



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LOS TERRITORIOS CROMOSÓMICOS EN LOS QUE SE
ENCUESTRAN LOS GENES *BCR* Y *ABL1* Y SU ASOCIACIÓN CON LA GENERACIÓN
DE LA TRANSLOCACIÓN $t(9;22)$ EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

EUNICE FABIAN MORALES

DIRECTOR DE TESIS

**DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

COMITÉ TUTOR

**DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DR. FÉLIX RECILLAS TARGA
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

CIUDAD DE MÉXICO, MÉXICO. ABRIL 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**CARACTERIZACIÓN DE LOS TERRITORIOS CROMOSÓMICOS EN LOS QUE SE
ENCUENTRAN LOS GENES *BCR* Y *ABL1* Y SU ASOCIACIÓN CON LA GENERACIÓN
DE LA TRANSLOCACIÓN t(9;22) EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.**

Eunice Fabian Morales
Ciudad de México
Marzo 2022

El presente proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas y en la Unidad de Aplicaciones Avanzadas en Microscopía (ADMiRA) - Red de Apoyo a la Investigación (RAI)-UNAM, ambos localizados en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), bajo la tutela del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo.

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Beca Número IN208815, con apoyo adicional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y Fondos sectoriales del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), UNAM, México.

Eunice Fabian-Morales fue becaria del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, y contó con el apoyo de la beca CONACYT número 281183, CVU 488227.

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 FUNDAMENTOS DE ARQUITECTURA GENÓMICA Y FUNCIÓN	10
1.1.1 ORGANIZACIÓN DEL GENOMA	10
1.1.2 ELEMENTOS BÁSICOS DE LA ORGANIZACIÓN DEL GENOMA	10
1.1.2.1 Asas de cromatina	11
1.1.2.2 Dominios Topológicamente Asociados (TADs).....	12
1.1.2.3 Compartimientos	13
1.1.2.4 Territorios Cromosómicos	13
1.1.3 TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA ARQUITECTURA GENÓMICA.....	15
1.1.3.1 Hibridación fluorescente in situ (FISH)	15
1.1.3.2 Microscopía de Súper-resolución.....	16
1.1.3.2.1 Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM).....	16
1.1.3.2.2 Localización y Composición de una sola molécula (SMLM)	18
1.1.3.2.3 Reducción de la Emisión Estimulada (STED)	18
1.1.3.3 Captura conformacional de cromosomas	19
1.1.4 TERRITORIOS CROMOSÓMICOS (CTs)	20
1.1.4.1 Historia	20
1.1.4.2 Concepto y organización de CTs	23
1.1.4.3 Interacciones y solapamiento/intermingling entre CTs	25
1.1.4.4 Solapamiento entre CTs heterólogos y regulación genómica	26
1.1.4.5 Impacto de la organización de CTs en la formación de translocaciones....	28
1.2 TRANSLOCACIÓN T(9;22)	30
1.3 LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC)	31
1.3.1 DIAGNÓSTICO.....	32
1.3.2 FACTORES PRONÓSTICO	33
1.3.3 TRATAMIENTO.....	34
1.3.3.1 Imatinib	35
1.3.3.2 Dasatinib	35
1.3.3.3 Nilotinib.....	36

