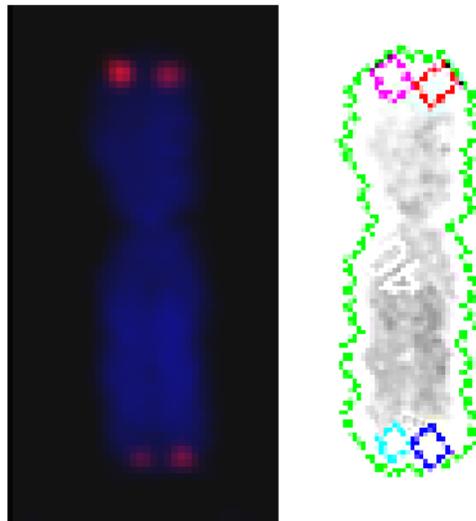


**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)**

**Área Biología – Subárea Genética**

**TESIS DE MAESTRIA**

**“Asimetría entre telómeros hermanos en cromosomas metafásicos con FISH telomérico: análisis de su patrón de distribución en ambos brazos cromosómicos.”**



**Lic. Federico Santiñaque**

**Departamento de Genética y  
Servicio de Citometría de Flujo y Clasificación Celular**



**Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)**

**Orientador: Dr. Gustavo Folle**

**Tribunal: Dra. Yanina Panzera  
Dr. Ruben Pérez  
Dra. Ana Ramón**

## **AGRADECIMENTOS**

*-A Máximo Drets, por haberme permitido empezar a investigar en los telómeros y por sus valiosos consejos en todos estos años.*

*-A mi orientador, el Dr. Gustavo Folle, por aceptar la realización de este tema de Tesis y por su paciencia por toda la demora que tuve en finalizar esta etapa.*

*-Al Tribunal de Tesis, por el tiempo dedicado a la corrección de este trabajo y por sus interesantes comentarios*

*-A compañeros del Depto de Biología Molecular y Depto de Genética del IIBCE por darme ánimo para terminar esta Tesis, en particular a Rosana Rodríguez-Casuriaga.*

*-A Marion Cremer por su gentil colaboración con sondas teloméricas ADN para una parte de este proyecto.*

*-A mi hermana, Lic. en Estadística Florencia Santiñaque, por su ayuda con el análisis de los datos y construcción de tabla Excel con comandos lógicos.*

*-A mi cuñada, Lic. en Enfermería Liliana Wynants, por ser la encargada de la extracción de muestras de sangre periférica.*

*-A las personas que aceptaron participar gentilmente en este proyecto donando una pequeña muestra de sangre periférica para el cultivo de linfocitos y posterior FISH telomérico.*

*-A la Ing. Agr. Beatriz López-Carro, por su colaboración en la preparación de algunas soluciones y ayuda en el mantenimiento general del laboratorio.*

*-Al Dr. Wilner Martínez por permitirme usar el Microscopio de Fluorescencia de su laboratorio.*

*-Al Programa de apoyo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), por admitir el desarrollo de esta Maestría y exigirme su correcta finalización.*

*-A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), por la financiación parcial de este proyecto a través de una Beca de Maestría (BE\_POS\_2010\_2309).*

## **AGRADECIMIENTOS ESPECIALES**

*-A Paola Wynants (mi esposa y futura madre de mi hija), por todo el “infinito afecto y apoyo” en las buenas y en las malas. Además por su enorme ayuda en la “edición” de las cosas que escribo.*

*-A mi madre Gloria Mesones y mi hermana Verónica Santiñaque, por su constante apoyo emocional y gran sentido del humor, que me ayudaron a finalizar de buena manera esta etapa.*

*-Finalmente, a todos los que me ayudaron a afrontar un complicado momento personal dándome ánimo y energía para seguir adelante.*

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	i
RESUMEN .....	iii
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b><i>I.1. Componentes estructurales del telómero y la región subtelomérica .....</i></b>	<b><i>2</i></b>
<b><i>I.1.1. ADN telomérico .....</i></b>	<b><i>2</i></b>
<b><i>I.1.2. ADN subtelomérico .....</i></b>	<b><i>4</i></b>
<b><i>I.1.2.1. Región subtelomérica: sitio de aberraciones cromosómicas crípticas asociadas a retardo mental y malformaciones congénitas .....</i></b>	<b><i>4</i></b>
<b><i>I.1.3. Proteínas teloméricas .....</i></b>	<b><i>5</i></b>
<b><i>I.2. Importancia de la longitud del ADN telomérico .....</i></b>	<b><i>8</i></b>
<b><i>I.2.1. Métodos para estimar la longitud del ADN telomérico .....</i></b>	<b><i>9</i></b>
<b><i>I.2.1.1. Southern Blot telomérico .....</i></b>	<b><i>9</i></b>
<b><i>I.2.1.2. STELA .....</i></b>	<b><i>10</i></b>
<b><i>I.2.1.3. Q-PCR telomérico .....</i></b>	<b><i>11</i></b>
<b><i>I.2.1.4. Tel-Flow FISH .....</i></b>	<b><i>11</i></b>
<b><i>I.2.1.5. Q-FISH telomérico .....</i></b>	<b><i>12</i></b>
<b><i>I.3. FISH telomérico: asimetría entre cromátidas hermanas .....</i></b>	<b><i>12</i></b>
<b><i>I.4. Bando T: asimetría entre cromátidas hermanas .....</i></b>	<b><i>14</i></b>
<b><i>I.4.1. La asimetría entre telómeros hermanos evidenciada con bando T se distribuye de manera no aleatoria en ambos brazos cromosómicos .....</i></b>	<b><i>18</i></b>
<b><i>I.5. Telómeros en las etapas S y G2 del ciclo celular .....</i></b>	<b><i>21</i></b>
<b><i>I.6. Comentario final .....</i></b>	<b><i>22</i></b>
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b><i>II.1. Objetivo general .....</i></b>	<b><i>23</i></b>
<b><i>II.2. Objetivos específicos .....</i></b>	<b><i>23</i></b>

<b>III.</b>	<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO .....</b>	<b>23</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>IV.1.</b>	<i>Cultivos de líneas celulares humanas .....</i>	<i>25</i>
<b>IV.2.</b>	<i>Extracción de muestras de sangre periférica humana .....</i>	<i>25</i>
<b>IV.3.</b>	<i>Cultivos de linfocitos humanos .....</i>	<i>25</i>
<b>IV.4.</b>	<i>Obtención de extendidos cromosómicos para FISH .....</i>	<i>25</i>
<b>IV.5.</b>	<i>FISH telomérico (Kit DAKO) .....</i>	<i>26</i>
<b>IV.6.</b>	<i>Citocentrifugación e inmunomarcación con anticuerpo anti-TRF2 en células HeLa.</i>	<i>27</i>
<b>IV.7.</b>	<i>Q-FISH telomérico .....</i>	<i>27</i>
<b>IV.8.</b>	<i>Adquisición de imágenes microscópicas con cámara CCD de alta resolución .....</i>	<i>28</i>
<b>IV.9.</b>	<i>Análisis de imágenes de FISH telomérico (Kit DAKO) y de inmunomarcación con anticuerpo anti-TRF2 .....</i>	<i>28</i>
<b>IV.10.</b>	<i>Análisis de Q-FISH telomérico utilizando el programa TFL-Telo .....</i>	<i>29</i>
<b>IV.11.</b>	<i>Análisis estadístico de las proporciones de las configuraciones TRANS y CIS detectadas con FISH telomérico e inmunomarcación de TRF2 .....</i>	<i>30</i>
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>32</b>
<b>V.1.</b>	<i>Estudio del patrón de distribución de la asimetría telomérica en ambos brazos de cromosomas HeLa y HL60 con FISH telomérico .....</i>	<i>32</i>
<b>V.2.</b>	<i>Detección de asimetría entre telómeros hermanos mediante inmunomarcación con anticuerpo anti-TRF2 en cromosomas de la línea celular HeLa .....</i>	<i>37</i>
<b>V.3.</b>	<i>Análisis mediante programa TFL-Telo del patrón de distribución de la asimetría telomérica en ambos brazos de cromosomas de linfocitos humanos con Q-FISH telomérico .....</i>	<i>38</i>
<b>V.4.</b>	<i>Detección mediante FISH telomérico de un caso de “mega-telómero” en un cromosoma del grupo D .....</i>	<i>51</i>
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>VI.1.</b>	<i>Detección de una distribución no aleatoria de la asimetría telomérica en los brazos p y q de cromosomas de las líneas celulares HeLa, HL60 y de linfocitos humanos con FISH telomérico, evidenciando una clara tendencia a la configuración TRANS .....</i>	<i>54</i>

<b>VI.2.</b>	<b><i>Importancia y cuestionamientos del Q-FISH telomérico sobre cromosomas metafásicos: alta sensibilidad vs alta variabilidad entre cromátidas hermanas</i></b> .....	56
<b>VI.3.</b>	<b><i>Asimetrías entre telómeros hermanos con Q-FISH telomérico: hipótesis reportadas en la bibliografía especializada para explicar el alto nivel de variabilidad detectada con dicha técnica</i></b> .....	58
<b>VI.4.</b>	<b><i>Particularidades citológicas de la compleja región cromosómica terminal</i></b> .....	63
<b>VI.5.</b>	<b><i>Asimetría entre telómeros hermanos detectada con Q-FISH telomérico: ¿únicamente artefactos metodológicos o evidencias de un fenómeno normal y específico de la región cromosómica terminal?</i></b> .....	65
<b>VI.6.</b>	<b><i>Modelo teórico sobre el origen de la asimetría telomérica observada con FISH telomérico y Bando T: posible relación entre la frecuente detección de una configuración TRANS con un particular modo de replicación y compactación de la compleja cromatina de la región cromosómica terminal.</i></b> .....	73
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS</b> .....	78
<b>VIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	80

## ABREVIATURAS

A	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATM	proteína “ <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i> ”
BLM	proteína del síndrome de Bloom
BrdUrd	5-bromodeoxiuridina
CHO	Chinese hamster ovary cells
C	citosina
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
°C	grados Celsius
DNA-PK	Proteína quinasa dependiente de ADN
DNA-PKcs	Subunidad catálitica de la proteína DNA-PK
FISH	Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
G	guanina
G1	etapa del ciclo celular “ <i>Gap 1</i> ”
G2	etapa del ciclo celular “ <i>Gap 2</i> ”
h	hora/s
H3K9me3	histona H3 con lisina 9 trimetilada
HP1	proteína “ <i>Heterochromatin Protein 1</i> ”
hRAP 1	proteína telomérica “ <i>human Repressor Activator Protein 1</i> ”
Kb	kilobases
M	etapa del ciclo celular “ <i>Mitosis</i> ”
Mb	megabases
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
NHEJ	unión de extremos no homólogos
pb	pares de bases
PCR	técnica <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNA	sonda para FISH “ <i>Peptide Nucleic Acid</i> ”

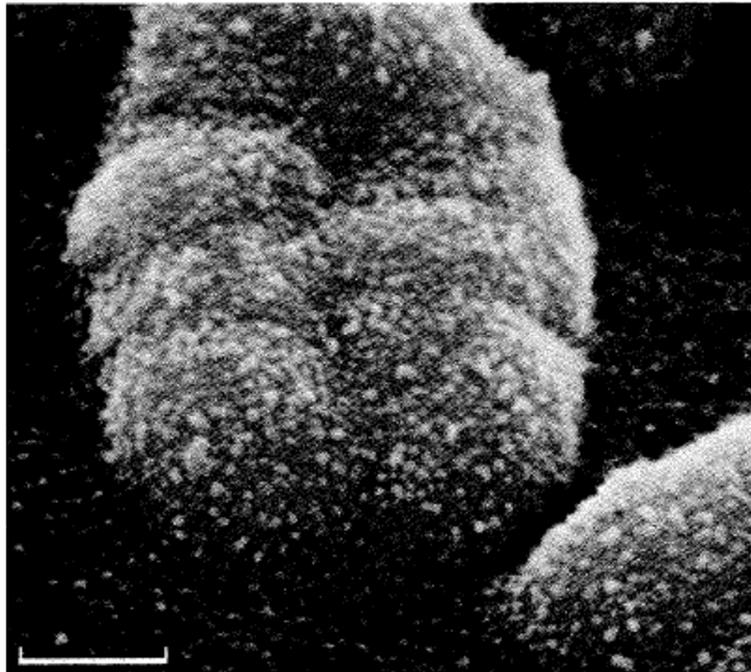
POT1	proteína telomérica “ <i>Protection Of Telomeres 1</i> ”
Rap 1	proteína “ <i>Ras-proximate-1</i> ”
rpm	revoluciones por minuto
S	etapa del ciclo celular “ <i>Synthesis</i> ”
seg	segundos
SINEs	<i>Short Interspersed Elements</i>
STELA	técnica <i>Single TElomere Length Analysis</i>
T	timina
TANK 1	proteína telomérica “ <i>Tankyrase 1</i> ”
TANK 2	proteína telomérica “ <i>Tankyrase 2</i> ”
TERT	subunidad catalítica de la transcriptasa reversa Telomerasa
TERC	ARN de la telomerasa
TIN2	proteína telomérica “ <i>TRF 1/2 Interacting Nuclear Protein 2</i> ”
TERRA	ARN telomérico “ <i>Telomeric Repeat-containing RNA</i> ”
TPP 1	proteína “ <i>Tripeptidyl-peptidase 1</i> ”
TRF	técnica <i>Telomere Restriction Fragment</i>
TRF1	proteína telomérica “ <i>Telomeric Repeat-binding Factor 1</i> ”
TRF2	proteína telomérica “ <i>Telomeric Repeat-binding Factor 2</i> ”
µg	microgramos
µL	microlitros
µm	micrómetros
UV	luz <i>Ultra Violeta</i>
WRN	helicasa dependiente de ATP del síndrome de Werner

## RESUMEN

Varios autores demostraron la frecuente aparición de diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia entre telómeros hermanos (asimetrías) al emplear una de las metodologías más usadas para la medición del tamaño telomérico, el Q-FISH, pero confirmando la validez del método para estimar la longitud telomérica al analizar un alto número de cromosomas. Por otra parte, investigaciones desarrolladas en nuestro país revelaron que frecuentemente la cromatina sub/telomérica de alta densidad detectada mediante análisis microdensitométrico en cromosomas con bandeo T, presenta una distribución asimétrica entre cromátidas hermanas, y en casos de cromosomas con asimetría en ambos brazos, las áreas de mayor densidad de cada uno se localizan preferencialmente en cromátidas opuestas (TRANS). Se desconoce la causa de la asimetría entre telómeros hermanos detectada con ambas técnicas, que curiosamente emplean temperaturas de desnaturalización bastante similares. El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar la asimetría detectada entre telómeros hermanos en cromosomas metafásicos humanos, mediante un detallado análisis de las señales de FISH telomérico y realización de inmunomarcación de la proteína telomérica TRF2, a fin de evaluar si dicho fenómeno es aleatorio o presenta algún patrón específico de distribución al considerar cromosomas con asimetría en ambos brazos. Los datos obtenidos a partir del análisis de FISH telomérico de cromosomas HeLa y HL60, así como los de inmunomarcación de TRF2 en cromosomas HeLa, mostraron que existe una tendencia estadísticamente significativa a que las mayores señales de cada brazo cromosómico se localicen en cromátidas opuestas (TRANS). Por otra parte, mediante un detallado análisis de Q-FISH telomérico con un programa especializado (TFL-Telo) en cromosomas de linfocitos humanos, se pudo cuantificar el alto nivel de asimetría detectado y su tendencia estadísticamente significativa a evidenciar una configuración TRANS (59%) al considerar la localización de las mayores intensidades teloméricas en cromosomas con asimetría en ambos brazos. Estos resultados sugieren que no toda la variabilidad detectada con FISH telomérico entre cromátidas hermanas en metafase se debe a artefactos metodológicos como algunos autores plantean. Se discute el posible origen de la asimetría detectada en mitosis con FISH telomérico y bandeo T, planteándose un modelo teórico que propone que la frecuente detección de cromosomas con una configuración TRANS podría estar evidenciando un particular modo de replicación y compactación de la compleja cromatina de la región cromosómica terminal.

## I. INTRODUCCIÓN

La región terminal de los cromosomas eucariotas posee una estructura cromatínica especializada que confiere protección al cromosoma a lo largo del ciclo celular (Blackburn, 2001; Zakian, 2012). Estos complejos núcleo-proteicos esenciales, llamados telómeros, no solo previenen la fusión extremo-a-extremo y la degradación nucleotídica de los cromosomas (Müller, 1938; McClintock, 1942), sino que también están involucrados en el establecimiento de la arquitectura nuclear (Gilson y cols., 1993; Nagele y cols., 2001; Chuang y cols., 2004), en la mediación de interacciones con cromosomas homólogos y no homólogos (Dernburg y cols., 1995), en la regulación de la expresión de genes adyacentes (Baur y cols., 2001) y están muy relacionados con los fenómenos de senescencia celular y cáncer (Blasco, 2005). Además, en el segmento subtelomérico se encuentra la mayor riqueza génica y la mayor tasa de recombinación de todo el genoma humano (Saccone y cols., 1992; Conforth y Eberle, 2001). Las investigaciones sobre la región subtelomérica han aumentado significativamente, debido a que es el sitio de numerosas aberraciones crípticas asociadas a retardo mental y malformaciones congénitas (Fan y cols., 2001; Baker y cols., 2002; Bocian y cols., 2004). Por otra parte, estudios citológicos han mostrado que la región cromosómica terminal posee propiedades muy peculiares, lo que demuestra su gran complejidad estructural (Drets, 2004) (Fig. 1).



**Figura 1.-** Imagen de microscopía electrónica de barrido de la región terminal de un cromosoma metafásico no-bandeado mostrando los extremos de las cromátidas hermanas. Inmersos en esa compleja estructura se encuentran los telómeros confiriendo protección a los extremos cromosómicos. Barra: 1  $\mu\text{m}$ . Tomado de Jack, 1986.

## ***1.1. Componentes estructurales del telómero y la región subtelomérica***

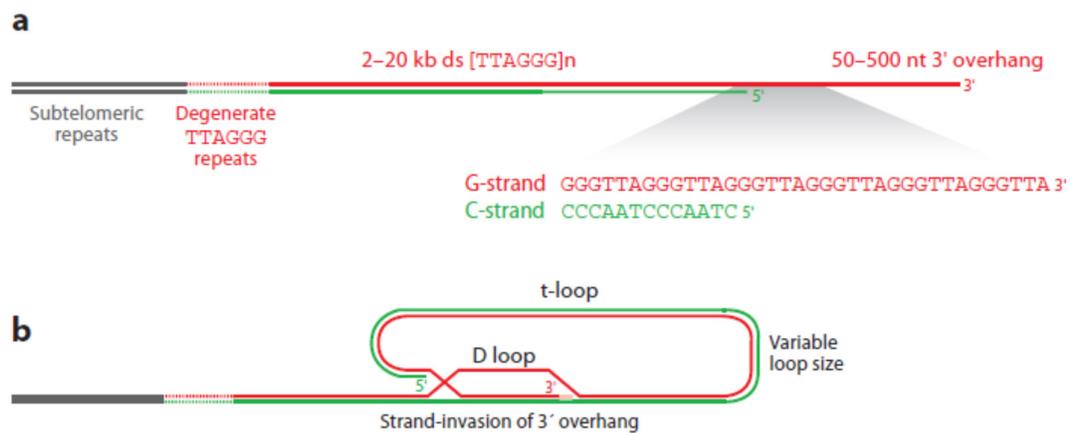
El término telómero (del griego *telos*, extremo y *mero*, partícula) fue acuñado por Müller en 1938 para designar la porción terminal del cromosoma. Müller advirtió, durante sus investigaciones sobre la frecuencia y tipos de reordenamientos cromosómicos producidos por los rayos X, que la producción de aberraciones terminales era sumamente rara por lo que dedujo que esa región debía poseer una función de protección para el cromosoma. A partir de entonces mucho se ha avanzado en el conocimiento de la estructura telomérica y las funciones que desempeña esta compleja región cromosómica.

### ***1.1.1. ADN telomérico***

En la mayoría de los organismos eucariotas, los telómeros están constituidos por la repetición en tandem de una secuencia de ADN muy corta, generalmente rica en los nucleótidos G y C (Blackburn y Gall, 1978). En los seres humanos la secuencia telomérica es TTAGGG (Moyzis y cols., 1988), la cual está altamente conservada en los vertebrados (Meyne y cols., 1989) y abarca una extensión de unos 2 a 20 kb. Esta secuencia también se ha observado en regiones pericentroméricas de cromosomas de algunos mamíferos (Meyne y cols., 1990), así como dispersa en sitios intersticiales del genoma. Una propiedad importante de los repetidos teloméricos (TTAGGG)<sub>n</sub> es su orientación en dirección 5' a 3' hacia todos los extremos cromosómicos (Blackburn y Gall, 1978; Blackburn y Szostak, 1984; Moyzis y cols., 1988). Esto implica que la hebra rica en G es replicada por la maquinaria de replicación de la hebra retrasada y la hebra rica en C por la maquinaria de replicación de la hebra líder.

El extremo físico del ADN telomérico culmina en una larga monohebra rica en G, generando un extremo 3' saliente, el cual se ha detectado en todos los extremos cromosómicos, sugiriendo que debe existir un procesamiento nucleolítico de la hebra rica en C (Makarov, 1997) (Fig. 2, a). El extremo 3' saliente del ADN telomérico se encuentra muy conservado en los eucariotas, y está relacionado con la formación y estabilización de una estructura telomérica especializada: el *t-loop*.

El *t-loop* es un gran bucle terminal del ADN telomérico con el cual culmina cada telómero y que permite proteger al extremo 3' saliente mediante la formación de un *D-loop* (Griffith y cols., 1999) (Fig. 2, b). Los *t-loops* han sido detectados con frecuencia en una gran variedad de células de mamíferos (incluyendo HeLa, hígado de ratón, HT1080 y leucocitos primarios de sangre periférica), organismos unicelulares (*Oxytricha*) y organismos parásitos (tripanosomátidos) (Griffith y cols., 1999; Murti y Prescott, 1999; Muñoz-Jordan y cols., 2001). Estas estructuras fueron visualizadas directamente mediante microscopía electrónica lo que sugiere que los *t-loops* muy probablemente se encuentren presentes *in vivo* (Griffith y cols., 1999; Nikitina y Woodcock, 2004).



**Figura 2.-** Estructura del ADN de los telómeros de mamíferos. **a.** Se indica la hebra rica en G (rojo) y la rica en C (verde), y el correspondiente extremo 3' saliente de la hebra rica en G. La interacción con el ADN subtelo mérico genera una región de repetidos teloméricos con secuencia modificada. **b.** Diagrama de la estructura del *t-loop* indicando únicamente la disposición del ADN en dicha estructura. Tomado de Palm y de Lange, 2008.

Es interesante mencionar que el descubrimiento de los extremos 3' saliente ha interferido con el clásico modelo de Watson (1972) y Olovinkov (1973) sobre el “problema de replicación de los extremos”. Dicho modelo sostiene que el acortamiento telomérico ocurre en la hebra retrasada ya que es incapaz de completar el extremo 3' del ADN telomérico. Si bien ésta es la causa del acortamiento de moléculas lineales con extremos romos *in vitro*, la presencia de extremos 3' salientes en todos los extremos cromosómicos a lo largo del ciclo celular indica que el acortamiento telomérico neto ocurriría en la hebra líder y no en la hebra retrasada (Lingner y cols., 1995). Esto se debería a que la hebra líder posee un molde más corto y es, por tanto,

incapaz de replicar la larga extensión del extremo 3' saliente. Además, el problema replicativo de la hebra retrasada no genera inconvenientes, ya que su resultado es justamente un extremo 3' saliente. De esta manera, Lingner y colaboradores (1995) sugirieron dos mecanismos de acción posibles de la telomerasa para compensar el acortamiento telomérico: a) alargar los extremos cromosómicos del brazo p y q antes de ser replicados o, b) actuar sobre el telómero replicado por la maquinaria de la hebra líder.

### ***1.1.2. ADN subtelomérico***

Contiguo al telómero se encuentra una región cromosómica sumamente polimórfica formada por una verdadera mezcla de regiones de secuencia única con distintas familias de ADN medianamente repetido que incluye duplicaciones segmentarias específicas de cada cromosoma así como repetidos subteloméricos, característicos de la región pero presentes en más de un cromosoma (Henderson, 1995).

En líneas generales, la región subtelomérica está organizada en dos subdominios, uno distal (con respecto al centrómero) caracterizado por la presencia de secuencias repetidas cortas comunes a varios cromosomas, y otro proximal con secuencias repetidas largas comunes a unos pocos cromosomas. Estos dos subdominios estarían separados entre sí por una región de repetidos teloméricos (TTAGGG)<sub>n</sub> (Flint y cols., 1997). A partir del mapeo y análisis inicial de las secuencias subteloméricas de casi todos los cromosomas humanos, Riethman y cols. (2004) encuentran que la región subtelomérica está enriquecida 25 veces en secuencias teloméricas, las cuales forman islas (TTAGGG)<sub>n</sub> con un tamaño promedio de 151-200 pb, pudiendo estar agrupadas o dispersas, tanto en el ADN repetido como en el de secuencia única (Riethman, 2005).

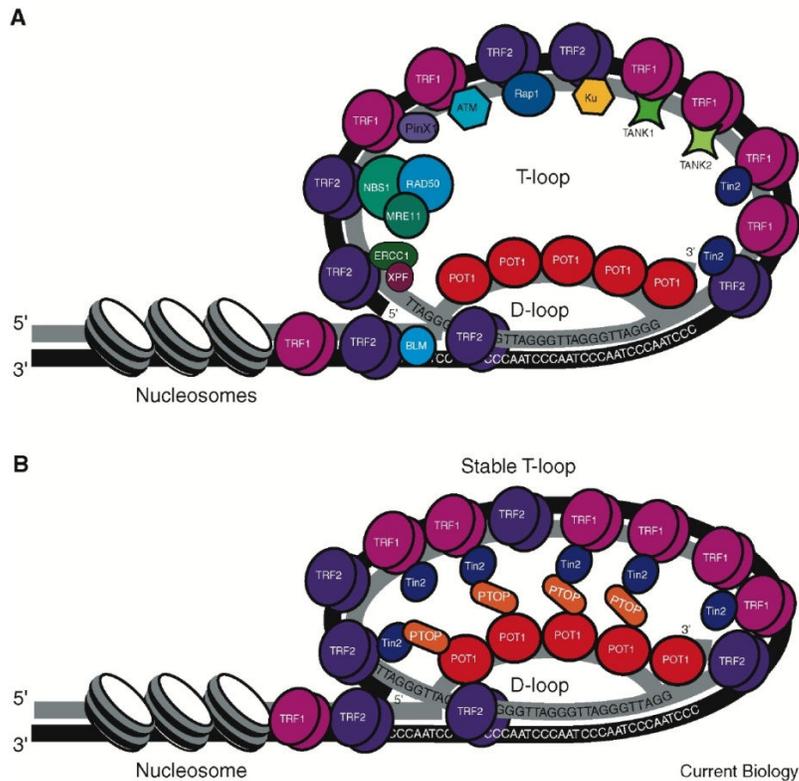
Es importante destacar, que la región subtelomérica posee una concentración de genes más elevada que el resto del genoma (Saccone y cols., 1992) y alberga el mayor número de oncogenes mapeados hasta el momento. Dicho segmento cromosómico posee además una elevada tasa de recombinación (Conforth y Eberle, 2001).

#### ***1.1.2.1. Región subtelomérica: sitio de aberraciones cromosómicas crípticas asociadas a retardo mental y malformaciones congénitas***

Recientemente, las investigaciones sobre la región subtelomérica se han incrementado considerablemente debido a que es el sitio de minúsculas aberraciones cromosómicas asociadas a retardo mental “idiopático” y malformaciones congénitas (Drets y Santiñaque, 2007). Dichas aberraciones no son advertidas por las técnicas de bandeado convencionales debido a que poseen tamaños inferiores a 5 megabases (Mb) y no alteran el patrón de diferenciación longitudinal, por lo que se les denominaron “crípticas”. Por lo tanto, para detectar este tipo de aberraciones es necesario recurrir a métodos moleculares, ya sea empleando marcadores subteloméricos polimórficos, que permiten evidenciar variaciones de la herencia mendeliana (Slavotinek y cols., 1999; Colleaux y cols., 2001; Raynan y cols., 2006) o bien utilizando métodos de citogenética molecular, basados en técnicas como la hibridación genómica comparativa (CGH, *Comparative Genome Hybridization*) (Ness y cols., 2002) o la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*) (Jalal y cols., 2003). En los últimos años, la detección de aberraciones crípticas ha provocado un gran aumento de las investigaciones destinadas a obtener métodos cada vez más confiables para el diagnóstico (Knight y Flint, 2000). Esto último ha sido posible gracias al notorio avance de las tecnologías biomédicas, tales como la clasificación cromosómica por citometría de flujo y los micromanipuladores electrónicos.

### ***1.1.3 Proteínas teloméricas***

El ADN telomérico está constantemente protegido por proteínas estructurales que se unen específicamente a dicha secuencia, ya sea en doble hebra (TRF1 y TRF2) o a la monohebra rica en G (Pot1) (Chong y cols., 1995; van Steensel y cols., 1998; Baumann y Cech, 2001). Estas proteínas son responsables de la formación de una estructura cromatínica de mayor orden, y están asociadas al ADN telomérico en todas las etapas del ciclo celular, presentando pequeñas señales dispersas en el núcleo interfásico y grandes bloques en las regiones terminales de los cromosomas metafásicos (Chong y cols., 1995; Smith y de Lange, 1997; van Steensel y de Lange, 1997; van Steensel y cols., 1998). Probablemente estas proteínas se hallen relacionadas con la compacta configuración de los telómeros (Luderus y cols., 1996). La proteína TRF2 es la proteína más importante en la formación de los *t-loop* y, al igual que TRF1 y Pot1, es fundamental para la estabilización de dicha estructura (van Steensel y cols., 1998; Griffith y cols., 1999; Stansel y cols., 2001; Karlseder y cols., 2003; Iwano y cols., 2004; Veldman y cols., 2004; Yoshimura y cols., 2004) (Fig. 3).



**Figura 3.-** Modelos sobre la estructura de los *t-loops* indicando la posible disposición de las proteínas teloméricas de unión directa al ADN telomérico y aquellas que forman complejos uniéndose a estas últimas. Tomado de Colgin y Reddel, 2004.

