeloid differentiation blockade. *Leuk Res* 37:1704-10. doi: 10.1016/j.leukres.2013.09.024
- Sartore RC, Campos PB, Trujillo CA, Ramalho BL, Negraes PD, et al. (2011) Retinoic acid-treated pluripotent stem cells undergoing neurogenesis present increased aneuploidy and micronuclei formation. *PLoS One* 6(6): e20667. doi:10.1371/journal.pone.0020667
- Schneider R, Grosschedl R (2007) Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev* 21: 3027-3043
- Schübeler D, Scalzo D, Kooperberg C, van Steensel B, Delrow J, Groudine M (2002) Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nat Genet* 32: 438–442
- Shaw, PJ, Abranches R, Paula Santos A, Beven AF, Stoger E, Wegel E, González-Melendi P (2002) The architecture of interphase chromosomes and nucleolar transcription sites in plants. *J Struct Biol* 140: 31-38
- Shimi T, Pfliegerhaer K, Kojima S, Pack CG, Solovei I, Goldman AE (2008) The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev* 22: 3409-3421
- Shopland LS, Lynch CR, Peterson KA, Thornton K, Kepper N, Hase J, Stein S, Vincent S, Molloy KR, Kreth G, Cremer C, Bult CJ, O'Brien TP (2006) Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence. *J Cell Biol* 174: 27-38

- Shiple J, Weber-Hall S, Birdsall S (1996) Loss of the chromosomal region 5q11-q31 in the myeloid cell line HL-60: characterization by comparative genomic hybridization and fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 15:182-6
- Silva J, Mak W, Zvetkova I, Appanah R, Nesterova TB, Webster Z, Peters AH, Jenuwein T, Otte AP, Brockdorff N (2003) Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev Cell* 4: 481-495
- Solovei I, Cavallo A, Schermelleh L, Jaunin F, Scasselati C, Cmarko D, Cremer C, Fakan S, Cremer T (2002) Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence *in situ* hybridization (3D-FISH). *Exp Cell Res* 276: 10-23
- Solovei I, Kreysing M, Lanctot C, Kosem S, Peichl L, Cremer T, Guck J, Joffe B (2009) Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137: 356-368
- Sotelo JR (1959) An electron microscope study of the cytoplasmic and nuclear components of rat primary oocytes. *Z Zellforsch Mikros Anat* 50: 749-765
- Sotelo JR, Porter KR (1959) An electron microscope study of the rat ovum. *J Biophys Biochem Cytol* 5: 327- 341 (Plates 136 to 145)
- Spector DL (2003) The dynamics of chromosome organization and gene regulation. *Annu Rev. Biochem.* 72: 573-608
- Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA (2005) Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435: 637-645
- Taddei A (2007) Active genes at the nuclear pore complex. *Curr Opin Cell Biol* 19: 305-310
- Tanabe H, Habermann FA, Solovei I, Cremer M, Cremer T (2002) Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res* 504: 37-45
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponde BA, Tunnacliffe A (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718-725