1.3.3.4 Bosutinib	36
1.3.3.1 Ponatinib	37
1.3.3 RESISTENCIA AL TRATAMIENTO	37
2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN	39
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
2.2 HIPÓTESIS.....	39
2.3 OBJETIVO.....	39
3. METODOLOGÍA	40
3.1 CAPTACIÓN DE MUESTRAS	40
3.2 DEFINICIÓN DE CRITERIOS DE RESPUESTA	40
3.3 ANÁLISIS DE CARIOTIPO	41
3.4 AISLAMIENTO DE CÉLULAS CD34+	41
3.5 METODOLOGÍA CONVENCIONAL DE HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH)	42
3.6 FISH 3D	42
3.7 INMUNOFISH TRIDIMENSIONAL	43
3.8 MICROSCOPIA Y ADQUISICIÓN DE IMÁGENES	43
3.9 ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	44
3.9.1 DEFINICIÓN DE COMPARTIMIENTOS EN CTs.....	44
3.9.2 VOLUMEN DE CTs	44
3.9.3 FACTOR DE DESCOMPACTACIÓN DE LA CROMATINA (CDF)	45
3.9.4 CUANTIFICACIÓN DE LA OCUPACIÓN DE MARCAS POST-TRADUCCIONALES (MPTs) DE HISTONAS EN LOS CTs	45
3.9.5 DEFINICIÓN DE DISTANCIA MÍNIMA	45
3.9.6 DEFINICIÓN DE POSICIÓN RADIAL RELATIVA	45
3.9.7 DETERMINACIÓN DE LA UBICACIÓN DE LOS GENES DENTRO DE SU RESPECTIVO TC	46
3.9.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
4. RESULTADOS	47
4.1 RESUMEN GRÁFICO DE LOS RESULTADOS	67
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	68
6. PERSPECTIVAS	74

7. ANEXOS	75
7.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	75
7.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN.....	75
7.2 DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA DE PACIENTES CON LMC TRATADOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA (INCAN).....	77
7.3 MANEJO DE MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA (MO).....	80
7.4 MANEJO DE SANGRE PERIFÉRICA MOVILIZADA (MPB) DE INDIVIDUOS SANOS	80
7.4.1 TRASPLANTE DE CÉLULAS TRONCALES HEMATOPOYÉTICAS	81
7.5 APROBACIÓN DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN POR PARTE DE LOS COMITÉS DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN DEL INCAN	83
7.6 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	85
7.6.1 PLANTILLA CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES	85
7.6.2 PLANTILLA CONSENTIMIENTO INFORMADO POBLACIÓN SANA	88
7.7 ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO	91
7.8 PUBLICACIONES GENERADAS DURANTE EL DOCTORADO	93
 8. REFERENCIAS.....	 94

RESUMEN

Durante interfase, el genoma humano está organizado en complejas estructuras de orden superior mediante el plegamiento del DNA en fibras de cromatina, dominios topológicamente asociados y, en última instancia, territorios cromosómicos (CTs). Esta organización proporciona una estructuración tridimensional del genoma no azarosa y que es funcionalmente importante para la regulación génica y el control de los programas de expresión génica. Los defectos en la organización global de los CTs son relevantes para los procesos fisiológicos y patológicos.

Una importante consecuencia funcional de la organización tridimensional no azarosa del genoma y en particular de los CTs, es la formación de translocaciones específicas de tejido observadas en cáncer. En este contexto, la formación de una translocación requiere la interacción física de los cromosomas involucrados, por lo que hay una mayor propensión de formar translocaciones entre los cromosomas espacialmente cercanos. Un ejemplo emblemático de estas aseveraciones, es la translocación $t(9;22)$ cuya génesis se ha asociado con la organización topológica del núcleo.

La translocación $t(9;22)$ origina el cromosoma filadelfia, y esta sola aberración cromosómica tiene un papel crítico en la patogénesis de la leucemia mieloide crónica (LMC) dado que, la fusión de los genes *BCR* y *ABL1* codifica una proteína quimérica con actividad constitutiva de cinasa de tirosina (TK), la cual dirige a la transformación leucémica de células troncales hematopoyéticas. El Imatinib es un inhibidor de TK (TKI) y se usa como tratamiento de primera línea para la LMC y aunque ha mejorado el pronóstico de pacientes con LMC, aproximadamente el 40% de estos no responden.

Por otro lado, la hibridación *in situ* con fluorescencia tridimensional (3D-FISH), las tecnologías de imágenes de alta resolución como la microscopía de iluminación estructurada 3D (3D-SIM) y la reconstrucción de imágenes han demostrado ser herramientas poderosas y eficientes para analizar la disposición espacial de la cromatina en el núcleo. Utilizando estas tecnologías, el objetivo de este trabajo de investigación fue analizar las propiedades topológicas de los CTs 9 y 22, así como los genes *BCR* y *ABL1* implicados en la translocación $t(9;22)$, en células troncales hematopoyéticas (CD34+) de pacientes con LMC. Estudiamos las células CD34+ de la médula ósea de pacientes con LMC en el momento del diagnóstico y de pacientes después del tratamiento con TKI; estos pacientes se subdividieron en respondedores y no respondedores en función de su respuesta clínica al tratamiento de primera línea con TKI.