A su vez, se han caracterizado varias proteínas que si bien no reconocen específicamente la secuencia telomérica, forman parte de los telómeros por integrar grandes complejos proteicos con TRF1, TRF2 o Pot1 (Liu y cols., 2004; de Lange, 2005). Por ejemplo, se ha descrito que TRF1 forma un gran complejo con las proteínas TIN2, TANK1, TANK2 y el heterodímero Ku. La formación del complejo TRF1-TIN2 estimula fuertemente el apareamiento intratelomérico de los repetidos TTAGGG inducido por TRF1 (Kim y cols., 1999; Kim y cols., 2003; Bianchi y cols., 1999). Por su parte TRF2 se une con hRAP1 y Pot1 interactúa con PTOP. También se ha observado la participación en la protección telomérica de proteínas involucradas en las maquinarias de reparación, tales como DNA-PK, DNA-PKcs, Ku80-Ku70, RAD54, ATM, WRN y BLM (Hande, 2004). Se ha resaltado que la protección telomérica está basada en la acción conjunta de 6 proteínas esenciales: TRF1, TRF2, Pot1, TIN2, TPP1, Rap1, llamado colectivamente complejo “shelterin” (“caparazón”) (de Lange, 2005) (Fig. 4).





para la investigación biomédica de pacientes con cáncer o síndromes de envejecimiento prematuro (Svenson y Roos, 2009).

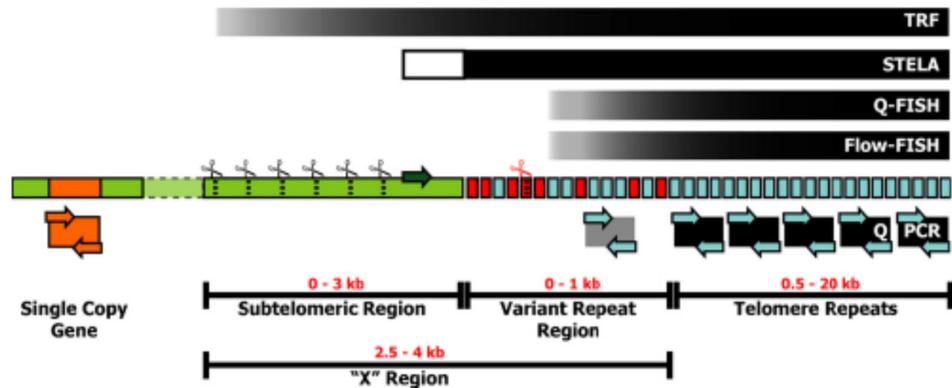
### ***1.2.1 Métodos para estimar la longitud del ADN telomérico***

Existen varias metodologías que permiten cuantificar la longitud del ADN telomérico (Aubert y cols., 2012) (Fig. 6). Las opciones difieren en su grado de dificultad técnica, así como, en el grado de detalle de la información proporcionada. También existen diferencias en el tipo de muestra que se requiere para efectuar la técnica, desde células en mitosis a núcleos en interfase, ADN extraído a cromosomas, etc. El tiempo que lleva cada metodología y el equipamiento de laboratorio necesario para la correcta realización de la misma, son otras de las variantes importantes a tener en cuenta.

#### ***1.2.1.1 Southern Blot telomérico***

Una de las técnicas más usadas para la estimación del tamaño de los telómeros es el análisis mediante *Southern blot* de la longitud de los fragmentos de restricción terminales, que posibilita efectuar una estimación global del tamaño del ADN telomérico del extracto de células analizadas (Fig. 6). Esta técnica, denominada Ensayo TRF (*Telomere Restriction Fragment*), fue desarrollada hace aproximadamente 25 años atrás y consiste en un tratamiento con varias enzimas de restricción que no tienen sitio de corte dentro de la secuencia telomérica, posterior electroforesis en gel de agarosa, hibridación con sonda telomérica mediante *Southern blot* y ulterior examen de los patrones obtenidos mediante análisis de imagen (Harley y cols., 1990). Luego de la digestión enzimática se obtienen fragmentos cortos de ADN genómico en conjunto con largos fragmentos no cortados conteniendo ADN telomérico, dado que las enzimas de restricción no cortan esa secuencia. El análisis suele combinar la densidad óptica obtenida de cada corrida positiva para la sonda telomérica con el patrón obtenido por un marcador de peso molecular. Para el análisis de la densidad óptica así como de la extensión del *smear* suele emplearse un programa de computación especializado. Una de las principales desventajas de este método es que frecuentemente se cuantifica también el ADN subtelomérico donde tiene sitio de corte la enzima de restricción, o bloques de ADN telomérico intersticiales. Otro aspecto negativo es que no se puede identificar a un cromosoma en particular dado que el análisis es a nivel del ADN genómico total fragmentado con una enzima de restricción. A pesar de estos

aspectos negativos, la técnica TRF es una de las técnicas más frecuentemente usadas para estimar la longitud de los telómeros.



**Figura 6.-** Resumen de las principales técnicas empleadas para la estimación de la longitud del ADN telomérico. Se indican las secuencias de ADN incluidas en cada estudio. Cabe mencionar que la técnica Tel-Flow-FISH incluye secuencias TTAGGG de otras partes del genoma. Tomado de Aubert y cols., 2012.

### 1.2.1.2 STELA

Otra de las metodologías empleadas para determinar la longitud del ADN telomérico es STELA (*Single TELomere Length Analysis*) (Baird y cols., 2003) (Fig. 6). Esta técnica está basada en la reacción de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando como cebadores a la propia secuencia telomérica (el extremo 3' saliente) y regiones específicas de la región subteloamérica de cada cromosoma. Al requerir juegos de cebadores específicos, esta técnica hasta el momento sólo ha sido utilizada para pocos telómeros: Xp, Yp, 2p, 11q, 12q y 17p (Britt-Compton y cols., 2006). El producto de la amplificación por PCR es corrido en un gel de agarosa, con el cual se efectúa *Southern blot* y posterior hibridación con sondas específicas de cada región subteloamérica. Al igual que en el caso de la técnica TRF, se emplea un marcador de peso molecular para estimar la longitud de los fragmentos. Una de las ventajas de este método es que no requiere una gran cantidad de ADN, siendo suficiente una concentración de ADN en el orden de picogramos o solamente 50 células, lo cual lo hace muy conveniente para su aplicación en el análisis de tipos celulares raros (menor al 5%). Además, STELA es muy adecuado para la medición de telómeros cortos. Sin embargo, este método solamente puede emplearse en unos pocos cromosomas dado que la complejidad de la región subteloamérica a

nivel de sus secuencias de ADN, ha complicado su extensión a otros cromosomas. Por otra parte, la técnica STELA no puede emplearse en telómeros muy largos (mayores a 20 kb) (Baird y cols., 2003).

### ***1.2.1.3 Q-PCR telomérico***

Una metodología alternativa para la estimación de la longitud del ADN telomérico consiste en emplear PCR cuantitativo (Q-PCR) (Cawthon, 2002) (Fig. 6). Mediante Q-PCR es posible obtener una estimación de la cantidad de secuencia telomérica presente en la muestra en relación a la cantidad de una secuencia referencia no telomérica, autosómica y no variable en su número de copias. Para realizar la técnica de Q-PCR telomérico, el ADN de los telómeros es amplificado utilizando cebadores (*primers*) para la hebra rica en G y para la hebra rica en C, junto con los cebadores para la secuencia de referencia. Los cebadores diseñados para amplificar el ADN telomérico presentan cierta región de no homología con la secuencia telomérica para evitar la formación de dímeros de cebadores. Los primeros dos ciclos de PCR se realizan a una baja temperatura de hibridación para permitir la adecuada amplificación del ADN telomérico. Luego los ciclos de PCR son realizados a temperaturas de hibridación superiores para extender preferencialmente el ADN que ya fue amplificado en los primeros dos ciclos. La amplificación es medida cuantitativamente y comparada con la obtenida con un gen de copia única, obteniéndose una relación entre ambos valores (*T/S ratio*). Una de las principales desventajas de este método es que no aporta una estimación en kb de la longitud del ADN telomérico *per se*, sino que aporta resultados relativos de la frecuencia de los repetidos TTAGGG por genoma de las muestras analizadas.

### ***1.2.1.4 Tel-Flow FISH***

Existen métodos basados en la hibridación (FISH) de sondas específicas para la secuencia telomérica (TTAGGG). Una de estas técnicas, Tel-Flow FISH, consiste en la hibridación de una sonda telomérica marcada con un fluoróforo en células en suspensión, las cuales son analizadas posteriormente en un citómetro de flujo (Baerlocher y cols., 2006) (Fig. 6). Tel-Flow FISH permite obtener un dato confiable y rápido sobre el contenido de ADN telomérico total de cada núcleo celular y posibilita en algunos casos medir simultáneamente la longitud telomérica de distintas poblaciones celulares empleando anticuerpos de superficie (por ejemplo granulocitos, linfocitos T, linfocitos B, etc.) (Baerlocher y cols., 2006). Esta

metodología tiene como ventaja que no necesita células en proliferación para efectuar la medición, aunque se ha visto que no es muy efectiva para determinados tipos celulares. El Tel-Flow FISH posee la desventaja de no poder discriminar los repetidos TTAGGG terminales de los ubicados en otros sitios del genoma, imposibilitando realizar una estimación de la longitud de cada telómero.

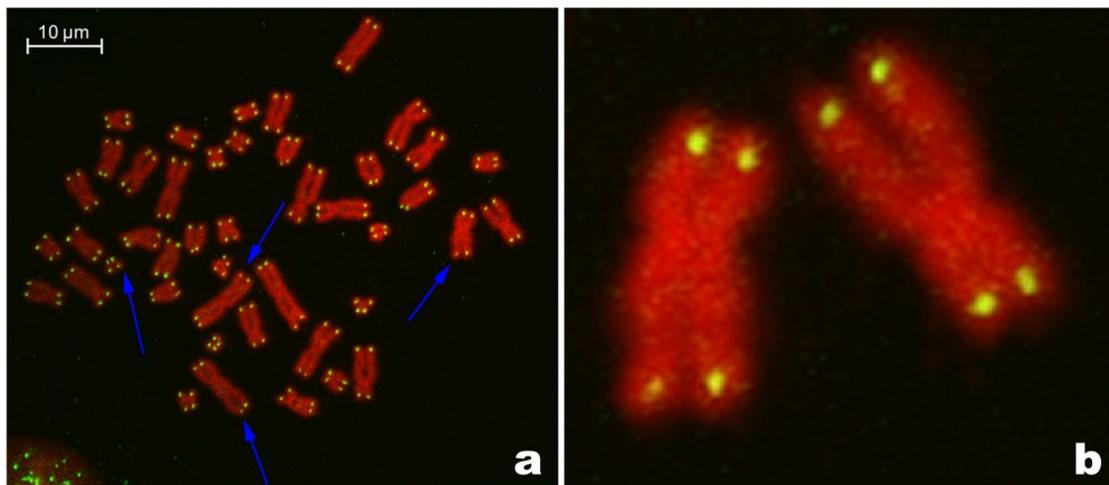
### ***1.2.1.5 Q-FISH telomérico***

La única técnica que permite obtener una precisa información sobre la longitud del ADN telomérico de cada cromosoma o incluso de cada telómero, además de obtener un estimativo total para cada célula, es el Q-FISH telomérico (Slijepcevic, 2001). Esta técnica consiste en efectuar FISH sobre metafases con una sonda específica para el ADN telomérico. A tales efectos se suele emplear una sonda tipo PNA complementaria a la secuencia telomérica (TTAGGG), que debido a la ausencia de cargas negativas de grupos fosfatos en su estructura peptídica, tiene mayor facilidad e intensidad de hibridación a su secuencia diana que una sonda ADN. Por tanto, para la detección y cuantificación del ADN telomérico mediante FISH, suelen utilizarse sondas PNA [CCCTAA]<sup>3</sup> conjugadas con fluorocromos, que hibridan específicamente en la hebra rica en G de cada telómero hermano. El análisis computacional de las intensidades de fluorescencia emitidas por las sondas en cada telómero, permite obtener datos estimativos de la longitud de cada señal detectada (Perner y cols., 2003) (Fig. 6). Esta metodología permitió detectar por primera vez una heterogeneidad en el tamaño telomérico de los distintos pares cromosómicos (Lansdorp y cols., 1996). Una de las grandes ventajas del Q-FISH telomérico es su gran sensibilidad, permitiendo la detección de telómeros extremadamente cortos. Esto es sumamente importante, dado que se ha reportado que la frecuencia de aparición de telómeros muy cortos es mejor indicador de una disfunción telomérica que la estimación del contenido total de ADN telomérico de cada célula (Hemann y cols., 2001; Samper y cols., 2001; Deng y cols., 2003; Morrish y Greider, 2009). En este sentido, cabe mencionar que los telómeros disfuncionales pueden desencadenar senescencia prematura, muerte celular o inestabilidad genómica (Svenson y Roos, 2009).

### ***1.3. FISH telomérico: asimetría entre cromátidas hermanas***

Si bien el Q-FISH telomérico es ampliamente usado y al analizar cientos de cromosomas se logra obtener una estimación muy precisa, varios autores demostraron la frecuente existencia

de diferencias significativas (asimetrías) en la intensidad de fluorescencia de las señales teloméricas de ambas cromátidas hermanas en cada metafase analizada (Lansdorp y cols., 1996; Bekaert y cols., 2002; Perner y cols., 2003; de Pauw y cols., 2005; Cukusic y cols., 2014) (Fig. 7). A su vez, Londoño-Vallejo y cols. (2001) detectaron importantes diferencias en la intensidad de fluorescencia de telómeros de cromosomas homólogos dentro de cada metafase. En un extensivo estudio mediante análisis tridimensional (3D) con microscopía confocal, Bekaert y cols. (2002) hallaron que las diferencias de intensidad observadas entre los telómeros de cromátidas hermanas (telómeros hermanos) no son causadas por variaciones del plano focal y aparentemente no están relacionadas con un par cromosómico en particular.



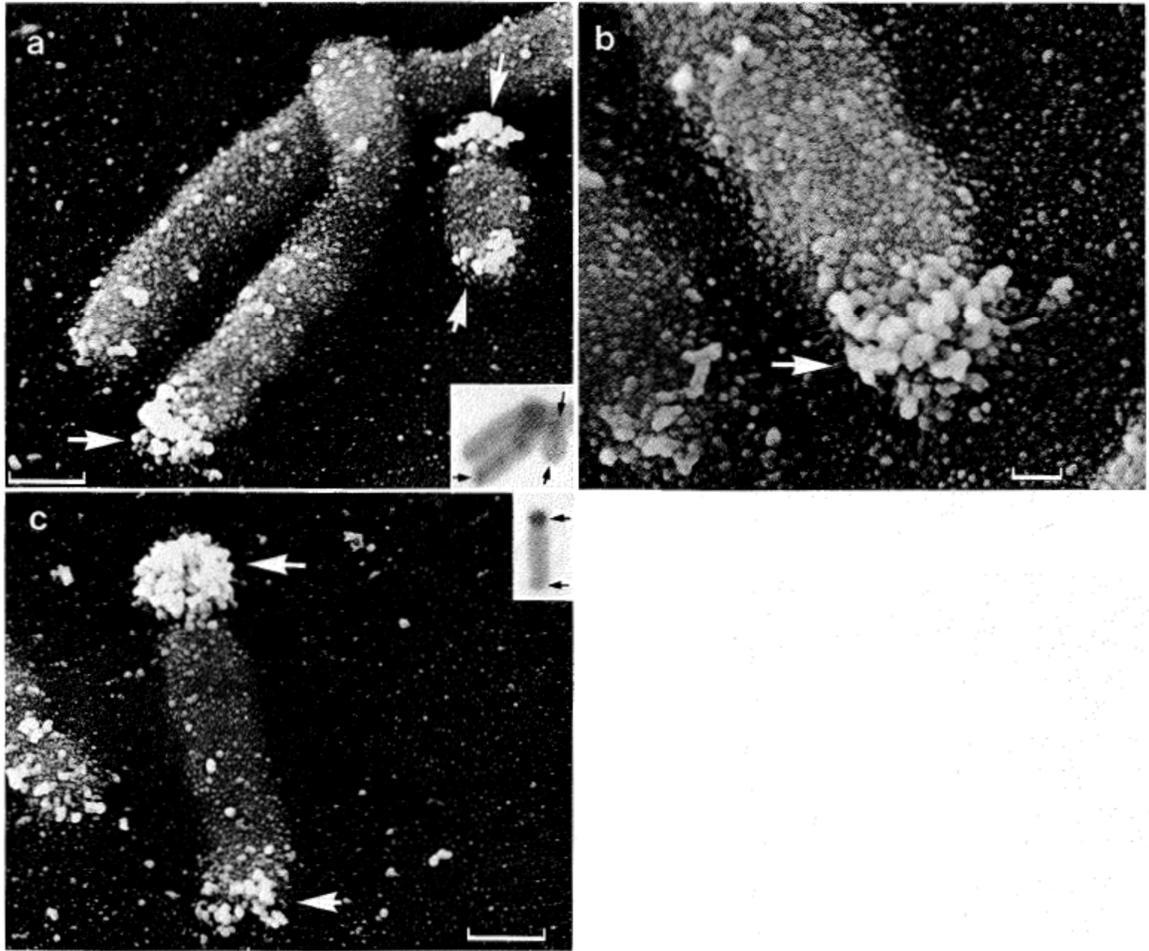
**Figura 7.-** FISH con sondas teloméricas (TTAGGG) en cromosomas humanos. **a.** Metafase humana con FISH telomérico. Las flechas indican ejemplos de cromosomas que presentan asimetría en la intensidad de fluorescencia entre telómeros hermanos. **b.** Como se puede apreciar al aumentar la imagen, las señales fluorescentes de las sondas teloméricas están inmersas en la cromatina de la región cromosómica terminal. Ambas imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal. Modificado de Bekaert y cols., 2002.

Estas observaciones son sumamente llamativas si tenemos en cuenta que los telómeros hermanos deberían evidenciar intensidades de fluorescencia muy similares dado que tienen prácticamente la misma longitud de ADN telomérico y, de existir diferencias, corresponden a pocos nucleótidos en el extremo 3' saliente generado en ambos extremos (Makarov y cols., 1997; Lingner y cols., 1995). Dado que estas pequeñas diferencias en la longitud del extremo 3' saliente son indetectables mediante FISH telomérico, otro fenómeno podría estar involucrado además de posibles artefactos de la metodología. También se descartó que dicha variabilidad

sea originada por eventos de recombinación desigual entre telómeros hermanos (de Pauw y cols., 2005), ya que se ha podido detectar que los telómeros de los brazos cromosómicos 9p, 12p, 14p, 17p y 9q son significativamente más cortos y los de 5p, Xp, 4q, y 18q más largos que el tamaño telomérico promedio (Martens y cols., 1998). Por tanto, si existiera recombinación desigual entre ambos telómeros hermanos las diferencias detectadas entre los distintos pares cromosómicos deberían ser aleatorias, pero esto no se corresponde a lo observado, dado que la heterogeneidad en el tamaño telomérico de los distintos pares parece estar determinada genéticamente (Graakjaer y cols., 2004; Graakjaer y cols., 2006). Esto último se demostró en un interesante estudio empleando como modelo el cromosoma Y de padres e hijos, donde se detectó que la longitud telomérica del brazo largo del cromosoma Y es heredada, indicando que la variabilidad en el FISH telomérico no se debe a variaciones genéticas tales como la recombinación (de Pauw y cols., 2005). Por otra parte, estos autores confirmaron que la elevada variabilidad detectada en el FISH telomérico es intracelular, principalmente entre telómeros hermanos y que las diferencias no están relacionadas con variaciones en el largo del ADN telomérico de cada uno. Las frecuentes asimetrías entre telómeros hermanos, conducen a que sea necesario analizar un elevado número de metafases para poder lograr datos certeros sobre los tamaños teloméricos. Esto lamentablemente es una limitante para la aplicación del Q-FISH telomérico en células con un índice de proliferación sumamente bajo. En el presente, la interrogante sobre el origen de las asimetrías observadas con FISH entre telómeros hermanos sigue planteada.

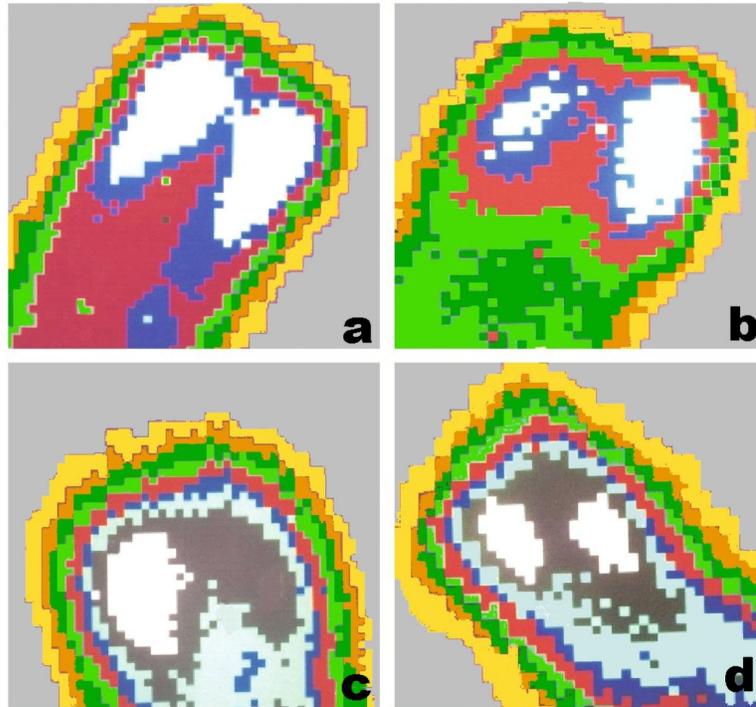
#### ***1.4. Bando T: asimetría entre cromátidas hermanas***

La particular composición y organización de la cromatina telomérica en los extremos cromosómicos hace que dichas regiones cromosómicas presenten propiedades citológicas muy peculiares, como por ejemplo, su elevada resistencia a la desnaturalización por calor. Esta particularidad permite teñir de forma selectiva los extremos cromosómicos mediante el método de bando T (Dutrillaux, 1973). Esta técnica deriva del método citológico para producir bando R y se basa en la incubación de las preparaciones cromosómicas durante unos minutos en un buffer fosfato-ácido cítrico a elevada temperatura (87 °C) (Fig. 8).



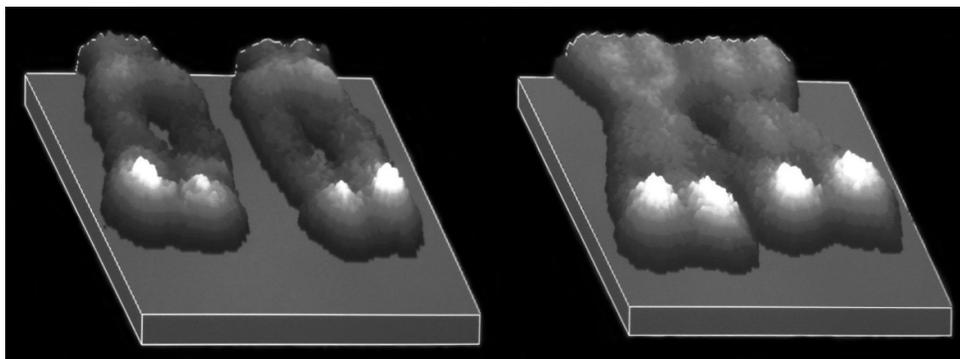
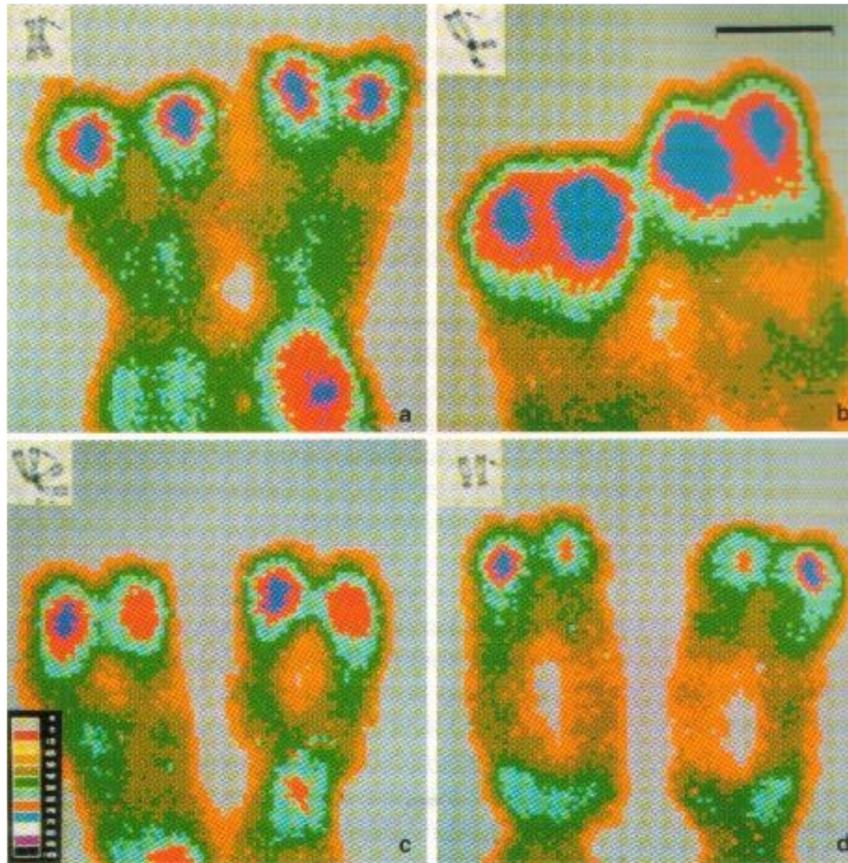
**Figura 8.-** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de cromosomas humanos con bandeo T. Se puede apreciar la complejidad de la región cromosómica terminal resistente a la desnaturalización por calor. Tomado de Jack, 1986.

Investigaciones llevadas a cabo en nuestro país mediante análisis microdensitométrico computacional de bandas T de cromosomas humanos y de la línea celular CHO, revelaron que frecuentemente la cromatina telomérica de alta densidad se distribuye asimétricamente entre cromátidas hermanas (Drets y cols., 1992a) (Fig. 9).



**Figura 9.-** Distribución de la cromatina de mayor densidad entre cromátidas hermanas de cromosomas humanos con bandeo T. Las densidades más elevadas corresponden a las áreas representadas en blanco. Como se puede apreciar, las áreas de cromatina de mayor densidad se distribuyen simétricamente (a) o asimétricamente (b, c) entre cromátidas hermanas. En algunos casos de distribución asimétrica, las áreas de mayor densidad parecen evidenciar pequeños intercambios, denominados *t*-SCE (d). Modificado de Drets y cols. (1992a).

Este inesperado hallazgo fue confirmado analizando cromosomas endorreduplicados, dado que en ambos el patrón de distribución fue el mismo, descartando posibles causas metodológicas e indicando que se debe a un fenómeno cromosómico subyacente (Drets y Mendizábal, 1998) (Fig. 10).



**Figura 10.-** Análisis microdensitométrico de cromosomas CHO endorreduplicados con bandeó T. Arriba: Imagen de análisis 2D de distribución de las densidades de tinción analizadas. Abajo: Imagen de proyección pseudo-3D. Se evidencia claramente que en ambos cromosomas “hermanos” el patrón de distribución de la cromatina sub-telomérica de mayor densidad es el mismo. Tomado de Drets y Mendizábal, 1998 y modificado de Drets y Santiñaque, 2005.

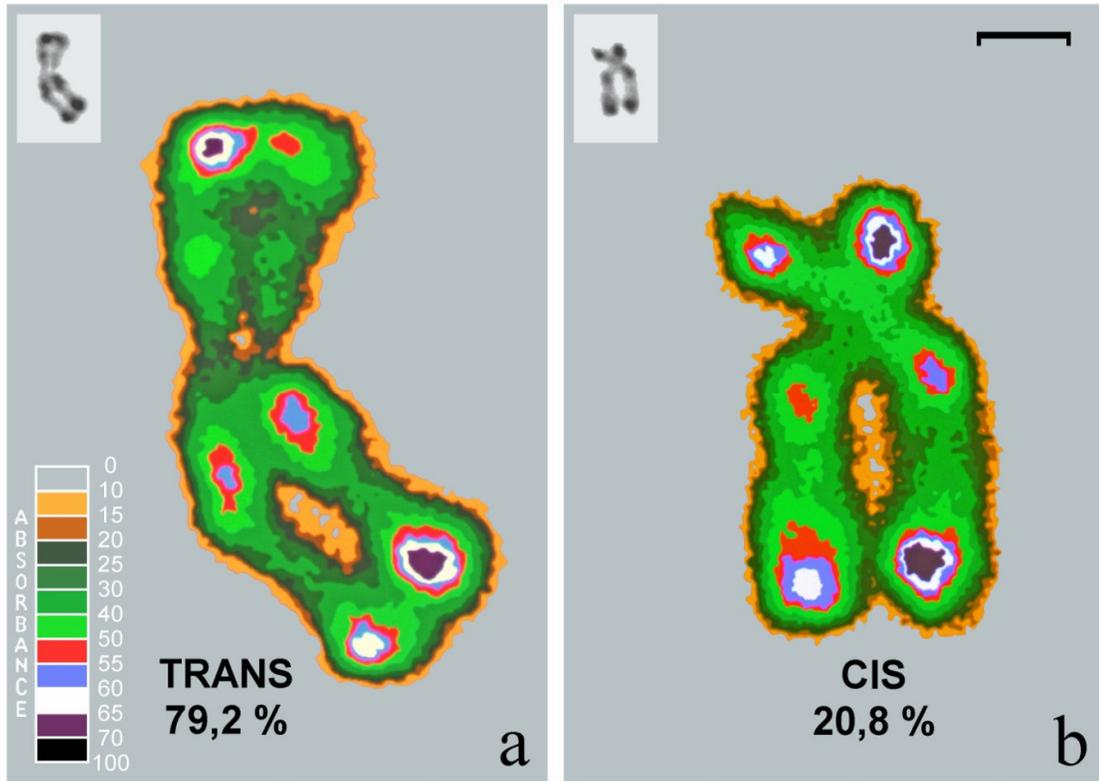
En las áreas de cromatina de alta densidad detectadas por análisis microdensitométrico de bandas T es donde frecuentemente se localizan los repetidos teloméricos y las proteínas características de dicha región (Drets, 2004). Es importante mencionar que empleando FISH

las señales fluorescentes de sondas teloméricas en cromosomas metafásicos no están localizadas en los extremos *per se* de las cromátidas sino que están rodeadas de material cromatínico (Moyzis y cols., 1988) (Fig. 7). Esta observación fue confirmada empleando microscopía electrónica de alta resolución (Steinmüller y cols., 1993).