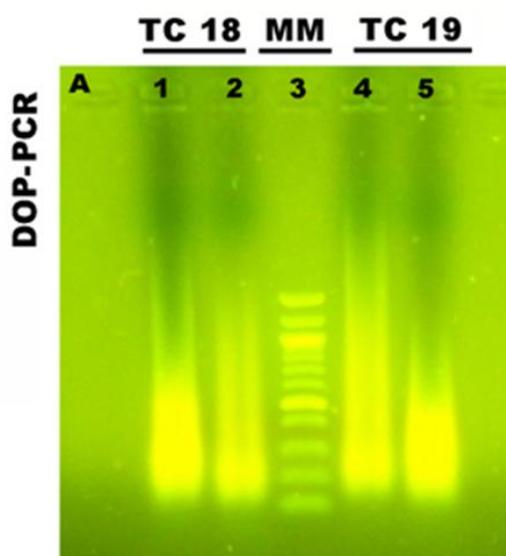
- Verschure PJ, van der Kraan I, Manders EM, van Driel R (1999) Spatial relationships between transcription sites and chromosome territories. *J Cell Biol* 147: 13-24
- Visser AE, Aten JA (1999) Chromosomes as well as chromosomal subdomains constitute distinct units in interphase nuclei. *J Cell Sci* 112: 3353-3360
- Woodfine K, Fiegler H, Beare DM, Collins JE, McCann OT, Young BD, Debernardi S, Mott R, Dunham I, Carter NP (2004) Replication timing of the human genome. *Hum Mol Genet* 13: 191-202
- Yurov YB, Iourov IY, Liehr T, Kolotii AD, Kutsev SI, Pellestor F, Beresheva AK, Demidova IA, Kravets VS, Monakhov VV, Soloviev IV (2007) Aneuploidy and confined chromosomal mosaicism in the developing human brain. *PloS One* 2(6): e558. doi:10.1371/journal.pone.0000558
- Yurov YB, Vorsanova SG, Iourov IY (2013) Introduction to interphase molecular cytogenetics. En: *Human interphase chromosomes: Biomedical aspects*. Yurov YB, Vorsanova SG, Iourov IY (Eds.), Springer New York, pp 1-8
- Zhang XK, Hoffmann B, Tran PB, Graupner G, Pfahl M (1992) Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* 355: 441-446
- Zhang JW, Wang JY, Chen SJ, Chen Z (2000) Mechanisms of all-trans retinoic acid induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells. *J Biosci*. 2000: 275-84

---

## ANEXO

### *Generación de sondas WCP para TC #18 y #19*

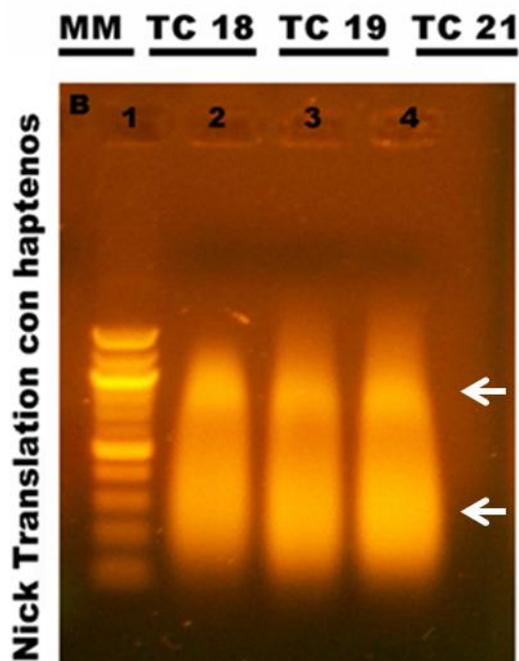
Para la obtención de las sondas se partió de una muestra de 500 cromosomas clasificados por citometría de flujo procediendo a su amplificación mediante la técnica DOP-PCR. La electroforesis en gel de agarosa mostró un conjunto de fragmentos de ADN cuyo tamaño oscilaba entre 150-800 pb (carriles 1 y 5) así como fragmentos de mayor tamaño (carriles 2 y 4) (Figura 15, panel A). Se logró una buena calidad de ADN amplificado para los diferentes cromosomas (#18, #19 entre otros) obteniéndose los fragmentos esperados dentro de los rangos adecuados para la generación de las sondas WCP. La concentración de ADN fue de 2500 ng/μL.



**Figura 15.-** Electroforesis en gel de agarosa (1%, Goodview) para analizar la amplificación del ADN por DOP-PCR para la obtención de sondas *WCP* de los cromosomas #18 (carriles 1 y 2) y #19 (carriles 4 y 5) con el primer universal 6MW. El carril 3 corresponde al marcador de peso molecular (MM) con fragmentos entre 100 a 1517 pb.

### *Marcación del ADN por Nick Translation (NT)*

Los tamaños de las sondas obtenidas por *NT* estuvieron comprendidas en el rango de 150-1200 pb (Figura 16, carriles 2, 3 y 4). En el *smear* se destacan dos regiones de mayor intensidad para las tres sondas (flechas).



**Figura 16.-** Gel donde se observan los tamaños finales de la colección de sondas WCP marcadas con haptenos por *NT* para los TCs #18, #19 y #21. Carriles: 2-4 sondas. Carril 1: marcador de peso molecular (MM) 100 a 1517 pb (gel de agarosa 1% teñido con BrEt).