Nuestros resultados evidencian diferencias extraordinarias en la organización topológica de CT9 y CT22 entre los grupos de pacientes con LMC respondedores y no respondedores. La diferencia topológica más relevante y evidente fueron los niveles consistentemente altos de alteraciones estructurales de CT9 y CT22 observados en las células CD34+ de pacientes que no respondieron al tratamiento con TKI.

Nuestros hallazgos sugieren que la disociación a gran escala de los CT9 y CT22 se correlaciona con la respuesta clínica de los pacientes con LMC y tiene el potencial de funcionar como marcador pronóstico en esta enfermedad y proporcionar nuevos conocimientos sobre los mecanismos subyacentes a la resistencia a los inhibidores de la cinasa de tirosina en la LMC. Así mismo, resulta plausible sugerir la LMC como un modelo para comprender las implicaciones funcionales de la topología del genoma.

ABSTRACT

During interphase, the human genome is organized into complex higher-order structures by folding DNA into chromatin fibers, topologically associated domains, and ultimately chromosome territories (CTs). This organization provides a nonrandom, three-dimensional structuring of the genome that is functionally important for gene regulation and control of gene expression programs. Defects in the global organization of CTs are relevant to physiological and pathological processes.

An essential functional consequence of the nonrandom three-dimensional organization of the genome, particularly CTs, is the occurrence of tissue-specific translocations observed in cancer. In this context, the formation of a translocation requires the physical interaction of the involved chromosomes; therefore, their localization relative to each other in the nucleus may contribute to determining which chromosomes undergo translocations. An emblematic example of these assertions is the translocation $t(9;22)$, whose genesis has been associated with the topological organization of the nucleus.

The $t(9;22)$ translocation forms the “Philadelphia” chromosome, and this sole chromosome aberration has a critical role in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia (CML) since the newly formed BCR-ABL1 fusion gene codifies for a chimeric protein with constitutive tyrosine kinase (TK) activity. The constitutive activity of this chimeric kinase drives the leukemic transformation of hematopoietic stem cells. Imatinib is a potent competitive TK inhibitor (TKI) used as the first-line treatment for CML, and although it has improved the prognosis of CML patients, approximately 40% do not respond.

On the other hand, three-dimensional fluorescent *in situ* hybridization (3D-FISH) has been developed to preserve the original structure of the nucleus and analyse its three-dimensional organization. Likewise, high-resolution imaging technologies such 3D structured illumination microscopy (3D-SIM) and image reconstruction have proven to be powerful and efficient tools for analysing the spatial arrangement of chromosomes in the nucleus.

Using 3D-FISH and 3D-SIM technologies the objective of the present research focused on analysing the topological properties of CT9 and CT22, as well as the *BCR* and *ABL1* genes involved in the $t(9;22)$ translocation, in CD34+ cells from CML patients. We studied bone marrow (BM) CD34+ cells from patients with CML at the time of diagnosis and from patients with TKI treatment, patients were further subdivided into responders and non-responders based on their clinical response to TKI-first line treatment (TKI-R and TKI Non-R, respectively).

Strikingly, significant differences in the topological organization of CTs9 and 22 were observed between both responders and non-responders groups. The most relevant and evident topological difference was the consistently high levels of disruption of the CT9 and CT22 compartments observed in CD34+ cells from patients that did not respond to TKI treatment.