Las diferencias observadas en la distribución de la cromatina telomérica entre cromátidas hermanas de cromosomas con bandeo T, aparentan estar relacionadas con las diferencias entre telómeros hermanos detectadas con Q-FISH telomérico. Considerando que al efectuar el FISH telomérico se desnaturalizan los extendidos cromosómicos a una temperatura de 80 °C, que es muy cercana a la que se emplea para realizar el bandeo T (87 °C), resulta interesante considerar que ambos fenómenos pudieran estar relacionados. Esto podría indicar que la distribución asimétrica de los bloques de cromatina de mayor densidad (altamente resistentes a la desnaturalización por calor), podrían interferir de forma diferencial con la hibridación de las sondas teloméricas a nivel de las cromátidas hermanas, causando diferencias en la fluorescencia emitida.

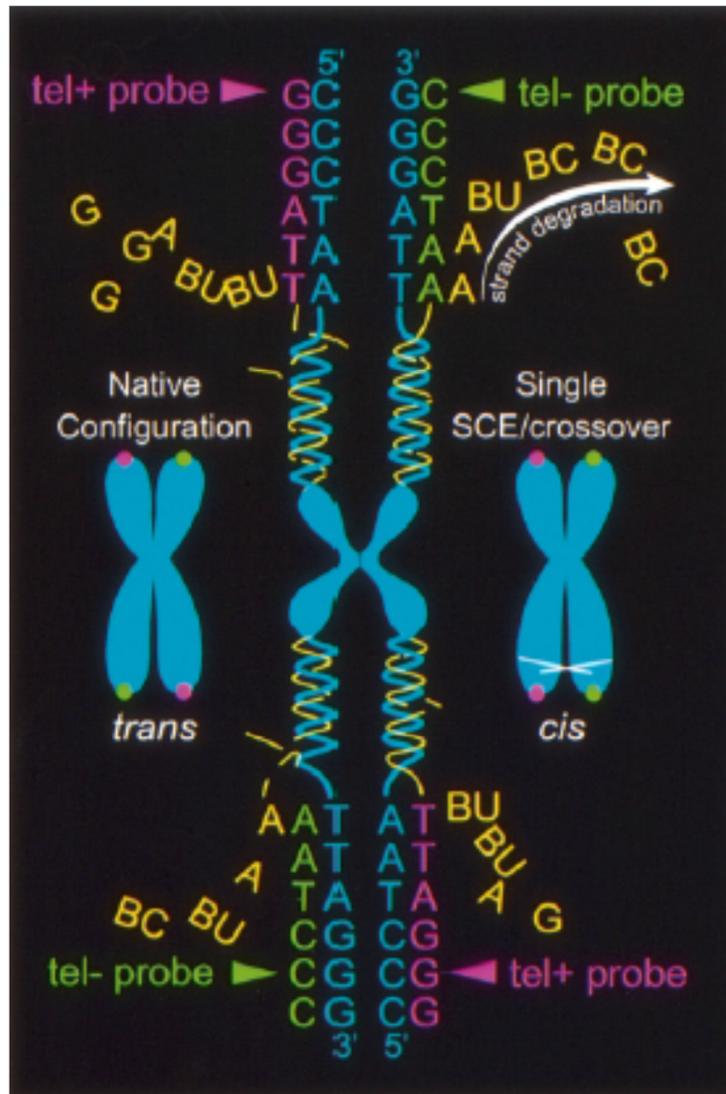
#### ***1.4.1 La asimetría entre telómeros hermanos evidenciada con bandeo T se distribuye de manera no aleatoria en ambos brazos cromosómicos***

Un estudio sobre la distribución de la cromatina sub-telomérica de alta densidad en ambos extremos de cromosomas humanos con bandeo T, reveló que cuando se observa en ambos brazos del cromosoma una distribución asimétrica, las áreas de mayor densidad de cada extremo se localizan preferencialmente en cromátidas opuestas (Santiñaque y Drets, 2007). Esta configuración en TRANS de las áreas de mayor densidad, se detectó en el 79,2 % de los cromosomas humanos que presentaron en el análisis microdensitométrico asimetría en ambos brazos cromosómicos (Fig. 11).



**Figura 11.-** Imágenes gráficas de cromosomas humanos normales con bandeo T obtenidas mediante análisis microdensitométrico evidenciando configuraciones TRANS (a) y CIS (b) de la cromatina telomérica de mayor densidad. Las áreas de mayor densidad se presentan en violeta. Como se puede apreciar, claramente las frecuencias TRANS/CIS observadas son muy diferentes a las esperadas al azar, es decir si la asimetría telomérica en cada brazo cromosómico tuviera un patrón de distribución aleatorio. Modificado de Santiñaque y Drets, 2007.

De esta manera, la cromatina de mayor resistencia a la desnaturalización por calor se distribuye de una forma no aleatoria en ambos brazos cromosómicos, donde las mayores densidades de cada extremo se localizan mayoritariamente en cromátidas opuestas (configuración TRANS). Llamativamente, la frecuencia de esta configuración en TRANS es bastante similar a la reportada por Cornforth y Eberle (2001) en cromosomas humanos empleando CO-FISH telomérico, un método que permite identificar el modo de replicación de cada telómero mediante la detección de las hebras parentales (Goodwin y Meyne, 1993) (Fig. 12).



**Figura 12.-** Diagrama resumido sobre la metodología de CO-FISH telomérico. Para efectuar el CO-FISH se incuban las células en presencia de BrdUrd durante 1 ciclo de replicación. Luego se tratan los extendidos cromosómicos con Hoechst 33258 y radiación UV que degradan la hebra recién replicada. Finalmente se efectúa un FISH con sondas teloméricas de hebra única para identificar el modo de replicación que dio origen a cada telómero hermano. Tomado de Cornforth y Eberle, 2001.

Estas observaciones refuerzan la hipótesis que propone a la asimetría entre telómeros hermanos observada en mitosis, no como producto de un artefacto metodológico sino como un fenómeno normal de la región telomérica, tal vez originado en las etapas previas del ciclo celular.

## ***1.5. Telómeros en las etapas S y G2 del ciclo celular***

Evidencias convergentes sugieren que los telómeros hermanos poseen un procesamiento postreplicativo diferencial, principalmente en la forma en que cada uno adopta su estado protegido. En un interesante experimento, Bailey y cols. (2001) encontraron que la expresión transitoria de un mutante dominante de TRF2, sin su dominio de unión al ADN y del extremo amino terminal, provocaba fusiones extremo a extremo involucrando solo uno de los telómeros hermanos, nunca ambos. Además, cuando un cromosoma presentaba fusiones teloméricas en ambos brazos cromosómicos, las mismas ocurrían en cromátidas opuestas (en TRANS) (Bailey y cols., 2001; Bailey y Murnane, 2006). Empleando CO-FISH telomérico, los autores pudieron determinar que las fusiones involucraban únicamente a los telómeros replicados a partir de la hebra rica en C, es decir mediante la maquinaria de síntesis de la hebra líder. La ausencia de fusiones en los telómeros replicados a partir de la hebra rica en G es sumamente llamativa. En conjunto con esto, Wang y cols. (2004) hallaron que la expresión de otro mutante dominante de TRF2, que sólo carecía de su dominio básico amino-terminal, producía deleciones de tamaño de los *t-loops* preferentemente en los telómeros de la hebra líder, mientras que los telómeros replicados por la maquinaria de síntesis de la hebra retrasada permanecían intactos (Wang y cols., 2004). Por otro lado, en células que carecen de la actividad helicasa de la proteína WRN (la helicasa RecQ carente en el síndrome de Werner) (Gray y cols., 1997), se produce frecuentemente una deleción de los telómeros replicados por la maquinaria de la hebra retrasada, lo cual sugiere que esta proteína es necesaria para la eficiente replicación de la hebra rica en G (Crabbe y cols., 2004). En conjunto, estas observaciones parecen indicar que los telómeros hermanos poseen distintos requerimientos proteicos para llegar a su estado protegido o para completar su replicación manteniendo su integridad. Sin embargo, muchas de estas observaciones permanecen sin explicación. Además, se desconoce si estos hallazgos están relacionados con la asimetría detectada frecuentemente entre telómeros hermanos de cromosomas metafásicos. Por otra parte, a nivel de núcleos interfásicos existe escasa información con respecto a la forma en que los telómeros recién replicados adquieren su estado protegido y a cómo nucleon esa gran estructura nucleoproteica altamente especializada que en mitosis posee varias propiedades similares a la heterocromatina.

## ***I.6. Comentario final***

Desde hace unos años existe un continuo aumento de las investigaciones sobre la región cromosómica terminal principalmente por su importancia en temas relacionados con la salud. Sin embargo aún persisten muchas interrogantes. En este sentido, el origen de la asimetría entre telómeros hermanos detectada en mitosis mediante FISH telomérico y bandeo T es, hasta el momento, desconocido. Dado que la asimetría detectada con bandeo T presenta una distribución no aleatoria en ambos brazos cromosómicos (Santiñaque y Drets, 2007), con una frecuencia cercana a la obtenida empleando CO-FISH telomérico, creemos que dicho fenómeno se encuentra relacionado con la compactación de la compleja estructura cromatínica nucleada en la región sub/telomérica. Si bien existen estudios sobre la asimetría entre telómeros hermanos detectada con Q-FISH telomérico, hasta el momento no se ha efectuado un análisis pormenorizado de dicha distribución con respecto a ambos extremos cromosómicos.

## **II. OBJETIVOS**

### ***II.1 Objetivo general***

Investigar las posibles causas del origen de la asimetría detectada entre telómeros hermanos de cromosomas metafásicos humanos mediante un detallado análisis de las señales fluorescentes de FISH telomérico en cada brazo cromosómico. Esta información permitirá evaluar si el fenómeno de la asimetría telomérica es aleatorio o presenta algún patrón específico de distribución.

### ***II.2 Objetivos específicos***

- Analizar si la asimetría detectada entre telómeros hermanos con FISH telomérico posee un patrón no aleatorio de distribución con respecto a ambos brazos cromosómicos (TRANS vs CIS) estudiando cromosomas metafásicos de las líneas celulares humanas HL60 y HeLa.

- Evaluar si existe una distribución asimétrica en mitosis entre telómeros hermanos de la proteína telomérica TRF2 en la línea celular HeLa empleando la técnica de citocentrifugación y posterior inmunomarcación con anticuerpo anti-TRF2.

- Realizar un detallado análisis de Q-FISH telomérico en cromosomas metafásicos obtenidos mediante cultivo de linfocitos humanos con el fin de evaluar si la asimetría detectada entre telómeros hermanos posee un patrón no aleatorio de distribución con respecto a ambos brazos cromosómicos (TRANS vs CIS).

## **III. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La asimetría detectada en el tamaño/intensidad de las señales fluorescentes en telómeros hermanos mediante sondas teloméricas podría presentar una distribución no aleatoria en ambos brazos cromosómicos, con una tendencia a que las señales de mayor intensidad o tamaño de cada extremo estén localizadas en cromátidas opuestas (TRANS) en base a los datos obtenidos en cromosomas humanos con bandeo T (Santiñaque y Drets, 2007). A su vez, es probable que

también pueda observarse la presencia de asimetría a nivel de las señales fluorescentes del anticuerpo anti-TRF2 en inmunomarcaciones de extendidos cromosómicos obtenidos por citocentrifugación.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***IV.1. Cultivos de líneas celulares humanas***

Se realizaron cultivos en monocapa de la línea celular HeLa en medio de cultivo DMEM, y cultivos en suspensión de células HL60 en medio RPMI 1640 a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los medios de cultivo se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (20% en el caso de HL60) y antibióticos (penicilina: 100 U/mL; estreptomicina: 125 µg/mL).

### ***IV.2. Extracción de muestras de sangre periférica humana***

Las muestras de sangre periférica humana analizadas correspondieron a sujetos adultos voluntarios sanos y fueron extraídas por personal especializado de la Salud mediante punción de una vena del brazo. Las personas que aceptaron participar de la presente investigación firmaron un consentimiento informado. El volumen de extracción fue de 5 mL por cada donante y se utilizaron jeringas heparinizadas (Liquemine, Roche).

### ***IV.3. Cultivos de linfocitos humanos***

Los linfocitos humanos periféricos fueron cultivados en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino, fitohematoglutina y antibióticos. Por cada cultivo se colocaron 4,8 mL de RPMI 1640, 1,2 mL de suero fetal bovino, 130 µL de fitohematoglutina y 800 µL de sangre periférica. Los linfocitos se cultivaron 72 h en estufa a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Una hora antes de la recolección se adicionó al cultivo 40 µL de KaryoMAX (Gibco).

### ***IV.4 Obtención de extendidos cromosómicos para FISH***

Las células mitóticas de las líneas celulares HL60/HeLa se recolectaron después de 2 h de exposición a Colcemid (0,08 µg/mL; Ciba). En los experimentos con linfocitos humanos se utilizó una incubación de 1 h con KaryoMAX (Gibco). Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. Luego se efectuó un choque hipotónico con KCl (0.075 M) durante 10 min a 37 °C con posterior centrifugación a 1000 rpm (5 min). Para mejorar la calidad del FISH las células se fijaron 3 veces en metanol-ácido acético glacial (3:1), siguiendo los protocolos convencionales (fijación en vortex-centrifugación). A partir de este paso las células fijadas

fueron almacenadas en freezer a -20 °C hasta el momento de realizar los preparados para FISH, donde se efectuó un nuevo ciclo de fijación con 3:1. Para obtener los extendidos cromosómicos previamente se colocaron los portaobjetos limpios sobre una bandeja metálica en baño a 55 °C durante 30 seg, luego se depositaron 25 µL de la suspensión celular sobre el portaobjeto y finalmente se incubó en dicho baño durante 1 min. La calidad de los extendidos cromosómicos fue evaluada empleando un microscopio con óptica de contraste de fases (16-40x). Los preparados seleccionados para efectuar el FISH telomérico se dejaron “envejecer” durante 24 h a temperatura ambiente.

#### ***IV.5. FISH telomérico (Kit DAKO)***

El FISH telomérico se efectuó con el kit “Telomere PNA FISH Kit” (DAKO, Código K5325), siguiendo las instrucciones aconsejadas por la empresa fabricante, exceptuando la sustitución de TBS por PBS (rehidratación y lavados) en gran parte de los experimentos realizados. Partiendo de preparados “envejecidos” durante 24 h se siguieron los siguientes pasos:

- 1) rehidratación en PBS durante 5 min;
- 2) fijación (2 min) con formaldehído al 4% (Sigma) y lavados en PBS (3 x 5 min);
- 3) tratamiento con Proteinasa K (DAKO) durante 10 min y lavado (2 min) en PBS;
- 4) refijación de los extendidos en formaldehído (4%, 2 min) y lavados con PBS (3 x 5 min);
- 5) deshidratación de los preparados en etanol 70%, 90% y 100% (5 min c/u) y secado al aire;
- 6) colocación en la zona de interés del extendido de 3,5 µL del Mix de la sonda PNA telomérica [CCCTAA]<sup>3</sup> FITC (DAKO) para un cubreobjetos de 15 x 15 mm;
- 7) desnaturalización simultánea de la sonda y los cromosomas en una platina a 80 °C durante 3 min;
- 8) hibridación de los extendidos durante 2 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda y protegidos de la luz;
- 9) lavado rápido a temperatura ambiente (1 min) en *Rinse Solution* (DAKO) para retirar los cubreobjetos;
- 10) incubación en *Wash Solution* (DAKO) a 65 °C durante 5 min;
- 11) deshidratación en etanol 70%, 90% y 100% (5 min c/u) y secado al aire;
- 12) contratincción de los extendidos con Ioduro de Propidio (25 µg/mL) en Antifade.

Este protocolo fue empleado para las líneas celulares humanas HeLa y HL60.

#### ***IV.6. Citocentrifugación e inmunomarcación con anticuerpo anti-TRF2 en células HeLa***

Para obtener un mayor número de metafases se colocaron al cultivo 400  $\mu\text{L}$  de una solución de Colcemid de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Ciba (concentración final 0,16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las células se incubaron durante 2 h en estufa a 37 °C con 5% de  $\text{CO}_2$  y posteriormente se recolectaron las células mitóticas mediante el método de “shake-off”. Luego de una centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, las células se resuspendieron en buffer hipotónico KCL 0,075 M. Se incubó durante 15 min en baño a 37 °C e inmediatamente se cargaron los conos de la citocentrífuga. Se efectuó una citocentrifugación durante 1 min a 2000 rpm. Los preparados fueron fijados con PFA 4% durante 10 min con posterior lavado con PBS durante 5 min, permeabilizados 15 min con 0,5% Triton-X 100 (Sigma) y lavados con PBS (2 x 3 min). Seguidamente, se incubaron en cámara húmeda durante 24 h (4 °C) con 40  $\mu\text{L}$  del Mix de anticuerpo primario anti-TRF2 (Abcam) diluido en PBS. Posteriormente se efectuaron lavados con PBS (2 x 7 min) y se incubaron los extendidos en cámara húmeda durante 1 h (37 °C) con 35  $\mu\text{L}$  de anticuerpo secundario (Alexa 488) diluido en PBS y protegidos de la luz. Finalmente, se realizaron lavados con PBS (2 x 7 min) y la contratinción de cromosomas/núcleos con DAPI (0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en antifade.

#### ***IV.7. Q-FISH telomérico***

Se realizó un protocolo basado en lo publicado por varios autores incluyendo modificaciones reportadas en Cytometry por Bekaert y cols. (2002). Se emplearon preparados “envejecidos” durante 24 h los cuales fueron inicialmente rehidratados en PBS durante 5 min. Posteriormente se realizó una fijación de 2 min con formaldehído al 4% y lavados en PBS (3 x 5 min). Se efectuó un tratamiento con Proteinasa K (DAKO) durante 10 min con posterior lavado de 2 min en PBS. Luego se refijaron los extendidos en formaldehído al 4% durante 2 min y se lavaron con PBS (3 x 5 min). Los extendidos fueron tratados durante 5 min con TNT (0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,08% Tween-20, pH 7,5). A continuación se deshidrataron los preparados en una serie de etanoles: 70%, 90% y 100% (5 min c/u) y se secaron al aire. Luego se depositaron en la zona de interés 3,5  $\mu\text{L}$  del Mix de la sonda PNA telomérica [CCCTAA]<sup>3</sup> Cy3 (DAKO, Código K5326) para un cubreobjetos de 15 x 15 mm y se desnaturalizaron simultáneamente la sonda y los cromosomas en una platina a 80 °C (3 min). Posteriormente se

dejaron hibridar los extendidos durante 2 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda y protegidos de la luz. Luego se efectuaron 2 lavados de 15 min cada uno a temperatura ambiente con una solución de 70% formamida/10mM Tris pH 7,2. A continuación los extendidos fueron tratados con TNT (3 x 5 min). Finalmente se colocaron los preparados en una serie de etanoles: 70%, 90% y 100% (5 min c/u). Se dejaron secar los extendidos y se contratiñeron con DAPI (0,05 µg/mL) en antifade. Este protocolo fue empleado para el análisis de cromosomas metafásicos obtenidos del cultivo de linfocitos humanos.

#### ***IV.8. Adquisición de imágenes microscópicas con cámara CCD de alta resolución***

Los experimentos de FISH e inmunofluorescencia se registraron en un microscopio de epifluorescencia (Axioplan-Metafer II, Zeiss) con cámara CCD de alta resolución (Metasystems) y programa de adquisición especializado (ISIS, Metasystems). Se configuraron los ajustes de captura para obtener imágenes de elevada calidad. En todos los casos se empleó un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromat 63X con apertura numérica de 1,4 (Zeiss). La lámpara UV utilizada fue una HBO 100W (Osram). Se efectuaron ajustes de brillo y contraste de las imágenes obtenidas empleando *Image J* o *PaintShopPro*.

#### ***IV.9. Análisis de imágenes de FISH telomérico (Kit DAKO) y de inmunomarcación con anticuerpo anti-TRF2***

Las imágenes de FISH telomérico obtenidas de las líneas celulares HL60 y HeLa con el protocolo del Kit DAKO así como las registradas en los experimentos de inmunomarcación de TRF2 en células HeLa, fueron analizadas mediante inspección visual a alta magnificación (zoom digital 2500%) empleando programas computacionales de análisis de imagen tales como *Image J* o *PaintShopPro (Corel)*. Se emplearon niveles de zoom muy elevados para ver claramente las señales de los telómeros hermanos, evaluar su eventual grado de asimetría y determinar la posición de las señales de mayor tamaño/intensidad en casos de asimetría muy elevada en ambos brazos cromosómicos. En los casos en que los mayores tamaños/intensidades de las señales teloméricas de cada brazo cromosómico se localizaban en cromátidas opuestas, dicho cromosoma se cuantificaba como TRANS. Por el contrario, si los mayores tamaños/intensidades de las señales teloméricas de ambos brazos cromosómicos se localizaban

en la misma cromátida, el cromosoma se cuantificaba como CIS. Finalmente se efectuó un conteo de los cromosomas TRANS y CIS en el total del campo analizado. Con el programa *Image J* es posible efectuar una pseudo-cuantificación de los telómeros hermanos, trazando una línea con dicho programa sobre ambos telómeros y solicitando un perfil de intensidades de fluorescencia. Si bien este procedimiento aporta datos semi-cuantitativos sobre las intensidades de fluorescencia de los telómeros hermanos, no resultó una estrategia práctica para el análisis de un número elevado de cromosomas pero fue útil para verificar algunos niveles de asimetría. Por otra parte, el análisis se basa en la información que aporta el trazado de una línea y no del área total de la señal telomérica en cada cromátida, como sería lo ideal para los objetivos del presente trabajo.

#### ***IV.10. Análisis de Q-FISH telomérico utilizando el programa TFL-Telo***

Las imágenes de FISH telomérico obtenidas en extendidos cromosómicos de linfocitos humanos fueron analizadas con el programa TFL-Telo. Es importante mencionar que este programa está especialmente diseñado para el análisis cuantitativo de las intensidades de fluorescencia de los telómeros y fue desarrollado por el laboratorio “Terry Fox Laboratory of the British Columbia Research Centre” (Lansdorp y cols., 1996; Poon y cols., 1999). Si bien el programa es de distribución gratuita en Internet para uso académico, fue necesario registrarse y aceptar los términos de la “BC Cancer Agency”. La versión adquirida del programa es del año 2009. TFL-Telo permite, a partir de una imagen de FISH telomérico, identificar automáticamente la mayoría de los contornos de los cromosomas y determinar la intensidad total de cada uno de los telómeros (intensidad de fluorescencia total-IFI). De esta manera, se analizaron ambos brazos de cada cromosoma mediante la determinación de la intensidad de fluorescencia total de cada telómero hermano. El programa asigna un número a cada cromosoma e identifica con colores diferentes cada telómero de T1 a T4 (T1: magenta, T2: rojo, T3: cyan, T4: azul). Para el análisis de la asimetría entre telómeros hermanos y su distribución con respecto a ambos brazos cromosómicos, fue necesario asignar un único criterio de nomenclatura de los telómeros por cromosoma. En este sentido se adoptó el siguiente criterio: brazo p Tel izquierda (T1, magenta), brazo p Tel derecha (T2, rojo), brazo q Tel izquierda (T3, cyan), brazo q Tel derecha (T4, azul). De esta manera, al exportar los datos a una tabla Excel, las columnas de datos T1 y T2 corresponden al brazo p, mientras que T3 y T4 pertenecen al brazo q, donde T1 y T3 así como T2 y T4 se encuentran en una misma cromátida, respectivamente. Se diseñó una planilla de *Excel (Microsoft Office)* altamente compleja para

estudiar los datos de asimetría y determinar los conteos TRANS/CIS de cada imagen analizada. Se empleó un criterio semi-cuantitativo para distinguir las asimetrías de las simetrías basado en el porcentaje de la diferencia detectada entre telómeros hermanos. El resultado de TRANS y CIS se expresó como porcentaje del total de eventos TRANS y CIS sumados.

#### ***IV.11. Análisis estadístico de las proporciones de las configuraciones TRANS y CIS detectadas con FISH telomérico e inmunomarcación de TRF2***

Para comparar las proporciones obtenidas de TRANS y CIS, se efectuó un test de proporciones empleando la aproximación de la distribución binomial a la distribución normal (Pagano y Gauvreau, 2000). Los requisitos necesarios para utilizar este test fueron adecuados en todos los casos y fueron los siguientes:  $n \cdot p > 5$  y  $n \cdot (1-p) > 5$  donde  $n$  es el número total de cromosomas considerados (únicamente TRANS + CIS) y  $p$  es la frecuencia TRANS obtenida. La hipótesis nula de dicha prueba fue  $p \leq 0,50$  (al azar) y la hipótesis alternativa  $p > 0,50$ . De esta manera la prueba estadística se centra en determinar si la frecuencia de la configuración TRANS supera de forma significativa a la frecuencia esperada por simple azar en una muestra de un  $n$  determinado. Dicha probabilidad se expresó como valor-p y se corresponde con el área a la derecha del estadístico  $z$  empleando la distribución normal (test de una cola, dado el enunciado de la hipótesis nula y alternativa). El estadístico  $z$  empleado fue el siguiente:

$$z = \frac{p - P}{\sqrt{\frac{P(1 - P)}{n}}}$$

En dicho estadístico,  $p$  es la frecuencia observada de TRANS,  $P$  es la frecuencia de TRANS propuesta por la hipótesis nula (0,50) y  $n$  es el número de cromosomas TRANS + CIS analizados. La aproximación de la binomial a la normal supone que se obtiene una distribución normal con media  $p$  y error estándar de +/-:

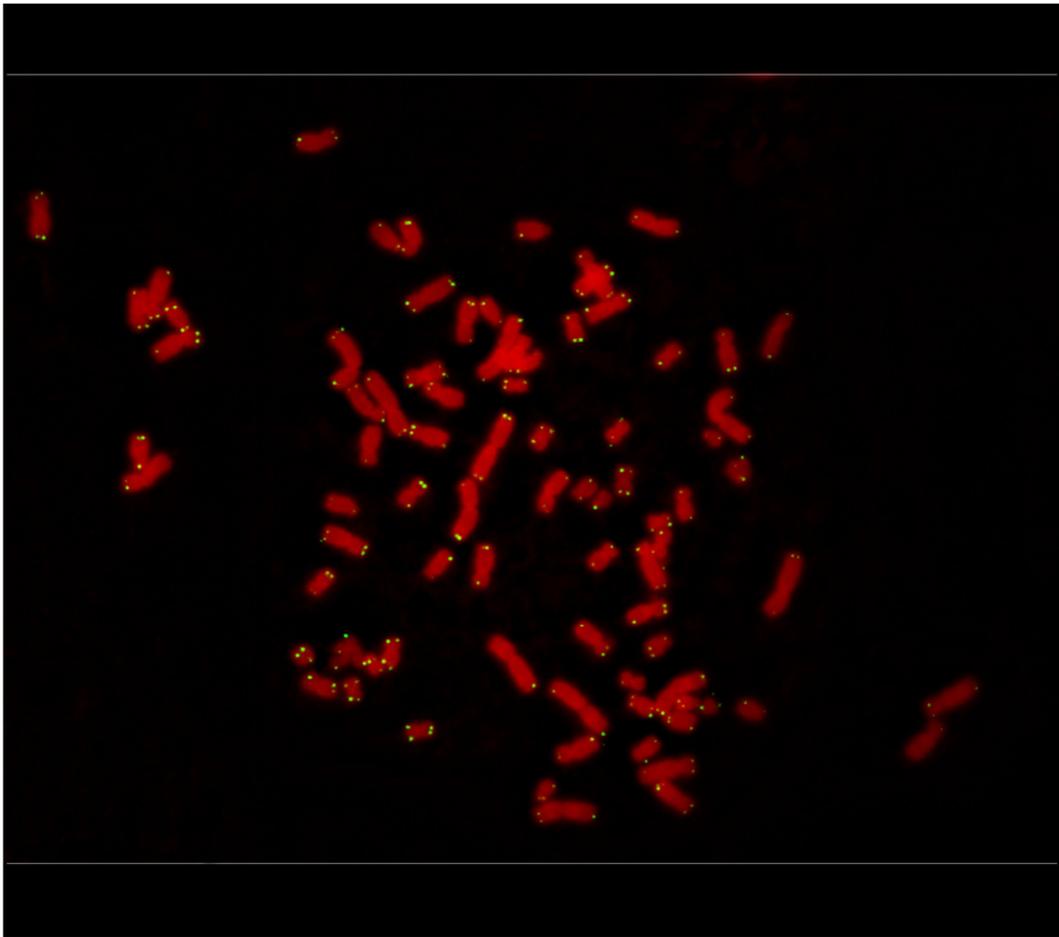
$$\sqrt{\frac{p(1 - \bar{p})}{n}}$$

En dicho cálculo del error estándar,  $p$  es la frecuencia de TRANS detectada en la muestra de  $n$  cromosomas (TRANS + CIS).

## V. RESULTADOS

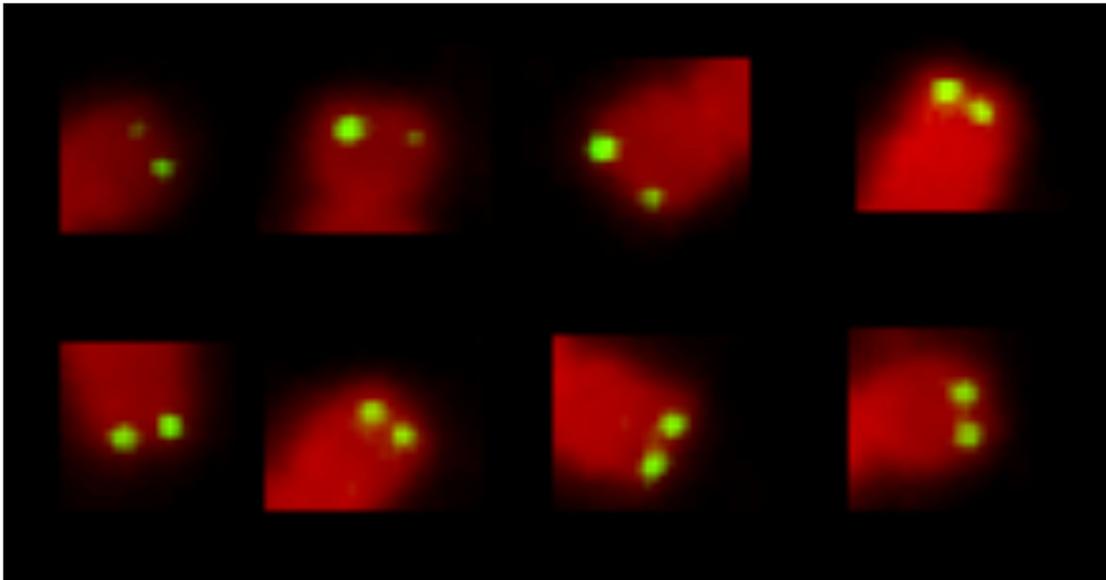
### V.1. *Estudio del patrón de distribución de la asimetría telomérica en ambos brazos de cromosomas HeLa y HL60 con FISH telomérico*

Se realizó FISH telomérico sobre extendidos cromosómicos de las líneas celulares HeLa y HL60 siguiendo el protocolo recomendado por la empresa fabricante del kit “Telomere PNA FISH Kit” (DAKO), a excepción de la sustitución de TBS por PBS (rehidratación y lavados) en gran parte de los experimentos realizados.