Our findings suggest that large-scale disruption of CT9 and CT22 correlates with clinical response in CML patients, which could be translated into a potential prognostic marker of response to treatment in this disease and provide novel insights into the mechanisms underlying TKI resistance in CML. Likewise, it is plausible to suggest the LMC as a model to understand the functional implications of the topology of the genome.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fundamentos de arquitectura genómica y función

La organización del genoma en el núcleo es un proceso altamente organizado y asociado a la regulación génica y a la función celular. En la gran mayoría de los organismos eucariontes, la información hereditaria es almacenada, transcrita, y replicada en el núcleo celular. Para acomodar el genoma en un espacio confinado como el núcleo, el material genético – alrededor de 2 metros de DNA en células humanas – debe ser organizado y compactado a múltiples niveles. Además de ello, la organización del genoma implica la ejecución precisa y coordinada de los programas de expresión génica, los cuáles deben ser llevados a cabo en el tejido y estirpe celular adecuados.

1.1.1. Organización del Genoma

El genoma eucarionte está organizado a múltiples niveles. La molécula de DNA se envuelve alrededor de proteínas histonas que forman la fibra de cromatina. La cromatina por su parte, auto-interactúa para formar las asas de cromatina que median la interacción de los elementos regulatorios en *cis* del DNA (1). El siguiente nivel de la organización del genoma son los dominios de cromatina, definidos por la interacción preferencial entre ellos más que con secuencias circundantes, estos son denominados como dominios asociados topológicamente (TADs, por sus siglas en inglés) (2,3). Los TADs se arreglan dentro de compartimientos considerados de alto-orden. Este nivel de organización es morfológicamente evidente en la segregación espacial de la cromatina en compartimientos, que fueron clasificados como compartimientos A (regiones de eucromatina poco condensadas y generalmente transcripcionalmente activos) y B (regiones de heterocromatina condensada y generalmente transcripcionalmente inactivos) (3,4).

Finalmente, los cromosomas son la unidad mayor de la organización del genoma, y existen en el núcleo interfásico en forma de territorios cromosómicos (CTs, por sus siglas en inglés). Durante la interfase el DNA que conforma un solo cromosoma ocupa un territorio compacto y espacialmente restringido (5,6). La posición y organización de cada CT no es azarosa y es específica de tejido y tipo celular (7) (**Figura 1**).

1.1.2 Elementos básicos de la organización del genoma

Se considera como elementos básicos de organización del genoma a las fibras, asas de cromatina (o bucles), dominios y compartimientos que forma la cromatina, así como los territorios cromosómicos (conformación en interfase) y cromosomas (conformación en mitosis). Estos elementos organizan los genomas en múltiples niveles y escalas de longitud (**Figura 1**).