**Figura 13.-** Metafase de cromosomas humanos de la línea celular HeLa con FISH telomérico (sonda PNA conjugada con FITC, DAKO). Como se puede apreciar, las señales fueron de alta especificidad y se observó poco background. Claramente se puede constatar la presencia de señales asimétricas entre telómeros hermanos en varios cromosomas.

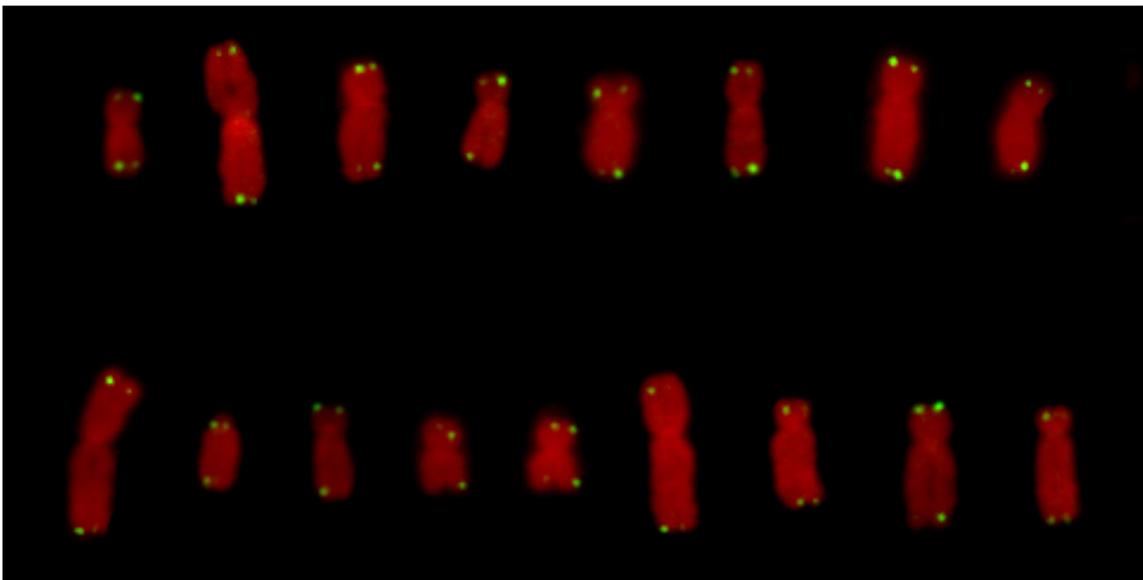
Se obtuvieron señales de FISH telomérico con alta especificidad (Fig. 13), pudiéndose detectar claramente un alto grado de asimetría en el tamaño de las señales fluorescentes entre telómeros hermanos, e incluso señales muy pequeñas o nulas en algunos extremos cromosómicos (Figs. 13 y 14). Esta variabilidad en la manifestación de las señales teloméricas en los cromosomas de HeLa y HL60 con la técnica de FISH telomérico DAKO fue mayor a la esperada.



**Figura 14.-** Ejemplos de asimetría (arriba) y simetría (abajo) entre cromátidas hermanas detectados mediante una elevada magnificación de la metafase de cromosomas HeLa con FISH telomérico presentada en la Figura 13.

Teniendo en cuenta el objetivo principal del presente trabajo, es decir evaluar si la asimetría telomérica presenta una distribución no aleatoria en ambos brazos cromosómicos, se decidió estudiar únicamente aquellos cromosomas que exhibieron una clara asimetría entre telómeros hermanos en los brazos cromosómicos p y q. Los casos en los que el mayor tamaño/intensidad de la señal telomérica correspondiente a cada brazo cromosómico se localizaba en cromátidas opuestas, fueron cuantificados como TRANS. Por el contrario, los cromosomas en los que el mayor tamaño/intensidad de la señal telomérica de ambos brazos cromosómicos se localizaba en la misma cromátida, se cuantificaron como CIS. Dado el alto nivel de asimetría observado en las líneas celulares HeLa y HL60, la identificación de las

configuraciones TRANS y CIS se efectuó mediante inspección visual a alta magnificación (zoom digital 2500%) con los programas *Image J* o *PaintShopPro (Corel)*. En la Figura 15 se presentan algunos ejemplos de cromosomas HeLa con una clara asimetría en ambos brazos exhibiendo patrones de distribución TRANS y CIS. Por tanto, para cada imagen de alta resolución obtenida mediante una cámara CCD y objetivo 63X (que podía incluir más de una metafase), se realizó el conteo de cromosomas según su correspondencia a cada una de las dos configuraciones previamente definidas (TRANS o CIS). Si la distribución de la asimetría telomérica fuera aleatoria serían esperables proporciones muy similares de las configuraciones TRANS y CIS.

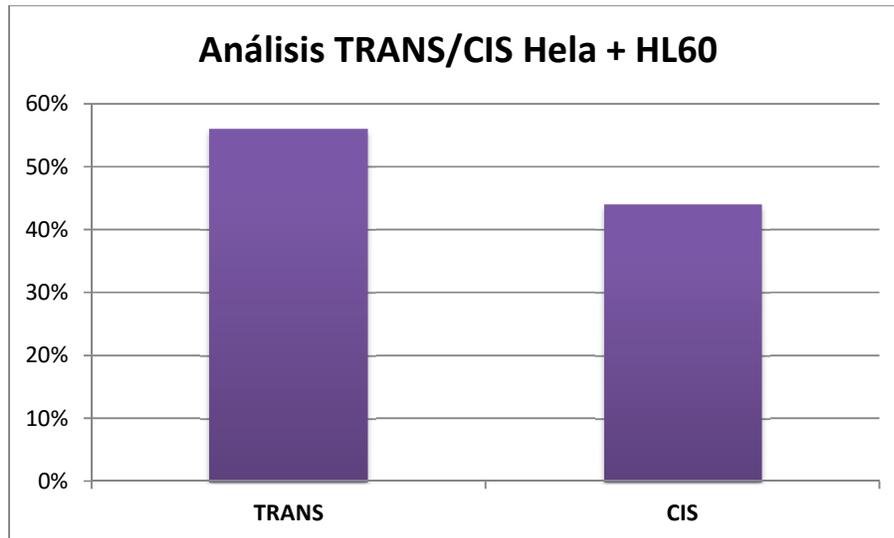


**Figura 15.-** Ejemplos de cromosomas HeLa con FISH telomérico presentando una clara asimetría entre telómeros hermanos en ambos brazos. Como se puede apreciar en la figura, en estos casos la mayor intensidad/tamaño de señal telomérica de cada par de telómeros hermanos (p y q) se puede localizar en cromátidas opuestas (TRANS, parte superior de la imagen) o en la misma cromátida (CIS, parte inferior de la imagen).

Los datos obtenidos del análisis de 1593 cromosomas de las líneas celulares HeLa y HL60 que presentaron en ambos brazos una alta asimetría en las señales de FISH telomérico entre cromátidas hermanas, evidenciaron que existe una leve tendencia a que las señales de mayor tamaño se localicen en una configuración TRANS (Tabla 1; Fig. 16).

**Tabla 1.-** Conteos de configuraciones TRANS y CIS en cromosomas HeLa y HL60 con FISH telomérico y con clara asimetría entre telómeros hermanos en ambos brazos. Se indica el número total de cromosomas contabilizados en cada caso y su porcentaje con respecto al total (TRANS + CIS). Se indica también el p-valor obtenido con el test estadístico de comparación de proporciones, confirmando que la diferencia es estadísticamente significativa con un nivel de confianza por encima del 95 %.

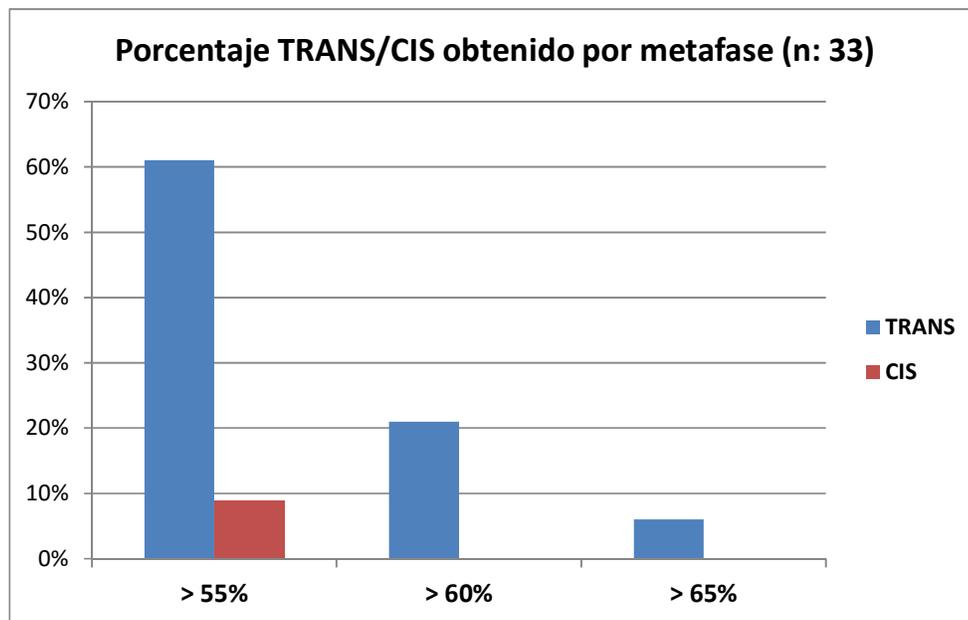
	<b>HeLa</b>	<b>HL60</b>
<b>TRANS</b>	587 (57%)	301 (54%)
<b>CIS</b>	448 (43%)	257 (46%)
<b>Total</b>	1035	558
<b>p-valor</b>	<0,0001	<b>0,0294</b>



**Figura 16.-** Comparación gráfica de los porcentajes TRANS (56%) y CIS (44%) obtenidos al analizar 1593 cromosomas de HeLa y HL60 con clara asimetría telomérica en ambos brazos. El error estándar calculado para esta muestra de frecuencia TRANS de 0,56 (56 %) es de 0,012 (1,2 %).

La configuración TRANS en las líneas celulares estudiadas se observó en el 56% de los cromosomas con asimetría telomérica en brazos p y q, siendo el 44% restante CIS. Es importante mencionar que la diferencia de 12% entre ambas configuraciones es estadísticamente significativa (n: 1593), y claramente se rechaza la hipótesis de una distribución aleatoria (p-valor < 0,0001, Test de proporciones).

Otro aspecto interesante surgió al considerar el porcentaje TRANS obtenido por cada metafase analizada. Si bien la mayoría de las mismas exhibieron un porcentaje total de configuración TRANS cercano al promedio detectado en el recuento total (56%), no era raro encontrar metafases con una proporción aún más alta de cromosomas TRANS, algo que no sucedió con la configuración CIS (Fig. 17).

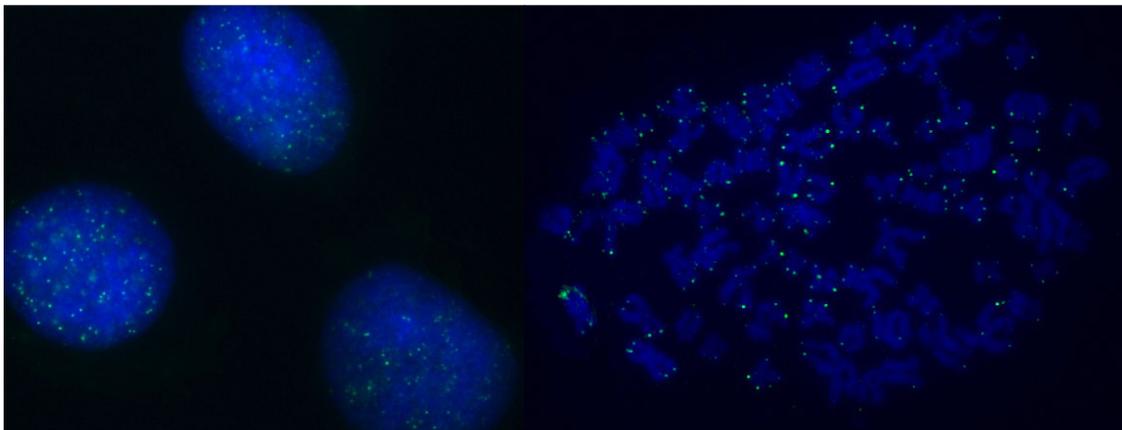


**Figura 17.-** Análisis de la tendencia TRANS vs CIS encontrada al analizar cada metafase. Se indican en el diagrama de barras el porcentaje de metafases que exhibieron una proporción TRANS/CIS superior a 55%, 60% y 65%. Como se puede apreciar, se detecta una clara tendencia a que la configuración TRANS supere a la CIS en los distintos puntos de corte considerados. Es importante destacar además la interesante proporción de metafases que manifiestan una proporción TRANS superior al 60%.

Esto reforzaría la idea de que la asimetría entre telómeros hermanos pueda presentar una distribución no aleatoria en ambos brazos cromosómicos, con las señales de mayor tamaño preferencialmente localizadas en cromátidas opuestas (TRANS) debido a un fenómeno biológico subyacente. No obstante, dada la alta variabilidad detectada en el FISH telomérico entre telómeros hermanos y entre distintas metafases, evidentemente no se puede descartar la ocurrencia simultánea de artefactos metodológicos.

## ***V.2. Detección de asimetría entre telómeros hermanos mediante inmunomarcación con anticuerpo anti-TRF2 en cromosomas de la línea celular HeLa***

El segundo objetivo específico del presente trabajo consistió en evaluar si se detecta en mitosis una distribución asimétrica entre telómeros hermanos de las señales de inmunomarcación de la proteína telomérica TRF2. Se efectuaron con este propósito pruebas con varios protocolos para intentar lograr marcaciones de inmunofluorescencia adecuadas con el anticuerpo anti-TRF2 (Abcam) en metafases de HeLa obtenidas mediante citocentrifugación. Si bien se obtuvieron buenas señales a nivel de núcleos interfásicos con alta frecuencia en cada preparado, fue muy difícil lograr buenas metafases con claras marcas teloméricas ya que la frecuencia de aparición de las mismas en el preparado era muy baja. A pesar de estas complicaciones metodológicas, se obtuvieron algunas imágenes adecuadas de inmunomarcaciones con el anticuerpo anti-TRF2 (Abcam) en núcleos interfásicos y metafases de HeLa mediante citocentrifugación (Fig. 18).



**Figura 18.-** Núcleos interfásicos y metafase obtenida mediante citocentrifugación de células HeLa con posterior inmunomarcación con anticuerpo anti-TRF2.

El análisis de imágenes de metafases con inmunomarcación de la proteína telomérica TRF2, también pudo evidenciar la presencia de un alto grado de asimetría entre telómeros hermanos. Si bien las condiciones experimentales no resultaron muy efectivas al considerar la inmunomarcación de metafases, un análisis de las señales obtenidas en cromosomas con

asimetría en ambos extremos pudo detectar que se observa una mayor frecuencia de la configuración TRANS respecto de la CIS (Tabla 2).

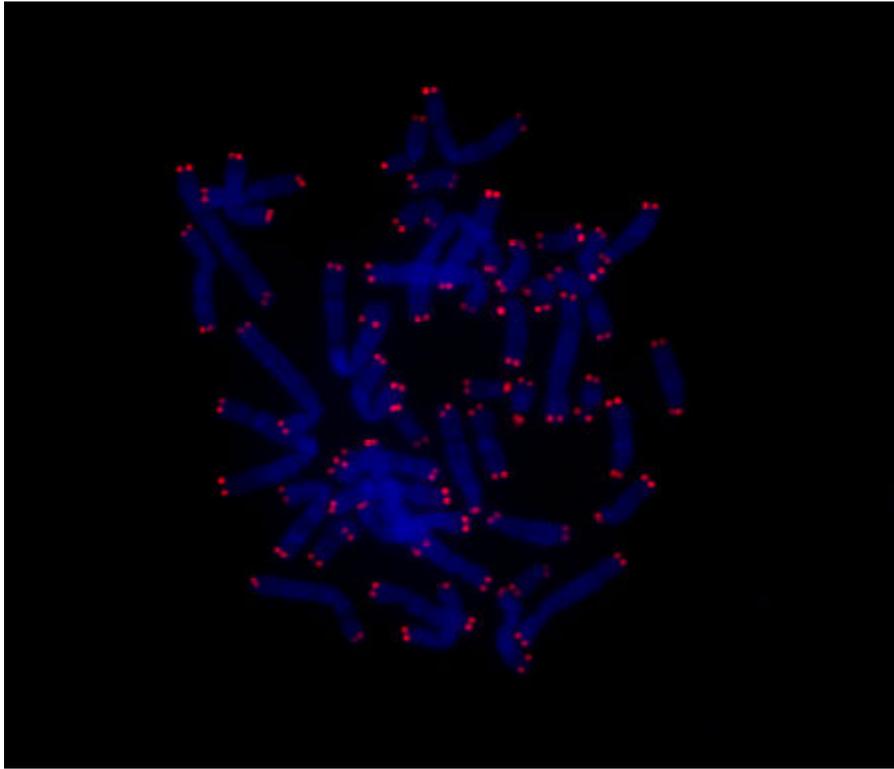
**Tabla 2.-** Conteos de configuraciones TRANS y CIS en cromosomas HeLa con inmunomarcación de TRF2 evidenciando asimetría entre telómeros hermanos en ambos brazos. Se indica el número total de cromosomas contabilizados en cada caso y su porcentaje con respecto al total (TRANS + CIS).

	<b>HeLa TRF2</b>
<b>TRANS</b>	193 ( <b>58%</b> )
<b>CIS</b>	140 ( <b>42%</b> )
Total	333

La diferencia de 16 % entre ambas configuraciones es estadísticamente significativa (n: 333), y nuevamente se rechaza la hipótesis de una detección aleatoria de la configuración TRANS (p-valor 0,0018, Test de proporciones).

### ***V.3. Análisis mediante programa TFL-Telo del patrón de distribución de la asimetría telomérica en ambos brazos de cromosomas de linfocitos humanos con Q-FISH telomérico***

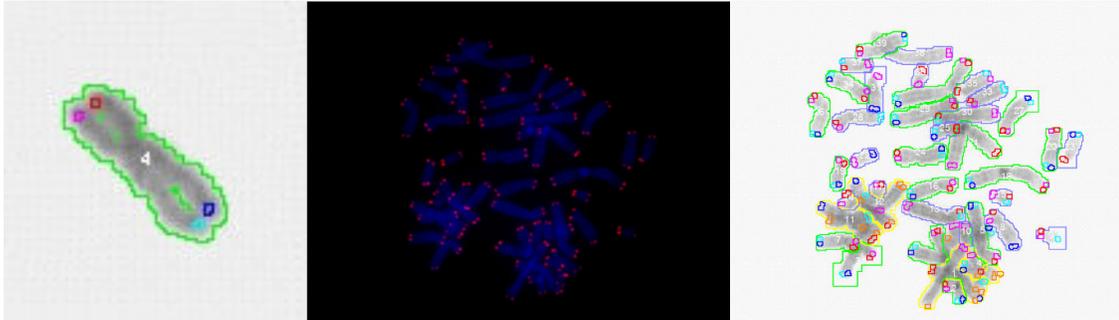
El FISH telomérico sobre extendidos cromosómicos de linfocitos humanos fue efectuado siguiendo un protocolo de Q-FISH telomérico ampliamente usado a nivel mundial, reportado incluso por autores que centraron su estudio en el análisis de las diferencias en las señales teloméricas entre cromátidas hermanas (por ej. Bekaert y cols., 2002). Dicho protocolo logró mejorar significativamente la calidad del FISH telomérico obtenido (Fig. 19).



**Figura 19.-** Ejemplo de metafase de linfocitos humanos con FISH telomérico (Sonda PNA DAKO Cy3) evidenciando la alta especificidad de la hibridación así como la elevada tasa de detección de telómeros por cromosoma (menor número de extremos sin señal). Sin embargo, al realizar una magnificación de la imagen se visualiza claramente la frecuente aparición de asimetría entre telómeros hermanos.

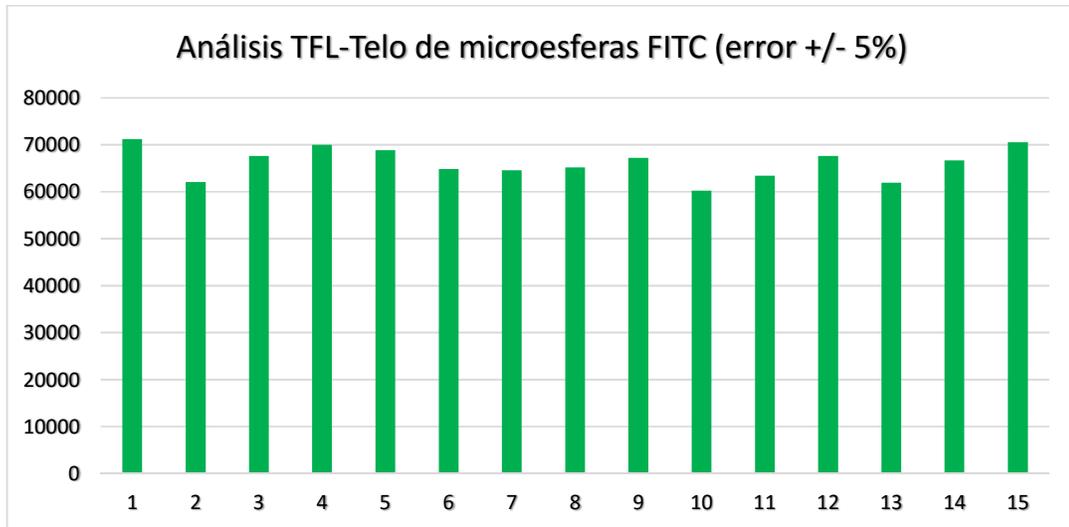
Para el análisis del Q-FISH telomérico de cromosomas de linfocitos humanos se utilizó el programa TFL-Telo, el cual está especialmente diseñado para el análisis cuantitativo de las intensidades de fluorescencia de los telómeros y fue desarrollado por el laboratorio “Terry Fox Laboratory of the British Columbia Research Centre” (Lansdorp y cols., 1996; Poon y cols., 1999). Como fue mencionado anteriormente, TFL-Telo permite detectar automáticamente la mayoría de los contornos de los cromosomas y determinar la intensidad total de cada uno de los telómeros (intensidad de fluorescencia total-IFI). El programa asigna un número a cada cromosoma e identifica con colores diferentes cada telómero de T1 a T4 (T1: magenta, T2: rojo, T3: cyan, T4: azul). La asignación de cada color a cada telómero por parte del programa no sigue un patrón específico dependiente de la estructura del cromosoma. Por tanto, para el análisis de la asimetría entre telómeros hermanos y su distribución con respecto a ambos brazos cromosómicos, fue necesario asignar un único criterio de nomenclatura de los telómeros por cromosoma. Se adoptó entonces el criterio expuesto a continuación: brazo p Tel izquierda (T1, magenta), brazo p Tel derecha (T2, rojo), brazo q Tel izquierda (T3, cyan), brazo q Tel derecha

(T4, azul). De esta manera, al exportar los datos resultantes a una tabla Excel quedaba establecida la siguiente correspondencia: las columnas de datos T1 y T2 pertenecían al brazo p, las columnas T3 y T4 al brazo q, teniendo en cuenta además que T1 y T3 se localizaban en la misma cromátida, ocurriendo lo mismo con T2 y T4 (Fig. 20).



**Figura 20.-** Análisis de Intensidades de fluorescencia total (IFI) de telómeros de cromosomas de linfocitos humanos con el programa TFL-Telo. Izquierda: Sentido seleccionado para la adjudicación de rótulos a cada telómero por cromosoma: brazo p Tel Izquierda (T1, magenta), brazo p Tel Derecha (T2, rojo), brazo q Tel Izquierda (T3, cyan), brazo q Tel Derecha (T4, azul). Centro: Metafase de cromosomas de linfocitos humanos con FISH telomérico previo al análisis con el programa TFL-Telo. Derecha: Imagen obtenida luego del laborioso posicionamiento de los rótulos de cada telómero en el sentido indicado previamente con el programa TFL-Telo, donde se indica con un número cada cromosoma detectado por el programa y los telómeros detectados en cada uno.

Previo al análisis del Q-FISH telomérico, como control de la metodología se evaluó con el programa TFL-Telo la Intensidad de fluorescencia total (IFI) obtenida con microesferas de 6  $\mu\text{m}$  marcadas con FITC (Kit Calibraite, BD) a lo largo del campo (63X) de la imagen capturada con la cámara CCD acoplada al microscopio utilizado. La fluorescencia relativa cuantificada con dicho programa fue altamente estable en los distintos puntos del campo capturado, indicando un correcto ajuste de microscopio de epifluorescencia así como de su sistema de captura fotográfica digital (Fig. 21). Si bien pueden haberse detectado mínimas variaciones porque las microesferas no estaban completamente adheridas al portaobjetos, el promedio de fluorescencia relativa obtenido y su correspondiente error fueron aceptables. En este sentido, y considerando igualmente algún problema con el plano focal debido a la decantación de las microesferas, es importante mencionar que la diferencia máxima detectada entre el valor de fluorescencia más alto y el más bajo fue cercano al 14 %.



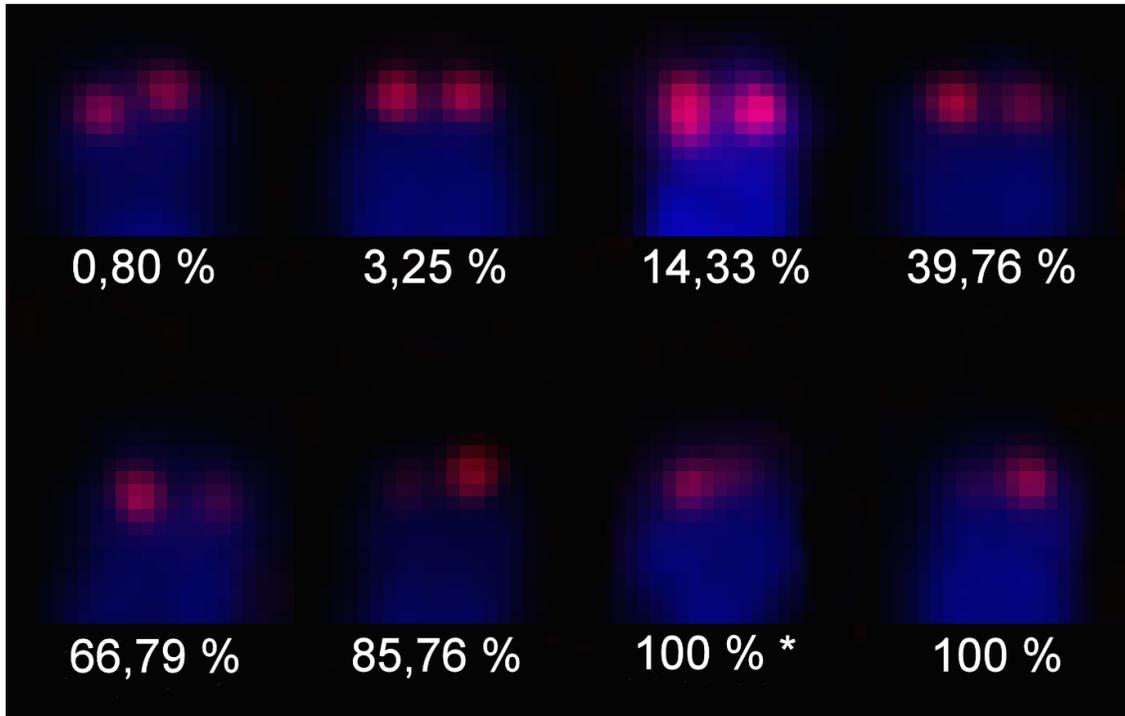
**Figura 21.-** Histograma de la intensidad de fluorescencia total (IFI) obtenido al analizar con el programa TFL-Telo 15 microesferas de 6  $\mu\text{m}$  conjugadas con FITC. El promedio de fluorescencia fue 66133 (unidades relativas), con un desvío estándar de 3207 (4,85 % de diferencia con respecto al promedio). Se puede apreciar la elevada homogeneidad de la fluorescencia relativa detectada.

La aplicación del programa TFL-Telo para el estudio de cromosomas de linfocitos humanos con Q-FISH telomérico, pudo revelar a partir del análisis de 1708 telómeros (854 pares de telómeros hermanos), que el nivel promedio de asimetría observado fue de **43%** y que presenta un amplio rango de variación (Tabla 3). Cabe mencionar que a nivel global no se registraron diferencias en el porcentaje promedio de asimetría entre los telómeros hermanos del brazo p y del brazo q respectivamente, ya que en ambos casos este resultado fue cercano al promedio general.

**Tabla 3.-** Nivel promedio de asimetría detectado en linfocitos humanos con Q-FISH telomérico y otros parámetros estadísticos obtenidos del análisis del total de telómeros considerados en el presente estudio.

<b>Promedio Asimetría:</b>	<b>43%</b>
<b>Desvío Estándar:</b>	<b>33%</b>
<b>Coefficiente de Variación (CV):</b>	<b>75%</b>
<b>Rango:</b>	<b>0,08%-100%</b>
<b>Mediana:</b>	<b>35%</b>

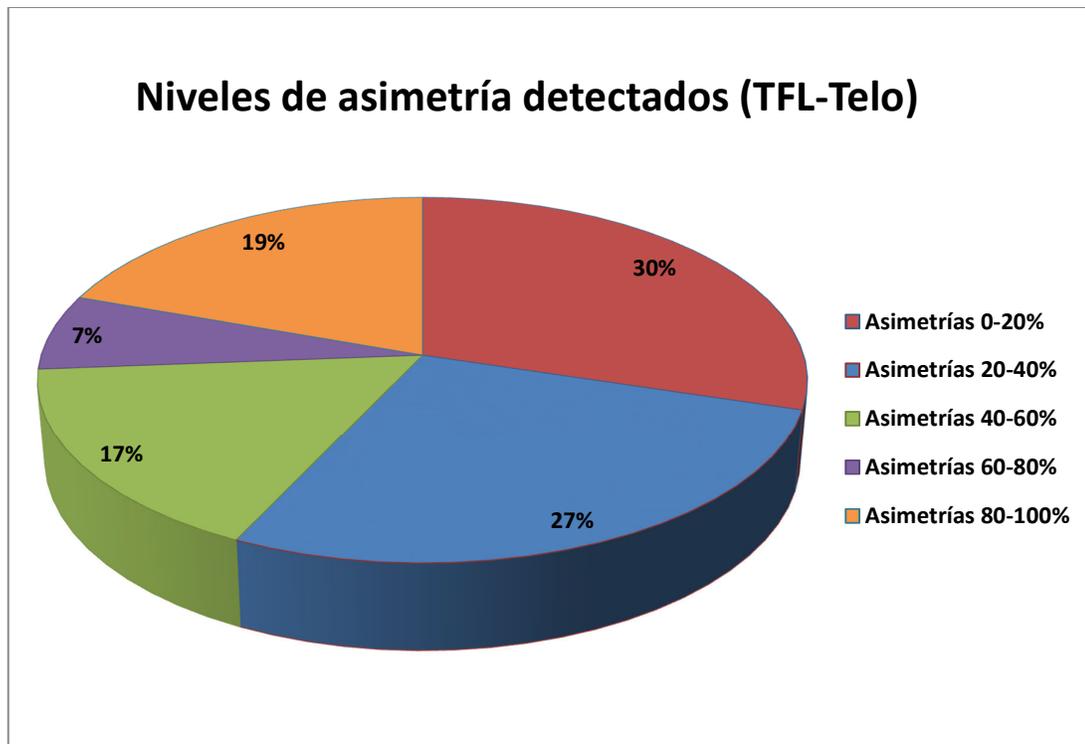
En la Figura 22 se presentan algunos ejemplos de distintos niveles de simetría/asimetría detectados entre telómeros hermanos de linfocitos humanos con su correspondiente imagen de Q-FISH telomérico utilizada en el programa TFL-Telo.



**Figura 22.-** Ejemplos de simetría/asimetría entre telómeros hermanos de linfocitos humanos con Q-FISH telomérico y posterior análisis con programa TFL-Telo. Se muestran imágenes obtenidas con la sonda telomérica PNA Dako (Cy3) y una contratinción con DAPI, indicando debajo de cada ejemplo el nivel de simetría/asimetría obtenido con el posterior análisis de los datos exportados por el programa. La asimetría de 100% marcada con un asterisco es para indicar un caso particular donde el programa TFL-Telo no identifica ambos telómeros hermanos, quedando automáticamente con una asimetría del 100%. A pesar de este inconveniente, es importante mencionar que en casos así, el nivel de asimetría y su posición con respecto a ambas cromátidas hermanas, fue muy evidente. Se descartaron todos los casos con límites de cromosomas y de telómeros poco claros o confusos, luego del análisis con el programa TFL-Telo.

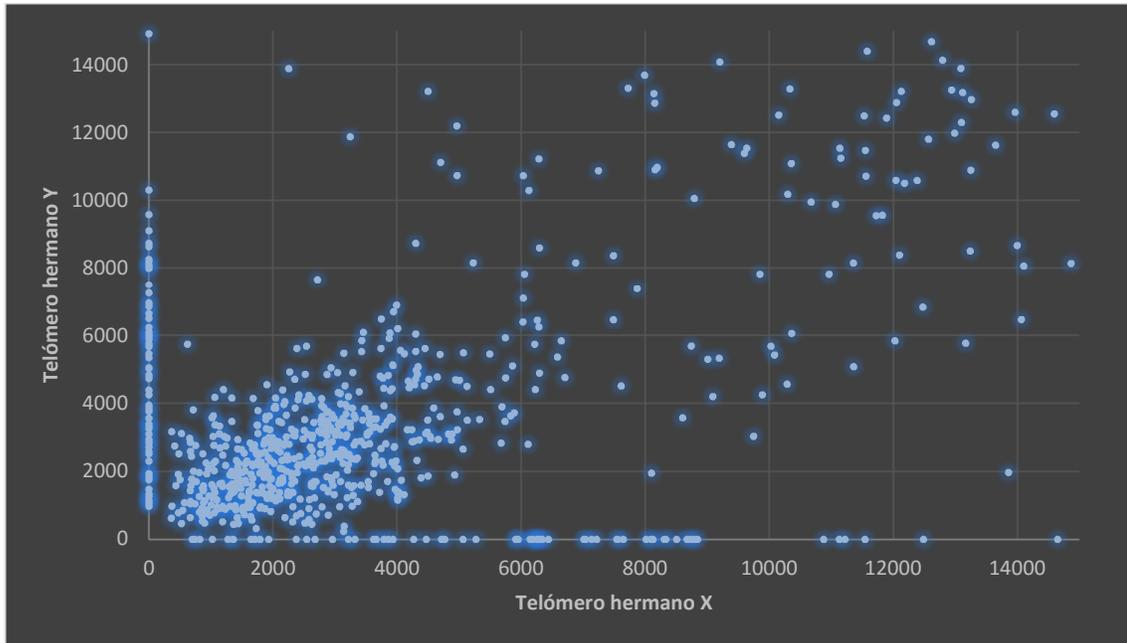
Como se puede apreciar en la Figura 22, se observó una alta heterogeneidad en los distintos niveles de asimetría detectados, algo que se refleja en el promedio total de asimetría y desvío estándar obtenidos. Esto último se visualiza más claramente al considerar la frecuencia de aparición de los distintos niveles de asimetría cuantificados (Rango: 0,08%-100%) al

analizar 854 pares de telómeros hermanos de linfocitos humanos con Q-FISH telomérico (Fig. 23).



**Figura 23.-** Frecuencia de aparición de los distintos niveles de simetría/asimetría detectados en la intensidad de fluorescencia de las señales de telómeros hermanos con FISH telomérico luego de analizar 854 pares de telómeros hermanos con el programa TFL-Telo. Como se puede apreciar en el gráfico, la categoría de asimetrías de 80 a 100% podría estar sobreestimada dado que en este estudio se incluyeron casos de asimetría extrema donde el programa era incapaz de identificar ambos telómeros quedando toda la señal cuantificada solo a un telómero hermano.

Posteriormente se analizó la correlación entre telómeros hermanos considerando las intensidades relativas de fluorescencia obtenidas con el programa TFL-Telo, incluyendo casos de asimetrías extremas (100%). Evidentemente al incluir estos casos, que no son incluidos comúnmente en la literatura especializada, el coeficiente  $R^2$  resultante es muy bajo 0,18 (Fig. 24).



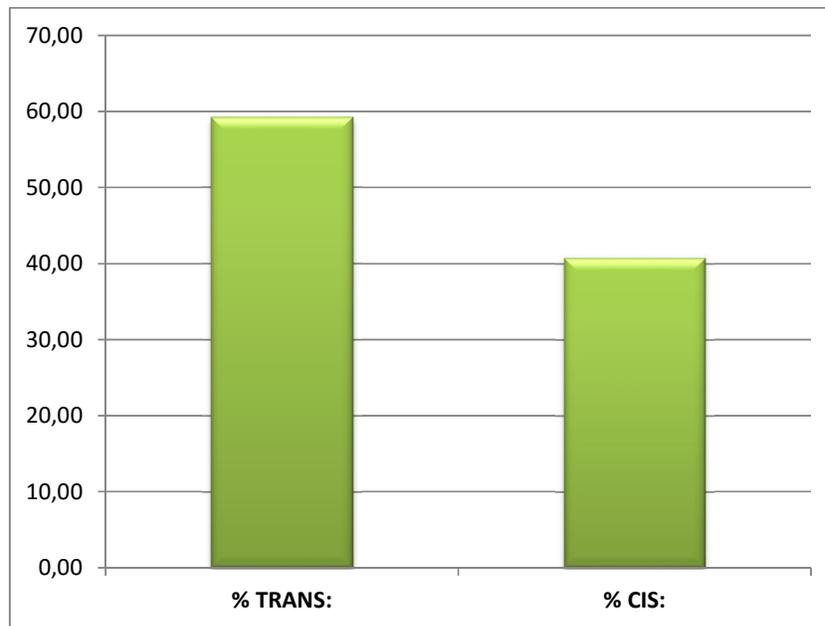
**Figura 24.-** Gráfico de correlación entre telómeros hermanos obtenido al considerar las intensidades relativas de fluorescencia con el programa TFL-Telo. Como se puede apreciar en el gráfico, es elevado el número de pares de telómeros hermanos que exhibieron altos niveles de asimetría y de pares que resultaron 100% asimétricos (puntos en respectivos ejes).

Como se presenta en el la Figura 24, las señales entre telómeros hermanos varían de forma muy estocástica, manifestando distintos niveles de asimetría. El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar si dicha asimetría presenta una distribución aleatoria o no al considerar cromosomas con asimetría en ambos brazos. En particular se realizó un detallado análisis de la distribución de las señales teloméricas de mayor intensidad en cada brazo cromosómico obtenidas con el programa TFL-Telo, con el propósito de evaluar si existe una preferencia por una configuración TRANS o CIS. A tales efectos se diseñó una planilla Excel altamente compleja (Fig. 25) para estudiar los datos exportados por el programa TFL-Telo respecto a la presencia de simetría/asimetría y determinar automáticamente los conteos TRANS/CIS para cada campo analizado. Al importar los datos del programa TFL-Telo en una hoja de Excel nueva, se copiaban las columnas de datos T1 y T2 (telómeros hermanos del brazo p) junto con las columnas T3 y T4 (telómeros hermanos del brazo q). Cabe recordar que se posicionaron los rótulos de cada telómero con el programa TFL-Telo para que los datos de T1 y T3, así como los de T2 y T4 se correspondieran a una misma cromátida respectivamente. De esta manera, al cargar los datos a la tabla Excel representada en la Figura 25, automáticamente se cuantificaba el nivel de asimetría entre telómeros hermanos así como la presencia o no de



**Tabla 4.-** Conteos de configuraciones TRANS y CIS en cromosomas de linfocitos humanos con FISH telomérico empleando el programa TFL-Telo. Se indica el número total de cromosomas contabilizados en cada caso y su porcentaje con respecto al total (TRANS + CIS). Se indica también el p-valor obtenido con el test estadístico de comparación de proporciones, confirmando que la diferencia es estadísticamente significativa con un nivel de confianza por encima del 95 %.

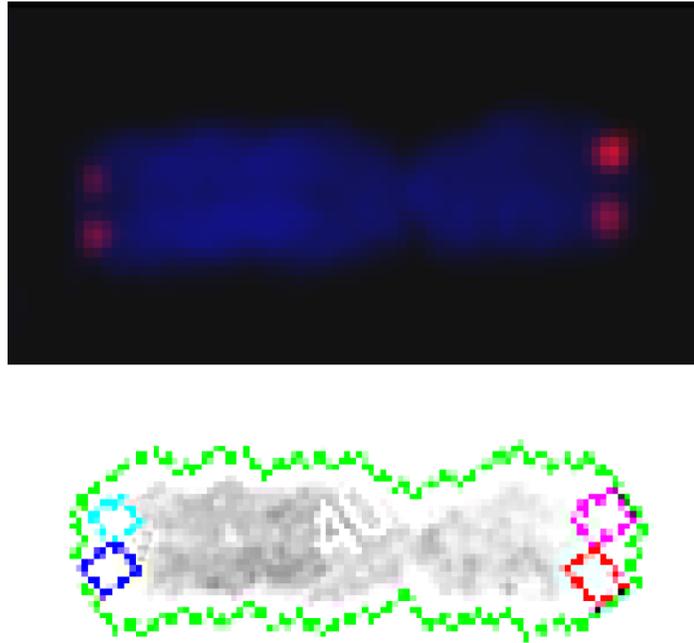
	<b>Linfocitos humanos</b>
<b>TRANS</b>	154 (59%)
<b>CIS</b>	106 (41%)
<b>Total</b>	260
<b>p-valor</b>	<b>0,0019</b>



**Figura 26.-** Comparación gráfica de las proporciones TRANS y CIS detectadas en cromosomas de linfocitos humanos con Q-FISH telomérico. El error estándar calculado para esta muestra de frecuencia TRANS de 0,59 (59 %) es de 0,031 (3,1 %).

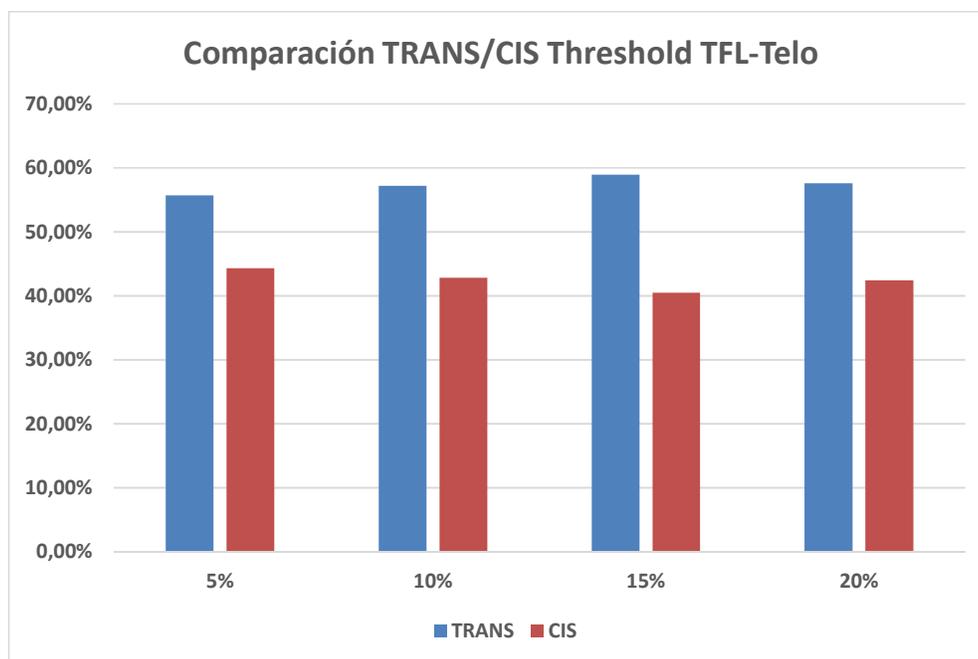
Como se puede apreciar claramente en la Figura 26 y en la Tabla 4, la diferencia observada en la frecuencia de aparición de las configuraciones TRANS y CIS es estadísticamente significativa, reforzando la posibilidad de que la asimetría entre telómeros

hermanos pueda tener una distribución no aleatoria en ambos brazos cromosómicos con una marcada tendencia a exhibir una configuración TRANS (Fig. 27).



**Figura 27.-** Cromosoma de linfocitos humanos con clara asimetría telomérica en ambos brazos cromosómicos y configuración TRANS, según el análisis cuantitativo efectuado con el programa TFL-Telo. Se detectó un nivel de asimetría en el brazo p de 35,43% y en el brazo q de 50,69%. Como se puede apreciar, las mayores intensidades de la señales de la sonda telomérica en cada brazo están localizadas en cromátidas opuestas (configuración TRANS).

Es importante mencionar que la configuración TRANS superó a la distribución CIS considerando además otros criterios semi-cuantitativos para distinguir las asimetrías de las simetrías a partir de los datos del programa TFL-Telo (Fig. 28).



**Figura 28.-** Histograma de comparación que muestra que TRANS supera a CIS en varios criterios semi-cuantitativos considerados para identificar las asimetrías de las simetrías a partir de los datos del programa TFL-Telo. En todos los casos la diferencia observada fue estadísticamente significativa ( $p$ -valor  $< 0,01$ ).

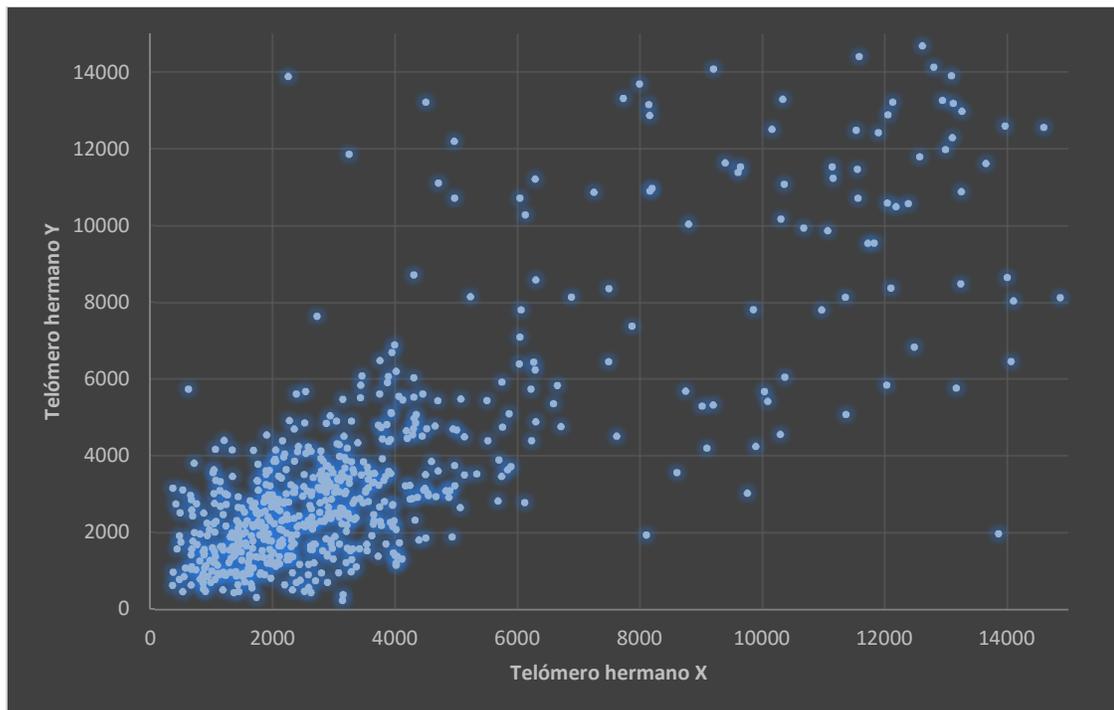
Para descartar la posibilidad de que los telómeros con 100% de asimetría considerados en el presente análisis sean producto únicamente de artefactos metodológicos e interfieran con los resultados del presente estudio, se excluyeron los mismos y se re-analizaron todos los datos, aun teniendo en cuenta la posibilidad de que el número total de cromosomas obtenido fuera menor.

El re-análisis de los datos de linfocitos humanos obtenidos con TFL-Telo quitando pares de telómeros hermanos con asimetría extrema (100%) resultó, como era de esperar, en un promedio total de asimetría entre telómeros hermanos levemente inferior (**31%**, Tabla 5), el cual fue obtenido a partir del análisis de 1404 telómeros (702 pares de telómeros hermanos).

**Tabla 5.-** Nivel promedio de asimetría detectado en linfocitos humanos con Q-FISH telomérico al excluir del estudio casos de asimetría extrema (100%). Se indican además otros parámetros estadísticos obtenidos en dicho análisis.

<b>Promedio Asimetría:</b>	<b>31%</b>
<b>Desvío Estándar:</b>	<b>21%</b>
<b>Coefficiente de Variación (CV):</b>	<b>68%</b>
<b>Rango:</b>	<b>0,08%-92,32%</b>
<b>Mediana:</b>	<b>28%</b>

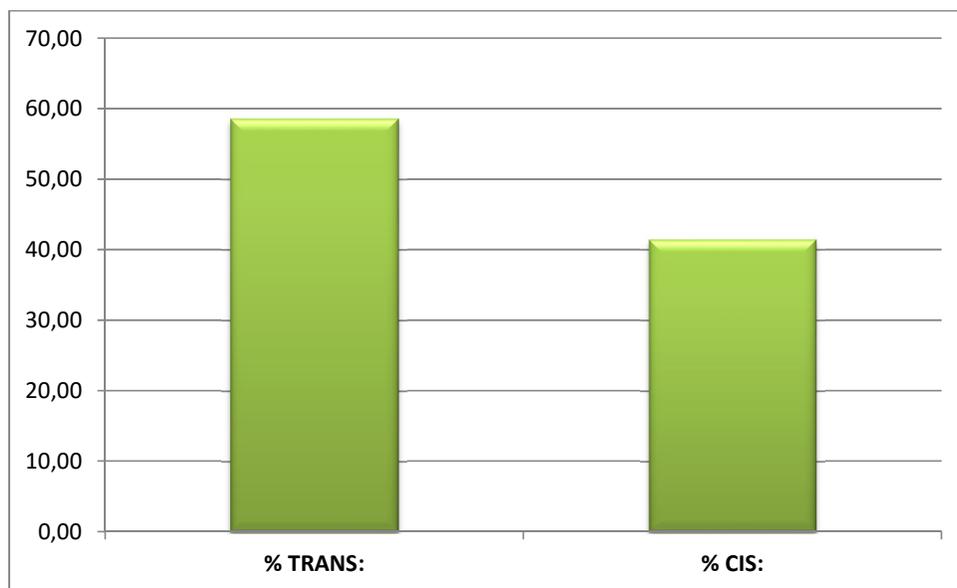
Al igual que se hizo con los datos primarios, se analizó el nivel de correlación entre telómeros hermanos al considerar las intensidades de fluorescencia relativa obtenidas con TFL-Telo pero descartando los casos de asimetrías extremas (100%). Como era de esperar, el coeficiente  $R^2$  obtenido fue notoriamente superior (0,70, Fig. 29).



**Figura 29.-** Correlación obtenida al graficar las intensidades de fluorescencia de 1404 telómeros con señales de FISH telomérico efectivamente detectadas por el programa TFL-Telo y descartando casos de asimetría extrema (100%). Como se puede apreciar en el gráfico, el nivel de correlación de los 702 pares

de telómeros hermanos aumenta ( $R^2$ : 0,70) pero igualmente se detecta un elevado número de pares de telómeros hermanos exhibiendo asimetrías.

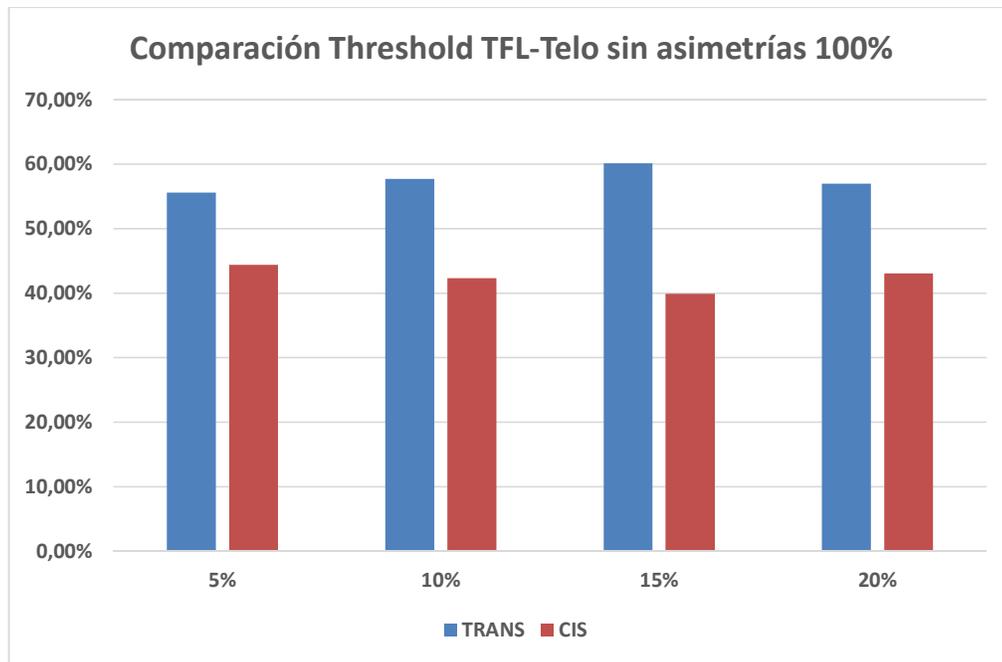
El re-análisis de los datos obtenidos con TFL-Telo a partir de 427 cromosomas de linfocitos humanos con FISH telomérico, descartando en esta oportunidad los casos con asimetría extrema (100%), contabilizó 152 cromosomas que presentaron asimetría en ambos brazos (considerando el criterio semi-cuantitativo de asimetría como diferencia  $\geq 15\%$  en la intensidad relativa de señal entre telómeros hermanos). Al considerar exclusivamente los 152 cromosomas con asimetría en ambos brazos, se pudo constatar que el 58,55% presentaba una configuración TRANS, confirmando claramente la tendencia de distribución no aleatoria de las diferencias detectadas entre telómeros hermanos e indicando que la inclusión de casos de 100% de asimetría no altera significativamente el conteo TRANS/CIS (Fig. 30).



**Figura 30.-** Comparación gráfica de las proporciones TRANS y CIS detectadas en cromosomas de linfocitos humanos con Q-FISH telomérico, luego de excluir casos de 100% de asimetría telomérica. Es importante mencionar que la diferencia entre ambas proporciones (TRANS 59%, CIS 41%) es estadísticamente significativa ( $p$ -valor: 0,013). El error estándar calculado para esta muestra de frecuencia TRANS de 0,59 (59 %) es de 0,040 (4,0 %).

Al igual que con los datos obtenidos inicialmente donde se incluyeron casos de 100% de asimetría telomérica, en el análisis posterior llevado a cabo sin considerar estos niveles de asimetría extremos, la configuración TRANS superó a la distribución CIS incluso al emplear

diferentes criterios semi-cuantitativos para detectar asimetrías a partir de la información exportada por el programa TFL-Telo (Fig. 31).

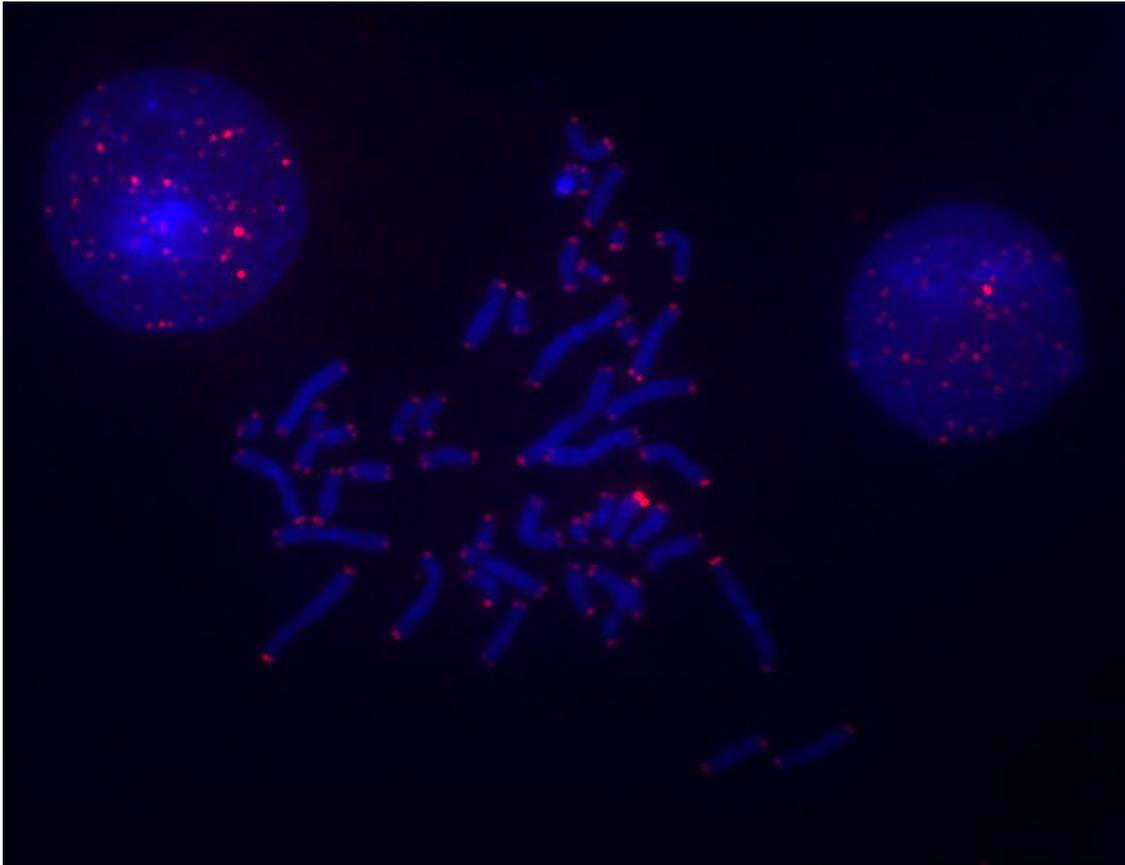


**Figura 31.-** Histograma de comparación que muestra que TRANS supera a CIS excluyendo casos de 100% de asimetría e incluso al considerar otros criterios semi-cuantitativos para diferenciar asimetrías de simetrías a partir de los datos del programa TFL-Telo. Los valores-p obtenidos para cada punto de corte fueron los siguientes: 0,0318 (5%), 0,0129 (10%), 0,0069 (15%) y 0,0603 (20%). A excepción del punto de corte 20% donde el número total de cromosomas fue bajo para la proporción TRANS obtenida, en el resto de los casos la diferencia observada de TRANS sobre CIS fue estadísticamente significativa a un nivel de confianza de al menos 95%.