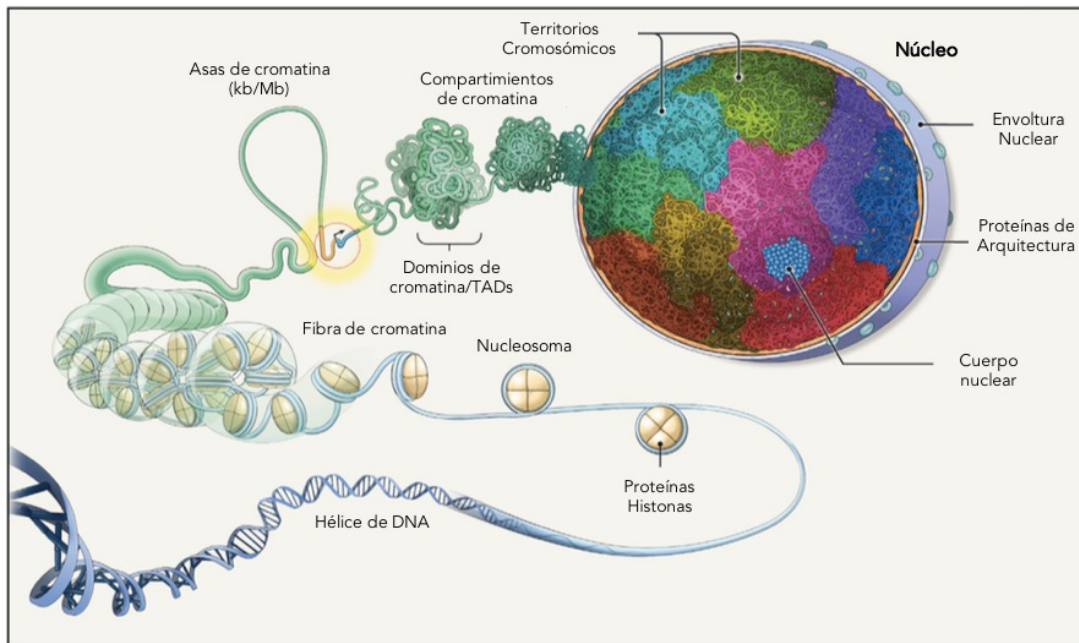


Figura 1. Organización del genoma eucarionte. Figura modificada de Misteli, T. 2020 (8).

1.1.2.1 Asas de cromatina

Para comenzar, tenemos la fibra de cromatina la cual está formada por unidades de 146 pares de bases (pb) de DNA envuelto alrededor de nucleosomas que consisten de octámeros de proteínas histonas centrales (9). Aunque la naturaleza precisa de la fibra de cromatina ha sido ampliamente debatida, las observaciones recientes utilizando diversos métodos, incluida la visualización en células intactas mediante el uso de microscopía electrónica (ME), respaldan que el diámetro de la fibra de cromatina es de alrededor de 5 a 24 nm en todo el núcleo y se pliega irregularmente en estructuras de orden superior, como asas y dominios (10,11). Consecuentemente, la fibra de cromatina auto-interactúa para formar asas; estas asas de cromatina son una característica universal de los genomas en la mayoría de los organismos y se ha reconocido que su tamaño varía desde kilobases (kbs) a megabases (Mbs), además de desempeñar múltiples funciones (12). A pequeña escala, las asas median la interacción de los elementos reguladores, ejemplo de ello es la acción de potenciadores (conocido en el argot científico como enhancers) sobre promotores de genes, cuyas distancias van de 10 a varios cientos de kbs. Múltiples enhancers pueden enlazarse para formar grupos de súper-enhancers, que se propone integran eventos de señalización o actúan de manera redundante en genes objetivo (13) (Figura 2).

Las asas de cromatina más grandes, de hasta Mbs de longitud, contribuyen a la compactación del genoma y regulan de manera precisa tanto espacial como temporalmente grupos de genes. Este tipo de regulación es particularmente común en los genes regulados durante el desarrollo, los cuales requieren un control espacial y temporal coordinado y preciso (14).