#### ***V.4. Detección mediante FISH telomérico de un caso de “mega-telómero” en un cromosoma del grupo D***

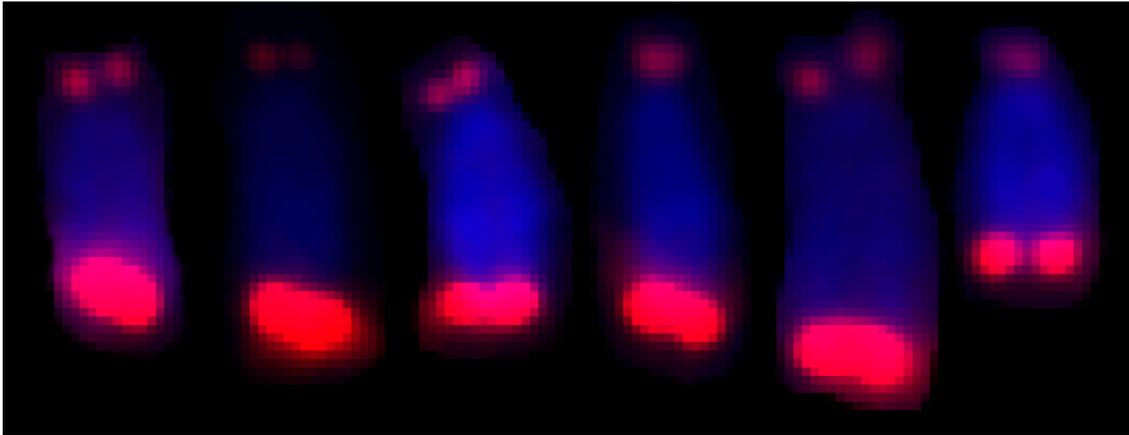
Como parte del estudio de FISH telomérico sobre cromosomas de linfocitos humanos, se detectó la presencia de una señal extremadamente intensa y extensa correspondiente a los telómeros del brazo q de un cromosoma del grupo D de un donante que accedió participar del presente trabajo.

La señal de dicho “mega-telómero” es tan intensa que puede detectarse directamente el cromosoma portador mediante microscopía de epifluorescencia con un objetivo 63X (Fig. 32).



**Figura 32.-** Metafase de cromosomas de linfocitos humanos de una persona normal con Q-FISH telomérico, evidenciando un claro “mega-telómero” en uno de los cromosomas del grupo D. Se puede apreciar claramente la diferencia en la intensidad de fluorescencia con el resto de los telómeros de la metafase.

Este caso es particularmente interesante porque no hemos constatado el reporte de un “mega-telómero” de similares características mediante FISH telomérico en la bibliografía. Al tratarse de una persona normal, dicha observación podría corresponder a un polimorfismo en la cantidad de ADN, significando un considerable aumento en la cantidad de ADN telomérico (Fig. 33).



**Figura 33.-** Ejemplos del “mega-telómero” detectado en el brazo q de un cromosoma del grupo D en una persona normal evidenciando un particular polimorfismo en la longitud del ADN telomérico. Nótese la enorme diferencia en el tamaño/intensidad de las señales fluorescentes teloméricas entre el brazo p y q.

Llamativamente no se pudo detectar la presencia de asimetría extrema (ausencia de señal en uno de los extremos) entre “mega-telómeros” hermanos luego de analizar 34 cromosomas del grupo D portadores de dicho polimorfismo. En muy pocos casos se pudo observar un cierto grado de asimetría al efectuar una gran magnificación de la imagen obtenida de la metafase con FISH telomérico (zoom digital 2500%).

## VI. DISCUSIÓN

### ***VI.1. Detección de una distribución no aleatoria de la asimetría telomérica en los brazos p y q de cromosomas de las líneas celulares HeLa, HL60 y de linfocitos humanos con FISH telomérico, evidenciando una clara tendencia a la configuración TRANS***

El análisis de las imágenes de FISH telomérico de cromosomas de las líneas celulares HeLa y HL60, así como de linfocitos humanos, evidenció un elevado nivel de asimetría en las señales de FISH telomérico entre telómeros hermanos. Dicho fenómeno fue fácilmente detectado en todas las metafases analizadas. En los casos del FISH telomérico de HeLa y HL60, la asimetría fue mayor a la esperada (Figs. 13 y 14). Cabe recordar que en estas líneas celulares se empleó el protocolo del Kit de la Sonda Telomérica DAKO. Si bien este protocolo se utiliza con cierta frecuencia para realizar Q-FISH telomérico, no es el más empleado para tal fin. Sin embargo, el diseño del kit es correcto y funciona adecuadamente, en términos de especificidad de la hibridación de la sonda. En este sentido, no se puede descartar que alguna propiedad de estas líneas celulares continuas, como por ejemplo la acción de la enzima telomerasa, influyera en el nivel de asimetría detectado. Por otra parte, en el caso de los cromosomas de linfocitos humanos, se realizó la técnica de Q-FISH telomérico siguiendo un protocolo ampliamente usado a nivel mundial, reportado incluso por autores que dirigieron su estudio al análisis de las diferencias en las señales teloméricas entre cromátidas hermanas (ej. Bekaert y cols., 2002). Dicho protocolo aplicado en cromosomas de linfocitos humanos, logró mejorar significativamente la calidad del FISH telomérico obtenido (Fig. 19). Igualmente, al analizar de forma detallada cada imagen fue frecuente constatar la presencia de asimetrías entre telómeros hermanos (Fig. 22).

Al emplear el programa TFL-Telo para analizar las intensidades relativas de fluorescencia de las señales de FISH telomérico en cromosomas de linfocitos humanos, se pudo constatar un nivel promedio de asimetría entre cromátidas hermanas de entre el 31% y 43% (Tablas 3 y 4), incluyendo en el valor más elevado pares de telómeros hermanos que según el programa presentaron un 100% de asimetría. Es importante mencionar que estos casos de asimetría extrema son comúnmente excluidos del análisis de Q-FISH telomérico, pero debido a que este trabajo se centró en el estudio de la asimetría se decidió incluirlos en el análisis. Los

datos obtenidos evidenciaron un amplio rango de niveles de asimetría telomérica, detectándose un elevado número de casos en las categorías de mayores diferencias entre las señales de ambos telómeros hermanos (Fig. 23).

El principal objetivo del presente trabajo consistió en estudiar si la asimetría observada entre telómeros hermanos se debe únicamente al azar (producto de variaciones originadas por la metodología), o si por el contrario exhibe un patrón de distribución no aleatorio. En cromosomas con asimetría en ambos brazos, los telómeros con mayor intensidad de cada uno pueden localizarse de dos maneras diferentes: en cromátidas opuestas (configuración TRANS) o en una misma cromátida (configuración CIS) (Fig. 15). Si la asimetría entre telómeros hermanos se originara únicamente debido a variaciones metodológicas, se esperaría que las proporciones de TRANS/CIS sean iguales entre sí y similares a las esperadas por el azar (50%), y en caso de existir diferencias, las mismas no deberían poseer significación estadística. Luego del análisis con FISH telomérico de cromosomas HeLa, HL60 y de linfocitos humanos que evidenciaron asimetría en ambos brazos, se detectó que las proporciones de las configuraciones TRANS y CIS no fueron iguales y de hecho difirieron significativamente de lo esperado por azar, detectándose una clara tendencia a la superioridad de la configuración TRANS sobre la CIS (Figs. 16 y 26). Es importante mencionar que se observó el mismo fenómeno en cromosomas de linfocitos humanos excluyendo del análisis casos de asimetría extrema (100%) detectados por el programa TFL-Telo (Fig. 30), indicando que dichos casos no alteran el patrón de distribución obtenido. Por otra parte, distintos criterios semi-cuantitativos fueron considerados para discriminar las asimetrías de las simetrías con el programa TFL-Telo, obteniendo en los distintos casos resultados similares tanto en el análisis global de datos como en el resultante de la exclusión de asimetrías extremas (100%) (Figs. 28 y 31). De esta manera, el presente estudio pudo revelar por primera vez que la asimetría detectada con FISH telomérico entre telómeros hermanos presenta una distribución no aleatoria en ambos brazos cromosómicos, con una clara tendencia a una configuración en TRANS de las altas intensidades de cada par de telómeros p y q (Fig. 27).

A su vez, mediante inmunomarcación de la proteína telomérica TRF2 también se logró detectar asimetría entre telómeros hermanos en cromosomas de la línea celular HeLa, y si bien la marcación obtenida en metafases no fue óptima, se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa a favor de la configuración TRANS en los casos de asimetría en ambos brazos cromosómicos (Tabla 2).

Por último como parte del análisis de Q-FISH telomérico en cromosomas de linfocitos humanos se observó la presencia de un “mega-telómero” en el brazo q de un cromosoma del grupo D correspondiente a un donante voluntario de una muestra de sangre periférica para el presente trabajo. El contenido de ADN telomérico en ese cromosoma es tan elevado que su identificación en el microscopio de epifluorescencia fue extremadamente rápida y sin requerir la ayuda de ningún programa de procesamiento digital de imágenes (Fig. 32). Al igual que existen polimorfismos de regiones de heterocromatina constitutiva evidenciadas por bandeado C (Craig-Holmes y cols., 1973), es posible que este caso sea un ejemplo muy particular de polimorfismo de la longitud del ADN telomérico. Llamativamente, no se pudo detectar la presencia de asimetría extrema (ausencia de señal en uno de los extremos) entre “mega-telómeros” hermanos luego de analizar 34 cromosomas del grupo D que evidenciaban dicho aumento de ADN telomérico en el brazo q (Fig. 33). En muy pocos casos se pudo detectar un cierto grado de asimetría al efectuar una gran magnificación de la imagen (zoom digital 2500%).

## ***VI.2. Importancia y cuestionamientos del Q-FISH telomérico sobre cromosomas metafásicos: alta sensibilidad vs alta variabilidad entre cromátidas hermanas***

La longitud del ADN telomérico se encuentra muy involucrada en los procesos de senescencia celular, cáncer y síndromes de envejecimiento prematuro. Además varias investigaciones han demostrado que los efectos oxidativos del estrés crónico, del humo de tabaco y de la obesidad, producen una mayor velocidad de acortamiento del ADN telomérico (Epel y cols., 2004; Valdes y cols., 2005). Por tanto, en los últimos años la medición del tamaño telomérico se ha convertido en una herramienta sumamente importante para la investigación biomédica en pacientes con cáncer o síndromes de envejecimiento prematuro (Svenson y Roos, 2009). El Q-FISH es una de las técnicas más empleadas para la estimación de la longitud del ADN telomérico, dado que presenta un alto nivel de sensibilidad estimado en aproximadamente 200 pb, permitiendo la detección de telómeros extremadamente cortos (Martens y cols., 1998). Esto es sumamente importante, dado que se ha reportado que la frecuencia de aparición de telómeros muy cortos es mejor indicador de una disfunción telomérica que la estimación del

contenido total de ADN telomérico de cada célula (Hemann y cols., 2001; Samper y cols., 2001; Deng y cols., 2003; Morrish y Greider, 2009).

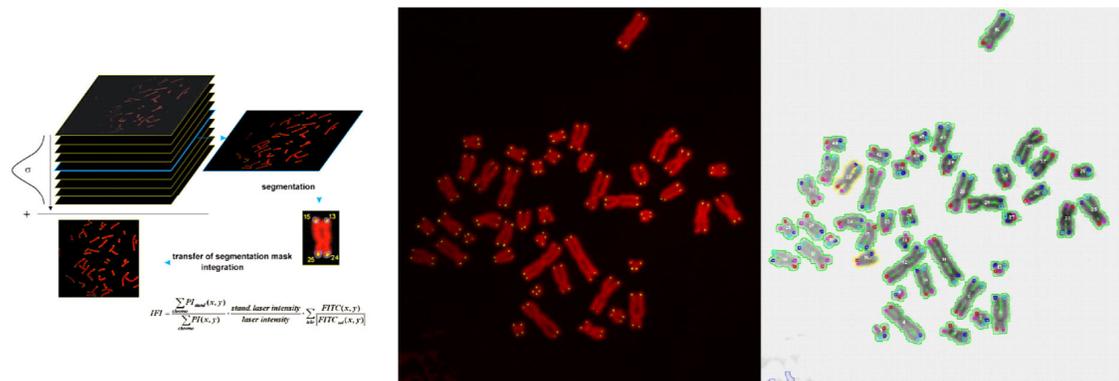
Uno de los parámetros más usados para indicar la validez o evaluar la eficiencia del Q-FISH telomérico ha sido considerar el coeficiente de determinación/correlación ( $R^2$ ) obtenido al comparar las intensidades de fluorescencia relativa entre telómeros hermanos al analizar un alto número de eventos, para evaluar si existe una relación lineal positiva. En el primer reporte sobre la técnica del Q-FISH telomérico, Lansdorp y cols. (1996) obtuvieron un coeficiente  $R^2$  de 0,71 en cromosomas humanos. En un detallado análisis mediante microscopía confocal 3D de la asimetría detectada en cromosomas de linfocitos humanos con FISH telomérico, Bekaert y cols. (2002) detectaron un coeficiente  $R^2$  de 0,797 entre las señales teloméricas de ambas cromátidas hermanas. Cabe mencionar que todos estos estudios fueron realizados considerando los valores obtenidos de la cuantificación de las señales de ambos telómeros hermanos a través de un programa especializado, excluyendo casos de 100% de asimetría. Teniendo en cuenta esto último, resulta interesante destacar que en el presente estudio el coeficiente  $R^2$  obtenido a partir del gráfico de correlación entre telómeros hermanos, sin incluir casos de 100% de asimetría (0,70; Fig. 29), fue bastante similar al reportado en cromosomas humanos por Lansdorp y cols. en 1996 (0,71) y Bekaert y cols. en 2002 (0,797). Si bien al analizar un alto número de pares de telómeros hermanos se observa una cierta correlación, queda en evidencia igualmente la importante proporción de casos con asimetría. En este sentido, es importante mencionar que cuando se incluyeron en la presente investigación casos de asimetría extrema (100%), donde la señal de la sonda telomérica prácticamente era detectada en su totalidad en una única cromátida por parte del programa TFL-Telo, el coeficiente  $R^2$  obtenido entre telómeros hermanos, como era de esperar, cayó drásticamente (0,18, Fig. 24).

La alta asimetría detectada entre telómeros hermanos evidencia la gran contradicción de la técnica del Q-FISH telomérico. Se ha establecido que el nivel de sensibilidad de esta metodología es de aproximadamente 200 pb (Martens y cols., 1998). De esta manera, en caso de una adecuada hibridación y aun teniendo en cuenta posibles diferencias en la generación de los extremos 3' saliente de cada telómero hermano, que estarían muy cerca del límite de resolución del Q-FISH, los telómeros de cada cromátida hermana deberían tener señales de FISH prácticamente similares (simétricas). Sin embargo, la técnica que presenta una gran sensibilidad para la detección de telómeros pequeños, manifiesta una enorme variabilidad entre cromátidas hermanas. Esto ha sido reportado por varios autores que demostraron la frecuente

existencia de diferencias significativas (asimetrías) en la intensidad de fluorescencia de las señales teloméricas de ambas cromátidas hermanas en cada metafase analizada (Lansdorp y cols., 1996; Bekaert y cols., 2002; Perner y cols., 2003; de Pauw y cols., 2005; Cukusic y cols., 2014).

### ***VI.3. Asimetrías entre telómeros hermanos con Q-FISH telomérico: hipótesis reportadas en la bibliografía especializada para explicar el alto nivel de variabilidad detectada con dicha técnica***

El principal estudio hasta el momento sobre las diferencias observadas con FISH telomérico entre cromátidas hermanas, fue publicado en *Cytometry* por Bekaert y cols. en 2002. Efectuaron un extenso estudio estadístico de imágenes obtenidas mediante análisis tridimensional (3D) con microscopía confocal, descartando que las asimetrías teloméricas se deban a variaciones del plano focal y problemas de índole metodológico. A su vez no detectaron ninguna relación entre la aparición de asimetría y un par cromosómico en particular. Sugirieron, por primera vez, que un fenómeno biológico podría estar implicado (Bekaert y cols., 2002) (Fig. 34).



**Figura 34.-** Izquierda: Resumen del complejo análisis mediante microscopía confocal (3D) para el estudio de las diferencias encontradas en las señales de FISH telomérico entre cromátidas hermanas (modificado de Bekaert y cols., 2002). Centro: Copia de alta resolución de la Figura 5 de dicho artículo que fue gentilmente cedida al Dr. Máximo Drets dada la similitud con las observaciones de asimetrías con Bando T. La imagen fue obtenida mediante microscopía confocal y se corresponde a una metafase con FISH telomérico de linfocitos humanos. Derecha: Análisis efectuado con el programa TFL-Telo siguiendo el mismo protocolo del presente estudio con el fin de evaluar la distribución de las señales

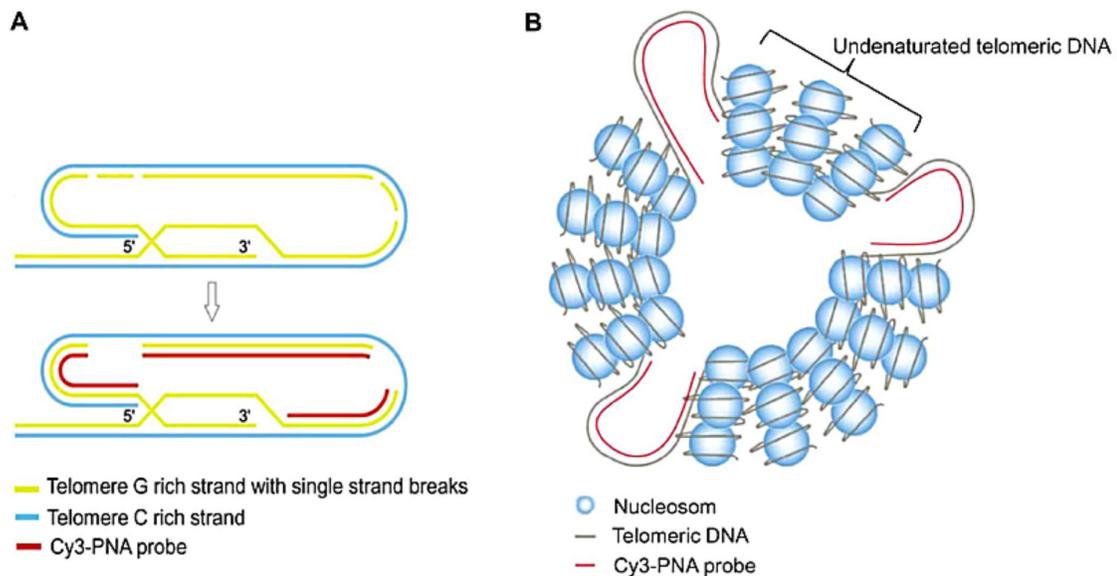
teloméricas de mayor intensidad en casos de cromosomas con asimetría en ambos brazos (p y q). Es importante destacar que la misma evidenció un porcentaje de la configuración TRANS de 66,67%.

Por otra parte, tres años después y nuevamente en *Cytometry*, de Pauw y cols. (2005), publicaron un trabajo muy interesante sobre las posibles causas de la asimetría telomérica que se refleja en el título de dicho artículo: “*Studying the Biological and Technical Sources of Variation in Telomere Length of Individual Chromosomes*” (Estudiando las Causas Técnicas y Biológicas de la Variación en el Tamaño Telomérico de Cromosomas Individuales). Dicho estudio, realizado con sondas teloméricas PNA DAKO, toma como modelo las longitudes de los cromosomas X e Y de padres e hijos. Determinaron que la longitud telomérica del brazo largo del cromosoma Y es heredada, indicando que la variabilidad en el FISH telomérico no se origina por eventos de recombinación desigual entre telómeros hermanos (de Pauw y cols., 2005). Los autores resaltan la efectividad del Q-FISH para cuantificar la longitud telomérica y concluyen que la alta variabilidad detectada parecería ser “intracelular” (entre telómeros hermanos) y por tanto, según ellos, de naturaleza técnica.

Recientemente, en el año 2014 Cukusic y colaboradores publicaron en *PlosOne* un artículo centrado casi exclusivamente en las diferencias detectadas entre telómeros hermanos con Q-FISH telomérico, demostrando mediante un análisis matemático que la técnica aporta resultados confiables. De hecho, estos aspectos contradictorios de la técnica de Q-FISH telomérico fueron incluso mencionados en el título de dicho trabajo: “*Telomere Q-PNA-FISH: Reliable Results from Stochastic Signals*” (Q-PNA-FISH Telomérico: Resultados Confiables a partir de Señales Estocásticas). Si bien este estudio es de una calidad analítica notoriamente inferior al de Bekaert y cols. (2002), se destaca igualmente la alta tasa de diferencias detectadas entre telómeros hermanos que según los autores son endógenas a todas las células normales y claramente de origen metodológico. Lo interesante de este artículo es que por primera vez se plantean con claridad algunas hipótesis que puedan explicar la alta variabilidad observada con FISH telomérico, postulando dos modelos por los cuales la hibridación de la sonda telomérica PNA no sería la adecuada.

El primer modelo de Cukusic y cols. (2014) plantea la posibilidad de una marcación incompleta de la hebra rica en G con la sonda telomérica PNA que, justamente debido a su diseño, hibrida específicamente a dicha hebra. Dado que ha sido reportado que el ADN telomérico con secuencias TTAGGG es bastante susceptible al daño por estrés oxidativo que

induce la aparición de rupturas de simple cadena preferencialmente en la hebra rica en G, ellos proponen que el “agresivo” pretratamiento de la técnica de Q-FISH telomérico podría causar dichas rupturas en la hebra rica en G. De esta manera, fragmentos de la hebra rica en G podrían perderse en los procesos de desnaturalización y/o lavados posteriores al FISH, reduciendo las dianas posibles de la sonda telomérica PNA y por tanto evidenciando menores intensidades de las señales en el FISH resultante (Fig. 35, A).



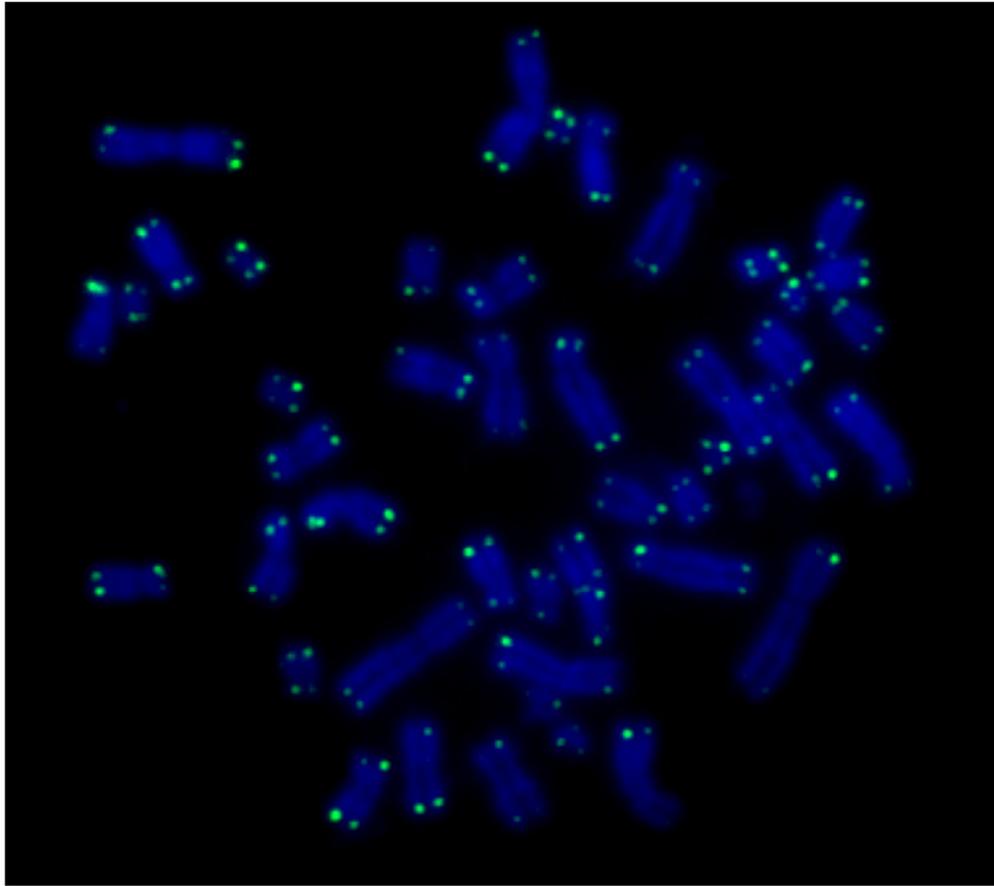
**Figura 35.-** Modelos A y B propuestos por Cukusic y cols. (2014). El modelo A considera la posibilidad de la generación de rupturas simple-hebra en la hebra rica en G (sustrato de la sonda PNA) a causa del estrés oxidativo que puede originar el pre-tratamiento, desnaturalización y lavados del Q-FISH telomérico. Los fragmentos que sufrieron rupturas serían liberados en la desnaturalización y lavados, disminuyendo la cantidad de ADN telomérico al cual puede hibridar la sonda PNA. Por otra parte, el modelo B considera las complejas estructuras de mayor orden que se nuclean en los telómeros, que involucran posiblemente a la cromatina telomérica y a nucleosomas cercanos. Este modelo propone que estas estructuras condensadas de la compleja cromatina sub/telomérica podría desnaturalizarse de forma diferencial, lo cual podría generar importantes dificultades para la correcta hibridación de la sonda telomérica en toda la extensión del ADN telomérico. Modificado de Cukusic y cols., 2014.

El segundo modelo de Cukusic y cols. (2014), surge de la observación de que los cromosomas metafásicos mantienen relativamente su integridad luego de realizarse el “agresivo” procesamiento del Q-FISH telomérico, destacándose que los mismos no sólo no se

deterioran sino que mantienen en tal grado su estructura que incluso permite su correcta identificación. De esta manera, proponen que la hibridación de la sonda en estructuras teloméricas condensadas de los cromosomas metafásicos es mucho menos efectiva, debido a algunas de las siguientes posibles causas: a) dificultad en el acceso de la proteinasa al interior de complejas estructuras cromosómicas y consecuentemente la disminución de su eficiencia de digestión; b) desnaturalización diferencial del ADN telomérico debido a la presencia de estructuras de mayor orden y/o complejos de nucleosomas, que dificulten la hibridación de la sonda telomérica justamente en las regiones cercanas a los extremos cromosómicos (Fig. 35, B). Finalmente, estos autores mencionan que en ambos modelos A y B, también podría ocurrir una interferencia de la hibridación por la formación de estructuras tipo cuarteto de guaninas (“*G-quartet*”) que teóricamente pueden generarse en los procesos de re-naturalización del ADN telomérico (Phan y Mergny, 2002).

Tanto el modelo A como el modelo B postulados por Cukusic y cols. (2014) podrían explicar en principio la aparición de asimetrías entre telómeros hermanos únicamente como parte de “fallas” de la metodología. Ambos modelos propuestos serían además de manifestación únicamente estocástica, ya que según estos autores la alta frecuencia de asimetrías entre telómeros hermanos no se debe a un fenómeno biológico real sino que se debería a la ineficiente hibridación de la sonda telomérica PNA (Cukusic y cols., 2014).

En nuestra opinión el Modelo A propuesto por Cukusic y cols. (2014) sería inicialmente el más difícil de sostener dado que solo explica fallas de hibridación de sondas teloméricas PNA, y no considera que también se detectan claras asimetrías empleando sondas teloméricas ADN (doble hebra). En la Figura 36 se incluye un ejemplo de FISH telomérico realizado con una sonda telomérica ADN sobre linfocitos humanos en el marco del presente estudio, que evidencia claramente la aparición de asimetría telomérica.



**Figura 36.-** Cromosomas metafásicos de linfocitos humanos obtenidos en el presente estudio con FISH telomérico de una sonda ADN marcada con dUTP-Biotina (detectada con Avidina-Alexa 488). Dicha sonda, gentilmente cedida por Marion Cremer, fue generada por PCR mediante la amplificación de *primers* (TTAGGG)<sub>5</sub>/(AATCCC)<sub>5</sub> y posterior *Nick Translation* para la incorporación de dUTP-Biotina, obteniendo así fragmentos de aproximadamente 300 pb de repetidos TTAGGG. El mix de hibridación, los lavados posteriores a la misma y la inmunomarcación para la detección de Biotina se realizaron siguiendo las instrucciones del protocolo de FISH optimizado por parte del grupo de Thomas Cremer (Cremer y cols., 2008). El pretratamiento y desnaturalización de los extendidos cromosómicos se realizó de igual manera que el protocolo de Q-FISH telomérico empleado en linfocitos humanos (ver Materiales y Métodos). Como se puede apreciar en la imagen, claramente se detectan cromosomas con asimetría entre telómeros hermanos.

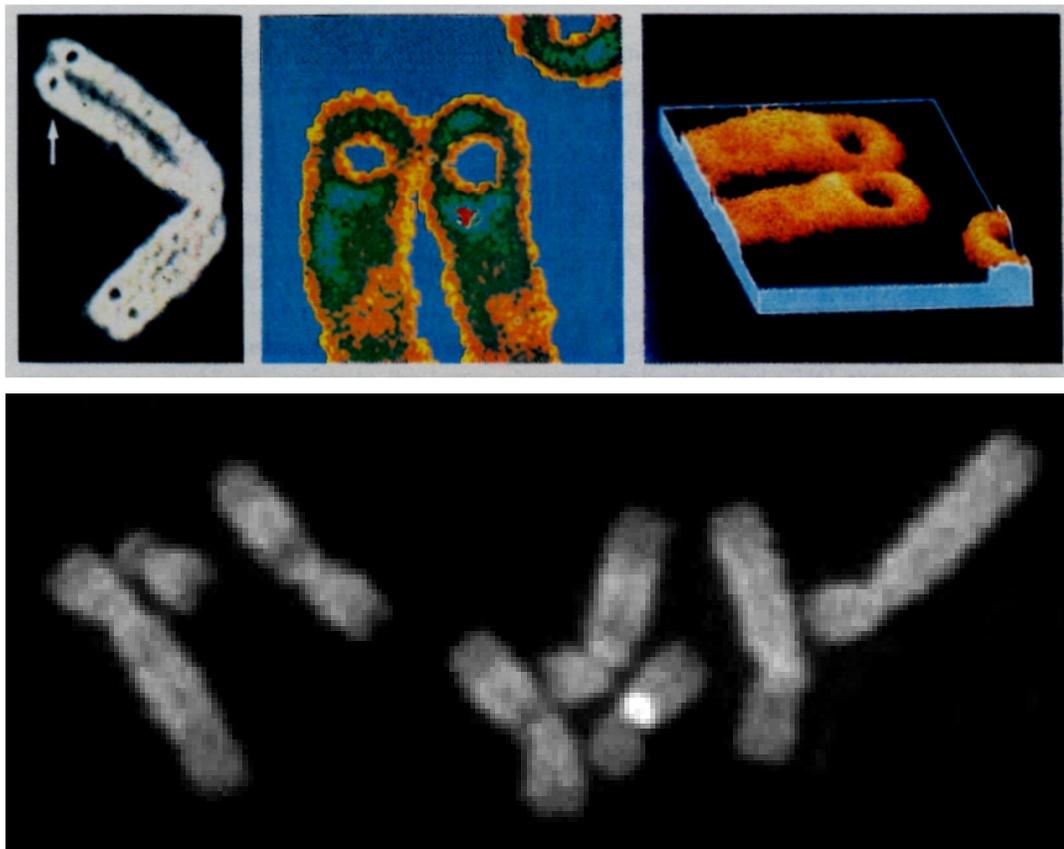
De esta manera, en base a estudios previos basados en cromosomas con bandeo T que se detallan a continuación, nosotros nos inclinamos por el modelo B propuesto por Cukusic y cols. (2014), dado que la alta complejidad de la cromatina sub/telomérica podría generar dificultades para la total desnaturalización del ADN telomérico ocasionando así una

disminución de la hibridación de las sondas teloméricas PNA con respecto al total del ADN telomérico potencialmente detectable por la técnica de FISH.