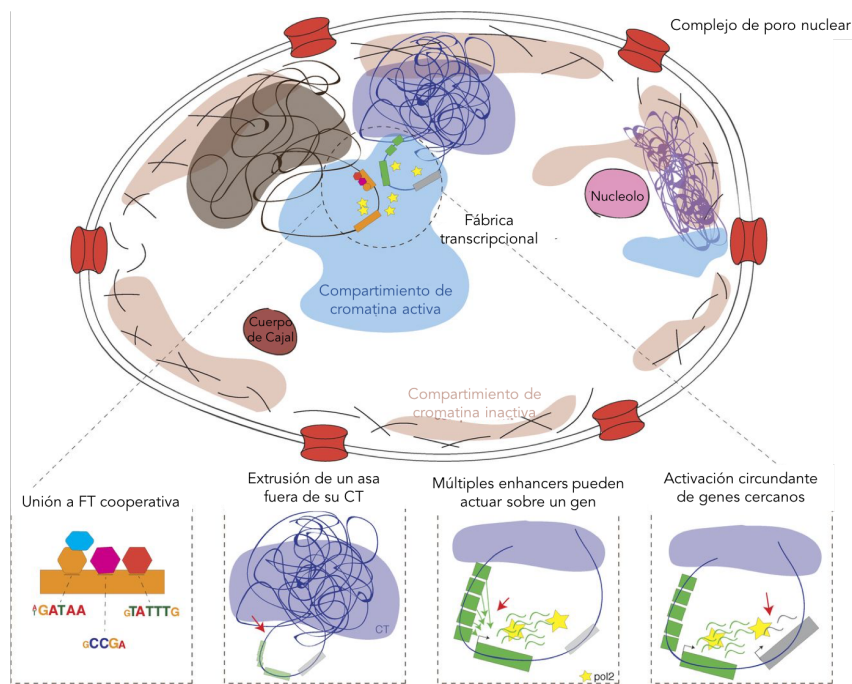


Figura 2. El posicionamiento en el espacio nuclear y las asas de cromatina influyen en la actividad transcripcional. Existe una relación entre el posicionamiento de los elementos dentro del núcleo y el nivel de expresión génica. La cromatina en conformación cerrada se asocia a una represión en la actividad transcripcional y regularmente se posiciona en la periferia nuclear, mientras que las secuencias de ADN activas transcripcionalmente tienden a ubicarse hacia el centro del núcleo. En interfase, los cromosomas ocupan distintos CT y las secuencias que contienen genes pueden proyectarse fuera de su correspondiente CT hacia otras regiones para agregarse a otros sitios de actividad transcripcional comparable. Los elementos reguladores, como los enhancers, sirven como plataformas de unión para los factores de transcripción (FT), y la interacción con genes blanco-distantes es regulada por los contactos de cromatina de largo alcance (asas). Un gen puede ser activado por múltiples enhancers, y el movimiento a sitios nucleares específicos puede causar cambios en la expresión de genes cercanos no relacionados, un proceso llamado activación circundante o 'bystander'. Figura modificada de Vermunt M, et al. 2018. (12)

1.1.2.2 Dominios topológicamente asociados (TADs)

El siguiente nivel de organización del genoma son los dominios de cromatina (**Figura 3**). Estos dominios fueron inicialmente descritos morfológicamente mediante experimentos de hibridación *in situ* (5,15) y posteriormente, su ubicuidad se confirmó mediante metodologías que incluyen ensayos bioquímicos de entrecruzamiento en todo el genoma (2). Dado que representan regiones del genoma que interactúan preferentemente entre sí en lugar de con las secuencias circundantes, se denominaron dominios asociados topológicamente (TADs) (3).

Generalmente, el tamaño de los TADs abarca cientos de kb y se forman mediante un mecanismo de extrusión de asas, en el que el complejo de cohesinas impulsa la formación de asas de cromatina a través de su actividad motora dependiente de ATP (16). El asa de cromatina extruido luego se pliega sobre sí mismo para formar un dominio cuyos límites están

definidos por la proteína CTCF, considerada como un factor muy importante en la arquitectura de la cromatina (17). Con respecto a la función, se ha propuesto que los límites del dominio sirven para restringir las interacciones de los elementos reguladores con los genes dentro del dominio, generando así unidades reguladoras y proporcionando un marco estructural para la regulación precisa de los genes y facilitan las interacciones cromatina-cromatina (17,18).

1.1.2.3 Compartimientos

Los dominios de cromatina individuales tienden a ensamblarse en compartimientos de cromatina de orden superior. Este nivel de organización es morfológicamente evidente en la segregación espacial de heterocromatina y eucromatina (19). De acuerdo con las observaciones citológicas, los análisis bioquímicos de todo el genoma han asignado cada *locus* genómico, en función de la frecuencia de las interacciones de largo alcance, a uno de los dos compartimientos nucleares, A o B, que corresponden prácticamente a la eucromatina y la heterocromatina, respectivamente (17,19).

El empaquetamiento o nivel de condensación diferencial de estos compartimientos está altamente regulado por varias modificaciones epigenéticas en los residuos de aminoácidos de las proteínas histonas y no histonas y sus variantes. Por ejemplo, el aumento de la acetilación de los residuos de la cola de aminoácidos de histonas centrales da como resultado una estructura de cromatina más abierta y flexible; alternativamente, la metilación de los residuos de aminoácidos de las proteínas histonas centrales facilita la unión de las proteínas de heterocromatina para formar estructuras de heterocromatina condensadas. De esta manera, como se muestra en la **Figura 1**, la secuencia de DNA de 1 m de largo se condensa en un territorio cromosómico (CT, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 1 a 2 mm de diámetro en un núcleo en interfase (**Figura 3**) (20).