#### ***VI.4. Particularidades citológicas de la compleja región cromosómica terminal***

La región cromosómica terminal presenta una elevada complejidad estructural. Mediante microscopia electrónica estos segmentos cromosómicos se observan como una compacta agregación de filamentos (Jack y cols., 1986; Allen y cols., 1988), lo que refleja la compleja asociación subyacente del ADN con las proteínas características de la región y podría ser la causa de su elevada resistencia a la digestión por endonucleasas (Ludeña y cols., 1991). Además, varias observaciones citológicas han mostrado que los telómeros de muchos organismos eucariotas son heterocromáticos (Lima-De-Faria, 1952; Dernburg y cols., 1995), afectando en muchos casos la expresión de genes adyacentes. Este fenómeno denominado efecto de posición del telómero (*Telomere Position Effect*), ha sido descrito en varias especies desde levaduras a humanos (Baur y cols., 2001).

A su vez, los extremos cromosómicos exhiben una gran cantidad de particularidades citológicas que evidencian su alta complejidad y diferente organización/composición respecto al resto del cromosoma. La región cromosómica terminal es altamente resistente a la desnaturalización por calor como ha sido demostrado por la técnica de Bando T (Dutrillaux, 1973). Sin embargo, llamativamente la prolongación del tiempo de incubación de cromosomas humanos y de CHO en el buffer de bando T induce pequeños orificios en la región subtelomérica (Drets y cols., 1992b; Drets y cols., 1995). La razón de esta extracción específica de la cromatina sub/telomérica es aún desconocida. Teniendo en cuenta la detección de orificios en las regiones sub/teloméricas luego de una excesiva desnaturalización en buffer de Bando T caliente (87 °C), se consideró la posibilidad de que dicho fenómeno pudiera ser uno de los motivos de la ausencia/disminución de señales de FISH telomérico entre cromátidas hermanas, ya que el Q-FISH telomérico comparte un proceso de desnaturalización a una temperatura bastante similar (80°C). Al analizar varias imágenes de cromosomas HeLa, HL60, y de linfocitos humanos del presente estudio, no se detectaron dichos agujeros sub/teloméricos al considerar la imagen de Ioduro de Propidio o DAPI (Fig. 37).



**Figura 37.-** Arriba: Ejemplos de agujeros sub-teloméricos detectados con microscopía de reflexión (izquierda) y mediante microfotometría de la tinción con Giemsa de cromosomas sobredesnaturalizados en el buffer caliente (87 °C) de bandeó T (Centro y Derecha) (Modificado de Drets y cols., 1995). Abajo: Cromosomas de linfocitos humanos obtenidos en el presente estudio teñidos con DAPI luego de realizarse el FISH telomérico. Como se puede apreciar, no se visualizan agujeros sub-teloméricos.

Previo a la completa desnaturalización de los extremos cromosómicos para producir esos llamativos orificios sub/teloméricos, y con una significativa disminución del tiempo de incubación en dicho buffer fosfato-ácido cítrico (pH 5,1) a 87 °C, se obtiene Bando T (Dutrillaux, 1973). En los casos de un bandeó adecuado se obtienen, luego de la coloración con Giemsa, cromosomas teñidos en forma débil excepto en las regiones terminales, donde la tinción es intensa. Probablemente la riqueza relativa en pares de bases GC junto con la particular composición de la cromatina sub/telomérica, sean factores que confieren a esta región una elevada resistencia a la desnaturalización térmica.

El análisis microdensitométrico computacional de microfotografías de alta resolución de cromosomas con bandeado T, ha permitido identificar que en cada banda T hay áreas más intensamente teñidas (de mayor densidad) que se distribuyen frecuentemente de manera asimétrica entre ambas cromátidas hermanas, tanto en cromosomas humanos como en los de la línea celular CHO (Drets y cols., 1992a) (Fig. 9).

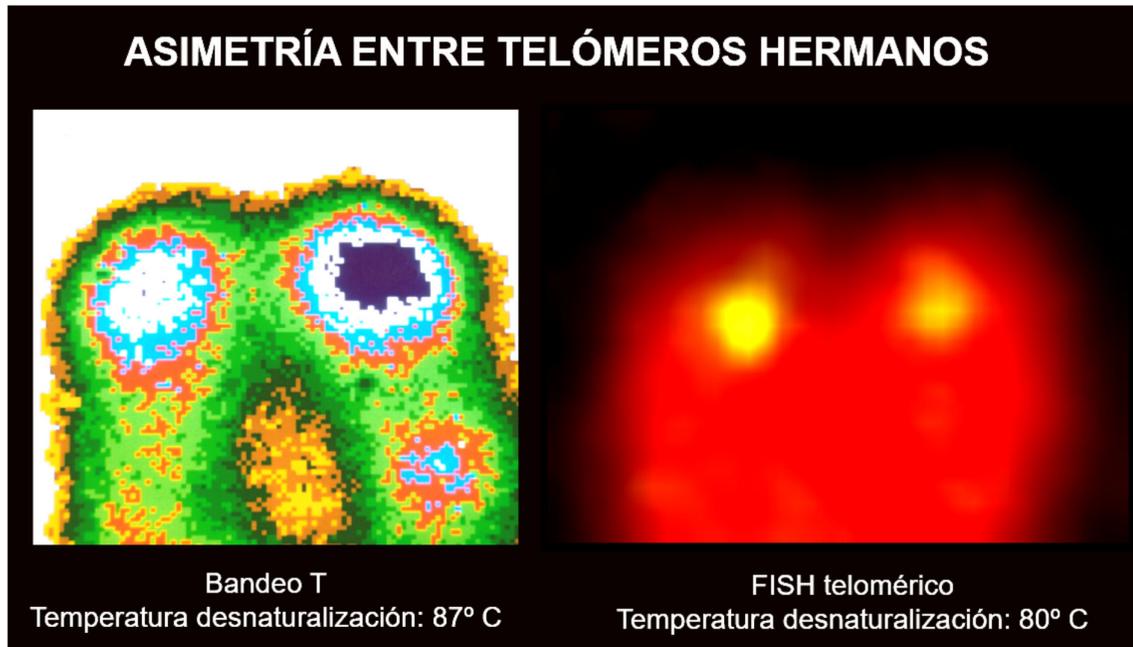
La existencia de esta inesperada distribución de la cromatina sub/telomérica de alta resistencia a la desnaturalización por calor entre cromátidas hermanas, fue confirmada posteriormente analizando cromosomas endorreduplicados de CHO (Drets y Mendizábal, 1998), dado que en ambos cromosomas el patrón de distribución fue el mismo, descartando posibles causas metodológicas e indicando que se podría deber a un fenómeno cromosómico subyacente (Drets, 2000) (Fig. 10). El origen de la distribución asimétrica de la cromatina de mayor densidad en cromosomas con Bando T es desconocido hasta el momento.

#### ***VI.5. Asimetría entre telómeros hermanos detectada con Q-FISH telomérico: ¿únicamente artefactos metodológicos o evidencias de un fenómeno normal y específico de la región cromosómica terminal?***

Las diferencias observadas en la distribución de la cromatina telomérica entre cromátidas hermanas de cromosomas con bandeado T, aparentan estar relacionadas con las diferencias entre telómeros hermanos detectadas con Q-FISH telomérico. Si bien varios autores demostraron la frecuente existencia de diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia entre telómeros hermanos con FISH telomérico, la mayoría atribuye dicha variabilidad a artefactos metodológicos.

Sin embargo, teniendo en cuenta que tanto el bandeado T como el FISH telomérico requieren de una desnaturalización de los cromosomas a una elevada temperatura (87-80 °C), es posible que las regiones altamente resistentes a la desnaturalización por calor asimétricamente localizadas entre cromátidas hermanas (Drets y cols., 1992a), puedan interferir con la hibridación de las sondas teloméricas. Si bien esta posibilidad estaría de acuerdo con ambos modelos propuestos por Cukusic y cols. (2014) para explicar las dificultades de hibridación de las sondas PNA, resulta particularmente interesante mencionar que el modelo B sería altamente factible en este caso. De esta manera, la distribución asimétrica de los bloques

de cromatina de mayor densidad (altamente resistentes a la desnaturalización por calor) detectados con bandeo T, podrían interferir de forma diferencial con la hibridación de las sondas teloméricas en ambos telómeros hermanos, causando diferencias en la fluorescencia emitida (Fig. 38).

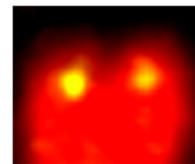
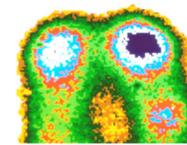
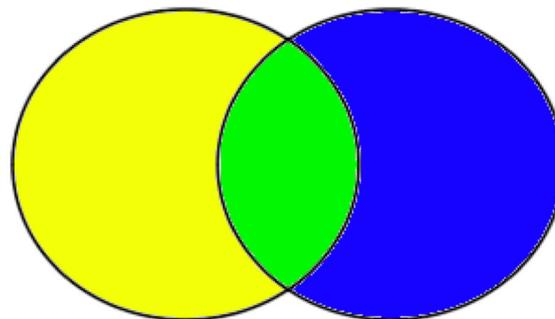


**Figura 38.-** Detección de asimetría entre telómeros hermanos mediante exploración microdensitométrica de bandas T (izquierda) y FISH telomérico con sonda PNA (derecha). Quizás los telómeros hermanos se desnaturalicen en forma diferencial debido a la distribución asimétrica de los bloques de cromatina de mayor densidad altamente resistentes a la desnaturalización por calor. En el ejemplo, un cromosoma con un patrón de distribución tan asimétrico de estas áreas de mayor densidad (violeta) entre cromátidas hermanas podría causar una hibridación asimétrica de la sonda telomérica obteniéndose un patrón especular como el observado en la imagen de FISH.

De esta manera, las asimetrías detectadas con bandeo T y Q-FISH telomérico podrían estar relacionadas. Además, en las áreas de cromatina de alta densidad detectadas por análisis microdensitométrico de bandas T es donde frecuentemente se localizan los repetidos teloméricos TTAGGG (Drets, 2004). Esto incluso se puede apreciar claramente en la Figura 38, ya que al emplear una elevada magnificación de la imagen se puede visualizar que las regiones de cromatina de alta densidad (violeta) y las señales de FISH telomérico tienen una localización bastante similar. Además, puede confirmarse la observación de Moyzis y cols. (1988) la cual indica que las señales fluorescentes de sondas teloméricas en cromosomas

metafásicos no están localizadas en los extremos *per se* de las cromátidas sino que están rodeadas de material cromatínico (Moyzis y cols., 1988). Esta particular localización del ADN telomérico fue confirmada empleando microscopía electrónica de alta resolución (Steinmüller y cols., 1993). Por tanto, es posible que la compleja cromatina sub/telomérica de mayor orden con características heterocromáticas y altamente resistente a la desnaturalización por calor en mitosis, en caso de localizarse asimétricamente en ambas cromátidas hermanas, interfiera de forma diferencial con la hibridación de las sondas teloméricas considerando el modelo B de Cukusic y cols. (2014), originando así la aparición de asimetría en metafases con FISH telomérico. Evidentemente esto no descartaría la ocurrencia de posibles artefactos metodológicos que puedan aportar más variabilidad aun al FISH telomérico (Fig. 39).

### ARTEFACTOS METODOLÓGICOS



### FENÓMENO TELÓMERO-ESPECÍFICO

**Figura 39.-** Diagrama que presenta de forma gráfica la interacción de dos causas que podrían generar asimetría entre telómeros hermanos.

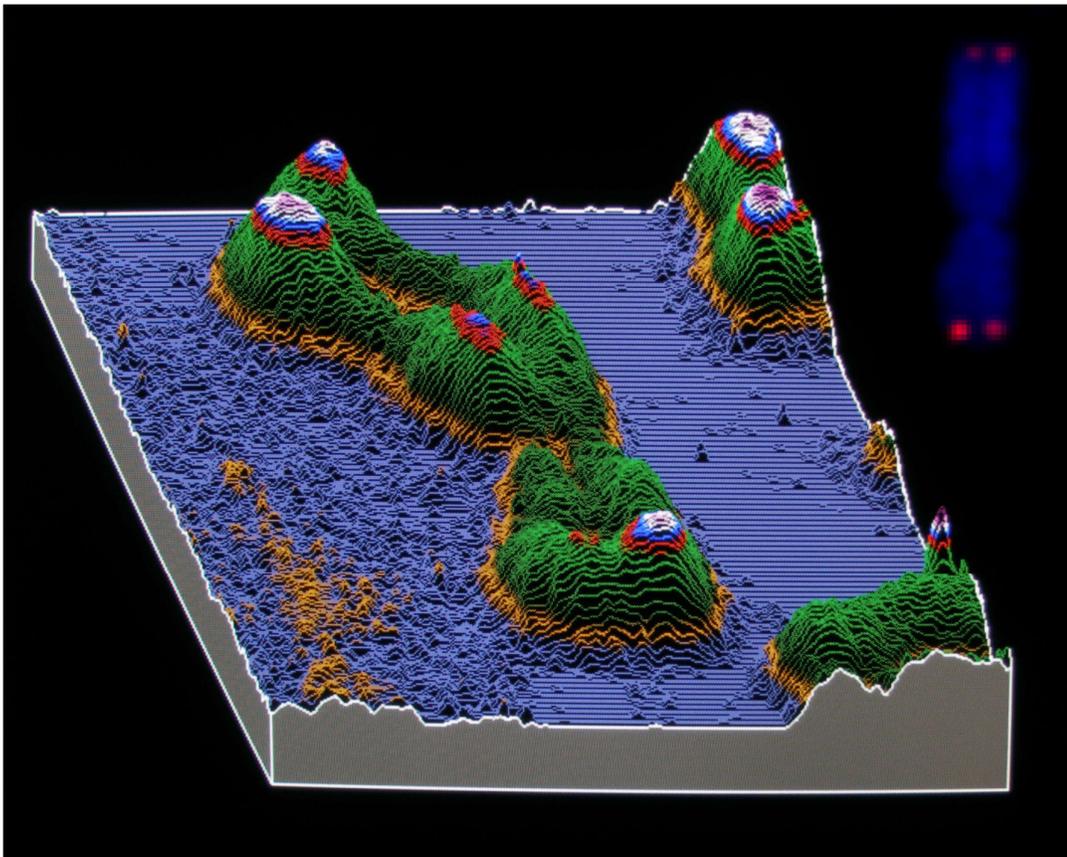
Como se indica esquemáticamente en la Figura 39, es difícil considerar que no ocurran artefactos metodológicos en una técnica que tiene muchas complejidades y puntos críticos vulnerables a posibles fallas. En este sentido, es interesante considerar la posibilidad de que la longitud del ADN telomérico pueda influir en la manifestación de artefactos metodológicos. En su estudio de Q-FISH telomérico en cromosomas de linfocitos humanos, Bekaert y cols. (2002) reportaron que las asimetrías eran algo más frecuentes en un donante de 94 años y por tanto con menor longitud telomérica. Por el contrario, al estudiar el “mega-telómero” detectado en el presente estudio, no se detectaron asimetrías extremas visualizadas por la ausencia de señal en

un telómero hermano. Esto podría indicar que los extremos cromosómicos con mayor longitud de ADN telomérico serían más fáciles de detectar mediante FISH, dado que resultarían menos vulnerables al efecto de artefactos metodológicos a lo largo de toda su extensión, evidenciando un menor nivel de asimetría. Por tanto, la ocurrencia de artefactos metodológicos podría explicar ciertos casos extremos de simetría/asimetría entre cromátidas hermanas si se considera la longitud del ADN telomérico. Sin embargo, la principal observación del presente trabajo indica que no toda la asimetría detectada con FISH telomérico sería causada por artefactos metodológicos. Esto es debido a que la asimetría presenta una distribución no aleatoria de las mayores intensidades teloméricas en cada brazo cromosómico, con una tendencia estadísticamente significativa a la manifestación de una configuración TRANS (Figs. 26 y 27). Esto contradice las hipótesis de algunos autores que proponen que toda la variabilidad entre telómeros hermanos con FISH telomérico se debe a la ocurrencia de artefactos metodológicos. Por tanto, es probable que nuestros datos puedan estar reflejando un fenómeno normal específico de los sub/telómeros, que origine asimetría en las señales de FISH telomérico entre ambas cromátidas hermanas. Como fue mencionado anteriormente, indudablemente dicho fenómeno se estaría solapando con artefactos metodológicos de la técnica de Q-FISH, requiriendo de un detallado análisis para ser detectado. De esta manera, ambos factores de variabilidad estarían interactuando entre sí para generar la asimetría total detectada (Fig. 39).

Si bien los modelos propuestos por Cukusic y cols. (2014) podrían explicar algunos casos de asimetría telomérica, no explicarían la clara tendencia detectada a la manifestación de una configuración TRANS de las mayores intensidades teloméricas de cada brazo cromosómico, según lo demuestran los resultados del presente estudio con Q-FISH telomérico. Sin embargo, al considerar las similitudes observadas entre la asimetría detectada con bandeo T y FISH telomérico, la tendencia hacia una configuración en TRANS detectada con FISH telomérico podría tener sentido dado que la cromatina sub-telomérica de alta densidad (resistente a la desnaturalización del bandeo T) se distribuye de manera no aleatoria en ambos brazos de cromosomas humanos, detectándose una muy alta frecuencia de manifestación de la configuración TRANS (Santiñaque y Drets, 2007). De hecho, esta configuración se detectó en el 79 % de los cromosomas humanos con bandeo T que presentaron, en el análisis microdensitométrico, asimetría en ambos brazos cromosómicos (TRANS+CIS) (Fig. 11). Si bien el número de cromosomas TRANS+CIS considerados en dicho estudio fue relativamente bajo (n: 101) debido a dificultades metodológicas, la elevada proporción de TRANS detectada fue estadísticamente significativa ( $p$ -valor  $< 0,0001$ ) con un error estándar de  $\pm 4,05\%$ .

Llamativamente, la frecuencia de esta configuración en TRANS fue muy similar a la reportada por Cornforth y Eberle (2001) en cromosomas humanos empleando CO-FISH telomérico, un método que permite identificar el modo de replicación de cada telómero mediante la detección de las hebras parentales (Fig. 12).

Por tanto, resulta interesante considerar que la frecuente asimetría y tendencia a localizarse en TRANS de la cromatina de mayor resistencia a la desnaturalización por calor, pudiera originar la frecuente aparición de diferencias en las señales de FISH telomérico entre telómeros hermanos y la significativa tendencia a la configuración en TRANS de las señales de mayor intensidad, considerando el modelo B propuesto por Cukusic y cols. (2014) (Fig. 40).



**Figura 40.-** Ejemplo de la configuración en TRANS detectada en cromosomas humanos con bandeado T mediante análisis microdensitométrico y posterior análisis computacional en pseudo-tercera dimensión. En el recuadro superior derecho, se indica a modo de ejemplo el patrón de FISH telomérico esperado para dicho cromosoma si las áreas de cromatina de mayor densidad se distribuyen como el ejemplo que se presenta en la imagen principal. Como puede observarse, la distribución de las mayores intensidades de fluorescencia sería especular a la distribución de las áreas de mayor compactación de la cromatina

sub/telomérica. Esto se debería a que dichas áreas serían más difíciles de desnaturalizar y por tanto la hibridación de las sondas teloméricas sería menor, considerando el modelo B propuesto por Cukusic y cols. (2014).

En cromosomas de linfocitos humanos con bandeo T con asimetría en ambos brazos, el porcentaje de la configuración TRANS detectado fue del 79 % (Santiñaque y Drets, 2007). Si bien esa proporción es superior a la hallada con FISH telomérico en el presente trabajo, es probable que otros factores de variabilidad como la ocurrencia de artefactos metodológicos en el FISH telomérico disminuyan la revelación de dicha configuración (Fig. 39). Por tanto, a pesar de esta diferencia y debido a que en ambos casos la configuración TRANS predominó sobre la CIS, los datos obtenidos con Q-FISH telomérico sugieren que ambas observaciones podrían estar relacionadas, evidenciando un fenómeno normal de la región sub/telomérica.

Dado que existe una clara tendencia a la detección de una configuración en TRANS de este fenómeno sub/telomérico, es muy difícil no vincularlo al modo de replicación de los telómeros dada la particular composición y orientación de los repetidos teloméricos en el cromosoma. Un telómero en G1 presenta una clara “asimetría” en la secuencia de ADN en toda su extensión (2 a 20 Kb), presentado una hebra con secuencia TTAGGG (hebra rica en G) y otra hebra con su secuencia complementaria AATCCC (hebra rica en C). Además estos repetidos teloméricos (TTAGGG)<sub>n</sub> presentan una orientación en dirección 5' a 3' hacia todos los extremos cromosómicos (Blackburn y Gall, 1978; Blackburn y Szostak, 1984; Moyzis y cols., 1988). Esto implica que en fase S, la hebra rica en G es replicada por la maquinaria de replicación de la hebra retrasada y la hebra rica en C por la maquinaria de replicación de la hebra líder. Por tanto en metafase cada telómero hermano fue replicado por distintas maquinarias de replicación, y dada la orientación del ADN telomérico, la configuración normal para cada tipo de replicación es en TRANS. Esto es, en metafase los telómeros replicados por la maquinaria de hebra retrasada deberían estar en TRANS, ocurriendo lo mismo con los telómeros replicados a partir de la hebra líder. Como fue mencionado en la Figura 12, existe un método que permite identificar el modo de replicación de cada telómero hermano llamado CO-FISH (Goodwin y Meyne, 1993; Cornforth y Eberle, 2001). Dicha técnica consiste en cultivar las células en presencia de BrdUrd durante un ciclo de replicación, un tratamiento de los extendidos cromosómicos con Hoechst 33258/radiación UV para degradar la hebra recién replicada, finalizando con una hibridación FISH con sondas teloméricas de única hebra (rica en G o C) para identificar la hebra parental y por tanto el modo de replicación de cada telómero

hermano. Al aplicar esta técnica al estudio de metafases de cromosomas humanos, como es de esperar, no todos los cromosomas son 100% TRANS. Debido a la posible ocurrencia de intercambios de cromátidas hermanas, solapamientos de cromátidas hermanas (incluyendo “twists” centroméricos) y finalmente a la ocurrencia de minúsculos intercambios teloméricos, la proporción TRANS detectada con CO-FISH cae al 81-83% (Cornforth y Eberle, 2001). De este modo, la proporción TRANS detectada en cromosomas humanos con bandeado T (79%) y con Q-FISH telomérico en el presente estudio (59%), sería bastante similar en el primer caso y no tan distante en el Q-FISH telomérico si se considera toda la variabilidad metodológica que pudiera no revelar la configuración TRANS.

Esto refuerza la posibilidad que estas observaciones estén relacionadas con el modo de replicación de la compleja cromatina sub/telomérica. En este sentido, es importante mencionar que evidencias convergentes sugieren que los telómeros hermanos poseen un procesamiento post-replicativo diferencial, principalmente en la forma en que cada uno adopta su estado protegido. La expresión transitoria de un mutante dominante de TRF2, que carece de su dominio de unión al ADN (dominio Myb) y del extremo amino terminal, provoca fusiones extremo a extremo involucrando únicamente a los telómeros replicados por la maquinaria de síntesis de la hebra líder (Bailey y cols., 2001). Las fusiones generadas son de tipo cromátida, y nunca involucran a los telómeros replicados por la maquinaria de hebra retrasada. En caso de ocurrir más de una fusión en un cromosoma las mismas se disponen siempre en TRANS. Bailey y cols., 2001 interpretaron que la susceptibilidad de fusionarse de los telómeros de la hebra líder estaba relacionada con la ausencia del motivo amino-terminal en la proteína TRF2 mutada, dejando sin la posibilidad de generar, gracias a la unión de otras proteínas, extremos 3' saliente a partir de los extremos romos obtenidos post-replicación. Sin embargo aclaran que si la función principal de TRF2 es la formación y estabilización de los *t-loops*, sería muy difícil de explicar la ausencia de fusiones involucrando a los telómeros replicados por la hebra retrasada. En conjunto con esto, Wang y cols. (2004) hallaron que la expresión transitoria de otro mutante dominante de TRF2, que sólo carece de su dominio básico amino-terminal, produce deleciones de tamaño de los *t-loops* en los telómeros de la hebra líder, mientras que los telómeros replicados por la maquinaria de síntesis de la hebra retrasada permanecen intactos (Wang y cols., 2004). Estos resultados indican que la ausencia del extremo amino-terminal del mutante TRF2 que emplearon Bailey y cols. (2001) no sería la explicación de la ocurrencia de fusiones involucrando únicamente a los telómeros de la hebra líder. En el experimento de Wang y cols. (2004), parecería que el mutante de TRF2 con un correcto dominio de unión al ADN telomérico

sí puede formar los *t-loops* pero no puede estabilizarlos al carecer de un dominio amino-terminal, generando deleciones involucrando únicamente a los telómeros de la hebra líder. Al igual que en los experimentos de Bailey y cols. (2001), no se explica por qué los telómeros de la hebra retrasada no son afectados de igual manera por el mutante de TRF2. Por otra parte, en células con una actividad reducida de la DNA-PK, también se han observado fusiones teloméricas que involucran únicamente a los telómeros de la hebra líder, pero en estos casos las fusiones se presentaban con menor frecuencia (Bailey y cols., 2001). Se ha determinado que la actividad quinasa de la DNA-PK es necesaria para cumplir su función de protección en los telómeros (Bailey y cols., 2004), y se ha propuesto que este complejo proteico es necesario para reconstruir el estado protegido de los telómeros recién replicados (Bailey y Goodwin, 2004). Por otro lado, en células que carecen de la actividad helicasa de la proteína WRN (la helicasa RecQ carente en el síndrome de Werner) (Gray y cols., 1997), se produce frecuentemente una deleción de los telómeros replicados por la maquinaria de la hebra retrasada, lo cual sugiere que esta proteína es necesaria para la eficiente replicación de la hebra rica en G (Crabbe y cols., 2004). Este sería uno de los casos excepcionales donde se ven afectados los telómeros de la hebra retrasada. En conjunto, estas observaciones indican que los telómeros de ambas cromátidas hermanas poseen distintos requerimientos proteicos para llegar a su estado protegido o para completar su replicación manteniendo su integridad. Esto sugiere la existencia de un modo de replicación específico de la cromatina telomérica. Al respecto, se ha observado que la unión de las proteínas TRF1 y TRF2 al ADN telomérico interfiere el pasaje de la horquilla de replicación sobre los repetidos teloméricos, lo cual puede provocar el detenimiento de la maquinaria de replicación convencional (Ohki y Ishikawa, 2004). Asimismo, se ha demostrado que TRF1 promueve la eficiente replicación del ADN telomérico previniendo la detención de la maquinaria de replicación (Sfeir y cols., 2009) y que son necesarias helicasas específicas para un correcto pasaje de la horquilla de replicación por los repetidos teloméricos (Schawalder y cols., 2003; Crabbe y cols., 2004; Ding y cols., 2004; Sfeir y cols., 2009).

En resumen, estas observaciones muestran que existen claras diferencias en la forma en que los telómeros hermanos mantienen su integridad durante la replicación, así como la presencia de dificultades para el pasaje de la horquilla de replicación a través de la cromatina telomérica. Sin embargo, no queda claro por qué los telómeros replicados por la maquinaria de la hebra retrasada no son vulnerables a fusiones cuando se expresa transitoriamente un mutante negativo de TRF2, una proteína crítica para la protección de los telómeros (van Steensel y cols., 1998; de Lange, 2005). Por otra parte, aún persisten varias interrogantes por responder

relacionadas con nuestros resultados: ¿por qué es normal encontrar asimetría entre telómeros hermanos en metafase?, ¿por qué se detecta una significativa tendencia a una configuración en TRANS? A tal efecto, desde hace ya varios años, he venido trabajando en un modelo teórico y meramente especulativo para encontrar las respuestas a dichas preguntas. Si bien una versión preliminar del mismo fue publicado con anterioridad en forma muy escueta (Santiñaque y Drets, 2007), presentaré a continuación y como parte final de esta Tesis el desarrollo de este modelo plasmando sus principales ideas y su posible relación con las observaciones de nuestro grupo así como con las de otros autores que han sugerido la existencia de un procesamiento postreplicativo diferencial de los telómeros hermanos.

#### ***VI.6. Modelo teórico sobre el origen de la asimetría telomérica observada con FISH telomérico y Bandeó T: posible relación entre la frecuente detección de una configuración TRANS con un particular modo de replicación y compactación de la compleja cromatina de la región cromosómica terminal***

La función principal de los telómeros es la de conferir protección al cromosoma, evitando la degradación y/o fusión de sus extremos. Un volumen considerable de resultados ha mostrado que dicha protección está directamente relacionada con la secuencia del ADN telomérico y con la compleja cromatina sub/telomérica nucleada por proteínas que reconocen con alta especificidad dicha secuencia (Fig. 4). Se propone que los telómeros forman un gran bucle terminal, *t-loop*, que incluye varios Kb de ADN telomérico incluyendo la participación de muchas proteínas teloméricas y otras asociadas a estas (Figs. 2 y 3). Además, la cromatina telomérica genera en su proximidad un contexto heterocromático extremadamente complejo, donde además interactúa el ARN transcrito por los telómeros (TERRA) (Fig. 5).

Dada la función principal de los telómeros, la protección, debe ser un enorme desafío para la célula replicar una cromatina de tan alta complejidad en cada telómero hermano sin cometer el “error” de fusionar ambos telómeros recién replicados entre sí. Si bien se han reportado diferencias en la forma en que cada telómero hermano adquiere su estado protegido luego de la replicación, se sigue considerando que ambos telómeros llegan a su estado protegido de máxima compactación en paralelo, es decir al mismo tiempo (Bailey y cols., 2001; Bailey y cols., 2004; Wang y cols., 2004).

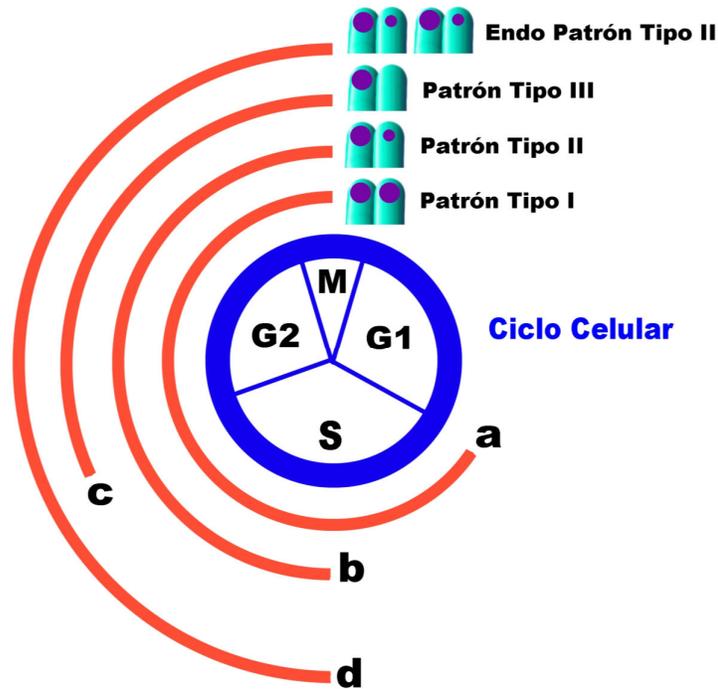
El modelo que se describe en la presente Tesis consiste en proponer un particular modo de replicación de la compleja cromatina sub/telomérica de mayor orden, en la cual la adquisición de un estado de completa compactación en cada telómero hermano ocurre de manera desfasada en el tiempo. Este modelo de replicación temporalmente “asimétrica” de la cromatina sub/telomérica, no significa dejar sin protección a uno de los telómeros hermanos, sino que la adquisición de esta protección en lugar de realizarse “en paralelo” ocurriría “en serie”. Resulta interesante considerar que este sistema “asimétrico” de replicación disminuiría la probabilidad (en al menos un 50%) de que los telómeros hermanos se fusionen entre sí y con otros telómeros, en comparación con un modo de replicación “simétrico”, dada la alta complejidad del estado protegido que debe alcanzar cada telómero recién replicado (procesamiento de los extremos 3' salientes, formación de los *t-loops* en simultáneo con la nucleación del complejo de proteínas teloméricas, adquisición del estado heterocromático, etc.) (de Lange, 2009).

En base a este modelo, la asimetría detectada en mitosis con bandeo T y FISH telomérico podría ser un reflejo del particular modo de replicación propuesto para la cromatina sub-telomérica, donde los telómeros hermanos que adquieran primero el estado protegido evidenciarían en mitosis un mayor nivel de compactación de la cromatina que el otro telómero hermano (Santiñaque y Drets, 2007). Por otra parte, justamente la manifestación de una configuración en TRANS podría indicar que se trata de un fenómeno específico de uno de los telómeros hermanos. En base a los resultados reportados por Bailey y cols. (2001) y Wang y cols. (2004), en los cuales no se detectó ningún efecto negativo en la protección/estabilidad de los telómeros replicados por la maquinaria de la hebra retrasada luego de la expresión transitoria de mutantes dominantes de TRF2 (que tenían en común la ausencia de su dominio de unión al ADN), el presente modelo supone que los telómeros de la hebra retrasada son los que podrían llegar antes a su estado de mayor compactación. Uno de los primeros obstáculos de esta suposición es la acción de la telomerasa teniendo en cuenta el clásico “Problema de replicación de los extremos-*End replication problem*” postulado por Watson (1972) y Olovinkov (1973). Si bien esta teoría se ha comprobado *in vitro* en moléculas lineales con extremos romos, indicando que el problema de acortamiento lo presentan los telómeros de la hebra retrasada, las nuevas evidencias que muestran que los telómeros tienen *in vivo* extremos 3' salientes en todas las etapas del ciclo celular cambian el objetivo final de la replicación. Por tanto, la incapacidad de replicar completamente los telómeros de la hebra retrasada por parte de la maquinaria de

síntesis no sería un “problema” para estos (Lingner y cols., 1995). De esta manera, para compensar el acortamiento telomérico se propone que la telomerasa podría actuar en la etapa G1 o en los telómeros de la hebra líder luego de la replicación (Lingner y cols., 1995), habiéndose comprobado esta última opción de forma experimental (Chai y cols., 2006). Considerando estos aspectos no muy difundidos sobre la necesidad de mecanismos alternativos para la acción de la telomerasa, la actividad de esta importante enzima no sería un obstáculo para la idea principal del modelo presentado en este trabajo.

Sin embargo, no resulta sencillo hipotetizar sobre cuál sería el o los posible/s mecanismos que pueden generar una replicación asimétrica de la cromatina sub/telomérica. Una de las opciones podría ser la segregación no aleatoria de alguna de las proteínas teloméricas (TRF2, TRF1, Pot1, TIN2, TPP1 o Rap1). Esta opción podría estar relacionada con la dificultad replicativa que presenta la cromatina telomérica al pasaje de la horquilla de replicación (Schawalder y cols., 2003; Crabbe y cols., 2004; Ding y cols., 2004; Sfeir y cols., 2009). Alternativamente, podrían existir marcas epigenéticas en los sub/telómeros que segreguen de forma asimétrica condicionando la facilidad de formación de un estado cromatínico de mayor orden antes que el otro telómero hermano. Esta segunda opción podría ser compatible con la “Hipótesis de la hermana silenciosa-The silent sister hypothesis”, que postula que las marcas epigenéticas de silenciamiento pueden segregarse de forma no aleatoria entre ambas cromátidas hermanas. De hecho, dicha hipótesis fue incluida en una interesante publicación de Lansdorp y cols. (2012) titulada “*Epigenetic differences between sister chromatids?—¿Diferencias epigenéticas entre cromátidas hermanas?*”.

Con respecto a los distintos niveles de simetría/asimetría detectados en mitosis, en base a este modelo, una opción podría ser que las diferencias estén determinadas por el período de la fase de síntesis (fase S) en el cual se replicó el telómero (Wright y cols., 1999; Arnoult y cols., 2010) (Fig. 41).



**Figura 41.-** Origen de los distintos patrones de distribución de la cromatina de mayor densidad entre telómeros hermanos en base a un modelo de replicación asimétrica de la cromatina sub/telomérica, teniendo en cuenta que los telómeros humanos se replican en distintos fragmentos temporales de la fase S del ciclo celular (Arnoult y cols., 2010). Una replicación telomérica en fase S temprana, permitiría al telómero que no incorpora todos los componentes de la cromatina telomérica disponer de más tiempo para alcanzar un grado de compactación similar al que si incorpora esos componentes durante la replicación (en mitosis sería un patrón simétrico, Tipo I, a). Por otra parte, una replicación tardía en la fase S llevaría a que el telómero que no incorpora todos los componentes de la cromatina telomérica no disponga de tiempo suficiente para adquirir, además de su estado protegido, el grado máximo de compactación de la cromatina sub/telomérica (patrón con asimetría alta, Tipo III, c). De esta manera, una replicación a la mitad de la fase S daría origen a los patrones con asimetría intermedia (Tipo II, b). Este modelo podría también explicar porque los cromosomas endorreduplicados exhiben un mismo patrón de asimetría telomérica, dado que éstos se replican en forma sincrónica en fase S (ej. Tipo II, d).

Esta interpretación del origen de la asimetría relacionada con la etapa de replicación telomérica permitiría explicar la razón por la cual los patrones de distribución de la cromatina de alta densidad son iguales en cromosomas endorreduplicados con bandeo T, dado que estos cromosomas se replican sincrónicamente en la fase S (Fig. 41, d). Adicionalmente, la acción en G2 de factores tales como la enzima telomerasa (Lingner y cols., 1995; Chai y cols., 2006) y la

transcripción de TERRA (Feuerhahn y cols., 2010) podrían aportar mayor variabilidad al nivel de asimetría detectado en mitosis.

En resumen, lo interesante de este modelo de replicación “asimétrica” de la cromatina sub/telomérica es que podría explicar la frecuente detección de asimetría con bandeo T y FISH telomérico, así como la significativa tendencia a la manifestación de una configuración TRANS en ambos casos. Además, podría estar relacionado con los llamativos hallazgos que han mostrado que los telómeros hermanos poseen una susceptibilidad diferencial cuando se induce la expresión transitoria de mutantes dominantes de la proteína TRF2 (Bailey y cols., 2001; Wang y cols., 2004), una proteína crítica para la protección de los telómeros (van Steensel y cols., 1998; de Lange, 2005). Sin embargo, es esencial obtener más datos experimentales para sostener este modelo, ya que no pueden excluirse otras posibilidades por el momento. La confirmación de la mencionada hipótesis, requerirá la convergencia de estudios citológicos y moleculares, los cuales podrán aportar nuevas perspectivas sobre el modo de replicación de la cromatina de tan importante región cromosómica.

## VII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Los resultados de la presente Tesis de Maestría sugieren que no toda la variabilidad detectada en metafase con FISH telomérico entre cromátidas hermanas se debe a artefactos metodológicos como algunos autores sostienen. Esta afirmación se basa en que se detectó mediante análisis de Q-FISH telomérico un sesgo estadísticamente significativo a favor de una configuración en TRANS de las mayores intensidades teloméricas de cada brazo cromosómico, es decir, en cromátidas opuestas. Se plantea un modelo teórico que podría explicar el origen de la asimetría detectada en mitosis con FISH telomérico y bandeo T, en el que se propone que la frecuente detección de cromosomas con una configuración TRANS podría estar evidenciando un particular modo de replicación y compactación de la compleja cromatina de la región cromosómica terminal.

A partir de los resultados discutidos en la presente Tesis de Maestría, las perspectivas de trabajos futuros se podrían orientar en las siguientes direcciones:

-Evaluar mediante Inmuno-FISH los patrones de asimetría telomérica detectados con inmunodetección de proteínas teloméricas (ej. TRF1, TRF2, Pot1) en forma simultánea con las señales de FISH telomérico, con el fin de evaluar si alguna proteína presenta el patrón especular al FISH telomérico.

-Realizar estudios más exhaustivos del mega-telómero descrito en el presente trabajo, para evaluar por ejemplo si el aumento del ADN telomérico es acompañado por un aumento de las proteínas teloméricas en dicho fragmento, tamaño del t-loop, momento de replicación en la fase S empleando Rep-CO-FISH, detección de dicho mega-telómero en otros familiares de estrecho parentesco biológico, etc.

-Efectuar un experimento de expresión transitoria de proteínas teloméricas mutadas similar al realizado por Bailey y cols. (2001) y Wang y cols. (2004), pero conjugando dichas proteínas a diferentes fluorocromos, con el fin de evaluar su grado de incorporación a la cromatina telomérica y/o la aparición de patrones de asimetría. Realizar en simultáneo y como control, una comparación con los patrones obtenidos mediante la expresión transitoria de una proteína TRF2 normal también marcada con un fluorocromo.

-Estudiar si efectivamente los distintos patrones de asimetría telomérica se originan por el distinto momento en fase S en la cual fue replicado el telómero, mediante la cuantificación del patrón de asimetría detectado con proteínas teloméricas conjugadas a fluorocromos y la

realización de Rep-CO-FISH, una técnica que permite determinar en qué momento de la fase S fue replicado cada telómero.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Allen TD, Jack EM, Harrison CJ (1988) The three-dimensional structure of human metaphase chromosomes determined by scanning electron microscopy, in Adolph KW (ed): Chromosomes and Chromatin, CRC Press, pp 51–72

Arnoult N, Schluth-Bolard, C, Letessier A, Drascovic I, Bouarich-Bourimi R, Campisi J, Kim S, Boussouar A, Ottaviani A, Magdinier F, Gilson E, Londoño-Vallejo A (2010) Replication Timing of Human Telomeres is Chromosome Arm-specific, Influenced by Subtelomeric Structures and Connected to Nuclear Localization. *PLOS Genetics* 6: e1000920

Aubert G, Hills M, Lansdorp PM (2012) Telomere length measurement: caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutation Research* 730: 59–67

Azzalin CM, Lingner J (2008) Telomeres: the silence is broken. *Cell Cycle* 7: 1161-1165

Baerlocher GM, Vulto I, de Jong G, Lansdorp PM (2006) Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat Protoc* 1: 2365–2376

Bailey SM, Murnane JP (2006) Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res* 34: 2408-2417

Bailey SM, Goodwin EH (2004) DNA and telomeres: beginnings and endings. *Cytogenet Genome Res* 104: 109-115

Bailey SM, Brenneman MA, Goodwin EH (2004) Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. *Nucleic Acids Res* 32: 3743-3751

Bailey SM, Cornforth MN, Kurimasa A, Chen DJ, Goodwin EH (2001) Strand-specific postreplicative processing of mammalian telomeres. *Science* 293: 2462–2465

Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D (2003) Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet* 33: 203–207

Baker E, Hinton L, Callen DF, Altree M, Dobbie A, Eyre HJ, Sutherland GR, Thompson E, Thompson P, Woollatt E, Haan E (2002) Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am J Med Genet*; 107: 285-293

Baumann P, Cech TR (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292: 1171-1175

Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE (2001) Telomere position effect in human cells. *Science* 292: 2075-2077

Bekaert S, Koll S, Thas O, Van Oostveldt P (2002) Comparing telomere length of sister chromatids in human lymphocytes using three-dimensional confocal microscopy. *Cytometry* 48: 34-44

Benetti R, García-Cao M, Blasco MA (2007) Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nature Genetics* 39: 243-250

Benetti R, Schoeftner S, Muñoz P, Blasco MA (2008) Role of TRF2 in the assembly of telomeric chromatin. *Cell Cycle* 7: 3461-3468

Bianchi A, Stansel RM, Fairall L, Griffith JD, Rhodes D, de Lange T (1999) TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *EMBO J* 18: 5735-5744

Blackburn EH (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106: 661-673

Blackburn EH, Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120: 33-53

Blackburn EH, Szostak JW (1984) The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu Rev Biochem* 53:163-194

Blasco MA (2004) Telomere epigenetics: a high-order control of telomere length in mammalian cells. *Carcinogenesis* 25: 1083-1087

Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6: 611-622

Bocian E, Helias-Rodzewicz Z, Suchenek K, Obersztyn E, Kutkowska-Kazmierczak A, Stankiewicz P, Kostyk E, Mazurczak T (2004) Subtelomeric rearrangements: results from FISH studies in 84 families with idiopathic mental retardation. *Med Sci Monit* 10: 143-151

Britt-Compton B, Rowson J, Locke M, Mackenzie I, Kipling D, Baird DM (2006) Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by cis-acting determinants in humans. *Hum Mol Genet* 15: 725–733

Cawthon RM (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 30: e47

Chai W, Du Q, Shay JW, Wright WE (2006) Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Mol Cell.* 21: 427-435.

Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish, J, Tempst P, de Lange T (1995) A human telomeric protein. *Science* 270: 1663-1667

Chuang TCY, Moshir S, Garini Y, Chuang AY, Young IT, Vermolen B, Doel R, Mougey V, Perrin M, Braun M, Kerr PD, Fest T, Boukamp P, Mai S (2004) The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biology* 2: 12

Colgin L, Reddel R (2004) Telomere Biology: a new player in the end zone. *Current Biology* 14: 901-902

Colleaux L, Rio M, Heuertz S, Moindrault S, Turleau C, Ozilou C, Gosset P, Raoult O, Lyonnet S, Cormier-Daire V, Amiel J, Le Merrer M, Picq M, de Blois MC, Prieur M, Romana S, Cornelis F, Vekemans M, Munnich A (2001) A novel automated strategy for screening cryptic telomeric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *Eur J Hum Genet* 9: 319-27

Cornforth MN, Eberle RL (2001) Termini of human chromosomes display elevated rates of mitotic recombination. *Mutagenesis* 16: 85-89

Crabbe L, Verdun RE, Haggblom CI, Karlseder J (2004) Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* 306:1951-1953

Craig-Holmes AP, Moore FB, Shaw MW (1973) Polymorphism of human C-band heterochromatin. I. Frequency of variants. *American Journal of Human Genetics* 25(2): 181-192

Cremer M, Grasser F, Lanctôt C, Müller S, Neusser M, Zinner R, Solovei I, Cremer T (2008) Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes. *Methods Mol Biol.* 463: 205-239

Cukusic Kalajzic A, Skrobot Vidacek N, Huzak M, Ivankovic M, Rubelj I (2014) Telomere Q-PNA-FISH - Reliable Results from Stochastic Signals. *PLOS ONE* 9(3): e92559. doi:10.1371/journal.pone.0092559

de Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development* 19: 2100-2110

de Lange T (2009) How telomeres solve the end-protection problem. *Science* 326: 948-952

de Pauw ES, Roelofs H, Zwinderman A, van Houwelingen JC, Fibbe WE, de Knijff P, Pearson PL, Tanke HJ (2005) Studying the biological and technical sources of variation in telomere length of individual chromosomes. *Cytometry* 65: 35-39

Deng Z, Norseen J, Wiedmer A, Riethman H, Lieberman PM (2009) TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol Cell* 35: 403-413

Deng W, Tsao SW, Guan XY, Lucas JN, Cheung AL (2003) Role of short telomeres in inducing preferential chromosomal aberrations in human ovarian surface epithelial cells: a combined

telomere quantitative fluorescence in situ hybridization and whole-chromosome painting study. *Genes Chromosomes Cancer* 37: 92-97

Dernburg AF, Sedat JW, Cande WZ, Bass HW (1995) Cytology of telomeres. In: Blackburn EH, Greider CW (eds) *Telomeres*. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Ding H, Schertzer M, Wu X, Gertsenstein M, Selig S, Kammori M, Pourvali, Poon S, Vulto I, Chavez E, Tam PPL, Nagy A, Lansdorp PM (2004) Regulation of murine telomere length by *Rtel*: an essential gene encoding a helicase-like protein. *Cell* 117: 873-886

Drets ME (2000) Insights into the structure of the subtelomeric chromosome segments. *Gen Mol Biol* 23: 1087–1093

Drets ME (2004) Cytological indications on the complex structure of the subtelomeric region. *Cytogenet Genome Res* 104: 137-141

Drets ME, Mendizábal M (1998) The underlying structure of the subtelomeric segments detected by microphotometrical scanning and graphic image analysis. *Mutat Res* 404: 13-16

Drets ME, Santiñaque FF (2007) A biomedical perspective of the telomeric structure and function. In: Obe G, Vijayalaxmi, eds. *Chromosomal alterations: methods, results and importance in human health*. Springer-Verlag 14: 223-238

Drets ME, Santiñaque FF (2005) Retardo mental, malformaciones congénitas y aberraciones cromosómicas subteloméricas crípticas. *Revista Médica del Uruguay* 21: 93-106

Drets ME, Mendizábal M, Boccardo EM, Bonomi R (1995) Further analyses of subtelomeric and paracentric holes induced in human and Chinese hamster ovary cell chromosomes. *Biol Zentrbl* 114: 329-338

Drets ME, Obe G, Monteverde FJ, Folle GA, Medina II, De Galvez MG, Duarte JE, Mechoso BH (1992a) Computerized graphic and light microscope analyses of T-banded chromosome segments of Chinese hamster ovary cells and human lymphocytes. *Biol Zentrbl* 111: 204-214

Drets ME, Obe G, Folle GA, Medina II, De Galvez MG, Duarte JE, Mechoso BH (1992b) Appearance of “holes” in subtelomeric regions of human and Chinese hamster ovary cell chromosomes due to prolonged incubation in T-banding buffer followed by Giemsa staining. *Brazilian J Genet* 15: 927–933

Dutrillaux B (1973) Nouveau système de marquage chromosomique: Les bandes T. *Chromosoma* 41: 395-402

Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM (2004) Accelerated telomeres shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17312–17315

Fan YS, Zhang Y, Speevak M, Farrell S, Jung JH, Siu VM (2001) Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence in situ hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet Med* 3: 416-421

Feuerhahn S, Iglesias N, Panza A, Porro A, Lingner J (2010) TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS Letters* 584 : 3812-3818

Flint J, Bates GP, Clark K, Dorman A, Willingham D, Roe BA, Micklem G, Higgs DR, Louis EJ (1997) Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum Mol Genet* 6: 1305-1313

Gilson E, Laroche T, Gasser SM (1993) Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends in Cell Biology* 3: 128-134

Goodwin E, Meyne J (1993) Strand-specific FISH reveals orientation of chromosome 18 alphoid DNA. *Cytogenet Cell Genet* 63: 126–127

Graakjaer J, Londono-Vallejo JA, Christensen K, Kolvraa S (2006) The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans shows signs of heritability and is maintained through life. *Ann N Y Acad Sci* 1067: 311-316

Graakjaer J, Pascoe L, Der-Sarkisian H, Thomas G, Kolvraa S, Christensen K, Londono-Vallejo JA (2004) The relative lengths of individual telomeres are defined in the zygote and strictly maintained during life. *Aging Cell* 3: 97-102

Gray MD, Shen JC, Kamath-Loeb AS, Blank A, Sopher BL, Martin GM, Oshima J, Loeb LA (1997) The Werner syndrome protein is a DNA helicase. *Nature Genet* 17: 100–103

Griffith J, Bianchi A, de Lange T (1998) TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro. *J Mol Biol* 278: 79-88

Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97: 503-514

Hande MP (2004) DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res* 104: 116-122

Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458–460

Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW (2001) The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107: 67-77

Henderson E (1995) Telomere DNA structure. In: *Telomeres*. Blackburn EH, Greider CW (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 11-34

Hsu HL, Gilley D, Blackburn EH, Chen DJ (1999) Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc natl Acad Sci, USA* 96: 12454–12458

Iwano T, Tachibana M, Reth M, Shinkai Y (2004) Importance of TRF1 for functional telomere structure. *J Biol Chem* 279: 1442-1448

Jack EM, Harrison CJ, Allen TD, Harris R (1986) A structural basis for R- and T-banding: a scanning electron microscopy study. *Chromosoma* 94: 395-402

Jalal SM, Harwood AR, Sekhon GS, Pham Lorentz C, Ketterling RP, Babovic-Vuksanovic D, Meyer RG, Ensenauer R, Anderson MH Jr, Michels VV (2003) Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients. *Genet Med* 5: 28-34

Karlseder J, Kachatrian L, Takai H, Mercer K, Hingorani S, Jacks T, de Lange T (2003) Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1. *Mol Cell Biol* 23: 6533-6541

Kim S, Han S, You Y, Chen DJ, Campisi J (2003) The human telomere-associated protein TIN2 stimulates interactions between telomeric DNA tracts *in vitro*. *EMBO Rep* 4: 685-691

Kim S, Kaminker P, Campisi J (1999) TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nature Genetics* 23:405-412

Knight SJL, Flint J (2000) Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J Med Genet* 37: 401-409

Lansdorp PM, Falconer E, Tao J, Brind'Amour J, Naumann U (2012) Epigenetic differences between sister chromatids? *Ann N Y Acad Sci*. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06505.x

Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ (1996) Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5: 685-691

Lima-De-Faria A (1952) Chromomere analysis of chromosome complement of rye. *Chromosoma* 5: 1-68

Lingner J, Cooper JP, Cech TR (1995) Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem?. *Science* 269: 1533-1534

Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z (2004) Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem* 279: 51338-51342

Londono-Vallejo JA, DerSarkissian H, Cazes L, Thomas G (2001) Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans. *Nucleic Acids Res* 29: 3164–3171

Ludeña P, Sentis C, De Cabo F, Velazquez M, Fernandez-Piqueras J (1991) Visualization of R-bands in human metaphase chromosomes by the restriction endonuclease MseI. *Cytogenet Cell Genet* 57: 82-86

Ludérus ME, van Steensel B, Chong L, Sibon OC, Cremers FF, de Lange T (1996) Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol* 135: 867–881

Luke B, Lingner J (2009) TERRA: telomeric repeat-containing RNA. *The EMBO Journal* 28: 2503-2510

Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP (1997) Long G Tails at Both Ends of Human Chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88: 657-666

Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM (1998) Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet* 18: 76-80

McClintock B (1942) The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26: 234-282

McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH (2000) Telomeres and their control. *Annu Rev Genet* 34: 331-58

Meyne J, Ratliff RL, Buckingham JM, Jones, MD Wilson, JS Moyzis (1990) The Human telomere. In: *Chromosomes Today*. 10 75-80, K. Fredga, B.A. Kihlman, and M.D. Bennet (Editors) Unwin Hyman, London

Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK (1989) Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates *Proc Natl Acad. Sci USA* 86: 7049-7053

Morrish TA, Greider CW (2009) Short telomeres initiate telomere recombination in primary and tumor cells. *PLoS Genetics* 5(1): e1000357. doi:10.1371/journal.pgen.1000357

Moyzis RK, Buckinham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6622-6626

Muller H (1938) The remaking of chromosomes. *The Collecting Net Woods Hole* 13: 181-198

Muñoz-Jordan JL, Cross GAM, de Lange T, Griffith JD (2001) t-loops at trypanosome telomeres. *The EMBO Journal* 20: 579-588

Murti KG, Prescott DM (1999) Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14436-14439

Nagele RG, Velasco AQ, Anderson WJ, McMahon DJ, Thomson Z, Fazekas J, Wind k, Lee H (2001) Telomere associations in interphase nuclei: possible role in maintenance of interphase chromosome topology. *J Cell Sci* 114: 377-388

Ness GO, Lybaek H, Houge G (2002) Usefulness of high resolution comparative genomic hybridization (CGH) for detecting and characterizing constitutional chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 113: 125-36

Nikitina T, Woodcock CL (2004) Closed chromatin loops at the ends of chromosomes. *J Cell Biol* 166: 161-165

Ohki R, Ishikawa F (2004) Telomere-bound TRF1 and TRF2 stall the replication fork at telomeric repeats. *Nucleic Acids Research* 32: 1627-1637

Olovnikov AM (1973) A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41: 181-190

Opresko PL, Fan J, Danzy S, Wilson DM, Bohr VA (2005) Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2. *Nucleic Acids Res* 33: 1230-1239

Pagano M, Gauvreau K (2000) *Principles of Biostatistics*. Second Edition. Duxbury Press, Chicago, 592 pp

Palm W, de Lange T (2008) How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 42: 301-334

Perner S, Bruderlein S, Hasel C, Waibel I, Holdenried A, Ciloglu N, Chopurian H, Nielsen KV, Plesch A, Hogel J, Moller P (2003) Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging. *American Journal of Pathology* 163: 1751-1756

Phan AT, Mergny JL (2002) Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix. *Nucleic Acids Research* 30: 4618-4625

Poon SS, Martens UM, Ward RK, Lansdorp PM (1999) Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36: 267-278

Raynan JB, Tepperberg JH, Papenhausen P, Lamb AN, Hedrick J, Eash D, Ledbetter DH, Martin CL (2006) Subtelomere FISH analysis of 11,688 cases: An evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. *J Med Genet* 43: 478-489

Riethman H (2005) Human subtelomere structure and variation. *Chromosome Res* 13: 505-515

Riethman H, Ambrosini A, Castaneda C, Finklestein J, Hu XL, Mudunuri U, Paul S, Wei J (2004) Mapping and initial analysis of human subtelomeric sequence assemblies. *Genome Res* 14: 18-28

Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G (1992) The highest gene concentrations in the human genome are in T bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4913-4917

Samper E, Flores JM, Blasco MA (2001) Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*<sup>-/-</sup> mice with short telomeres. *EMBO Rep* 2: 800-807

Santiñaque FF, Drets ME (2007) Non-random distribution of high density chromatin detected at opposite ends of T-banded human metaphase chromosomes. *Genetics and Molecular Biology* 30: 1054-1057

Schawalder J, Paric E, Neff NF (2003) Telomere and ribosomal DNA repeats are chromosomal targets of the bloom syndrome DNA helicase. *BMC Cell Biol* doi: 10.1186/1471-2121-4-15

Schoeftner S, Blasco MA (2008) Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature Cell Biology* 10: 228-236

Schoeftner S, Blasco MA (2009) A higher order of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *The EMBO Journal* 28: 2323-2336

Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, MacRae SL, Karlseder J, Schildkraut CL, de Lange T (2009) Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138: 90-103

Sharma GG, Hwang K, Pandita RK, Gupta A, Dhar S, Parenteau J, Agarwal M, Worman HJ, Wellinger RJ, Pandita TK (2003) Human heterochromatin protein 1 isoforms HP1-alpha and HP1-beta interfere with hTERT-telomere interactions and correlate with changes in cell growth and response to ionizing radiation. *Molecular and Cell Biology* 23: 8363-8376

Slavotinek A, Rosenberg M, Knight S, Gaunt L, Fergusson W, Killoran C, Clayton-Smith J, Kingston H, Campbell RH, Flint J, Donnai D, Biesecker L (1999) Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J Med Genet* 36: 405-11

Slijepcevic P (2001) Telomere length measurement by Q-FISH. *Methods Cell Sci* 23: 17-22

Smith S, de Lange T (1997) TRF1, a mammalian telomeric protein. *Trends Genet* 13(1): 21-26

Song K, Jung Y, Jung D, Lee I (2001) Human Ku70 interacts with heterochromatin protein 1-alpha. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 8321-8327

Stansel R, de Lange T, Griffith JD (2001) T-loop assembly *in vitro* involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO* 20: 5532-5540

Steinmüller J, Schleiermacher E, Scherthan H (1993) Direct detection of repetitive whole chromosome paint and telomere DNA probes by immunogold electron microscopy. *Chromosome Res* 1: 45-51

Svenson U, Roos G (2009) Telomere length as a biological marker in malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1792: 317-323

Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, Aviv A, Spector TD (2005) Obesity, cigarette smoking, and telomeres length in women. *Lancet* 366:662-664

van Steensel B, de Lange T (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385: 740-743

van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92: 401-413

Veldman T, Etheridge KT, Counter CM (2004) Loss of hPot1 Function Leads to Telomere Instability and a cut-like Phenotype. *Curr Biol.* 14: 2264-2270

Wang RC, Smogorzewska A, de Lande T (2004) Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 119: 355-368

Watson JD (1972) Origin of concatameric T4 DNA. *Nature* 239: 197-201.

Wright WE, Tesmer VM, Liao ML, Shay JW (1999) Normal human telomeres are not late replicating. *Exp Cell Res* 251: 492-499

Yoshimura SH, Maruyama H, Ishikawa F, Ohki R, Takeyasu K (2004) Molecular mechanisms of DNA end-loop formation by TRF2. *Genes to Cells* 9: 205-218

Zakian VA (2012) Telomeres: The beginnings and ends of eukaryotic chromosomes. *Exp Cell Res* 318: 1456-1460