Mediante mapeo bioquímico se ha determinado que la organización de dominios también está indicada por la detección de interacciones entre TADs adyacentes (21), y los estudios de imágenes han documentado la coalescencia de múltiples dominios en estructuras de orden superior (4).

1.1.2.4 Territorios cromosómicos (CTs)

Se considera que el último nivel de organización del genoma son los cromosomas, estos son la unidad principal de organización del genoma y existen en el núcleo interfásico en forma de territorios cromosómicos (CTs). A lo largo de la interfase, el DNA que forma un solo cromosoma ocupa un territorio relativamente compacto y espacialmente restringido del núcleo en lugar de estar disperso a través del espacio nuclear (**Figura 1 y 3**) (5).

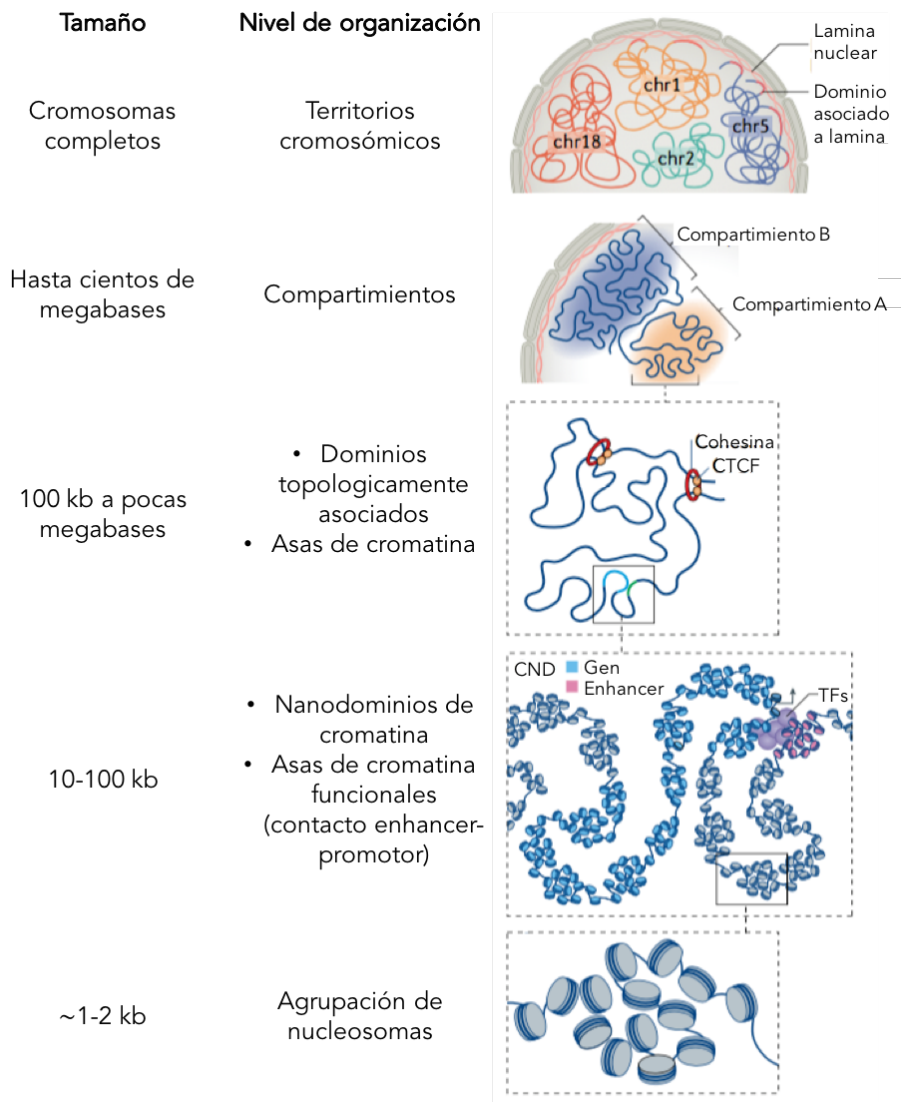


Figura 3. Niveles múltiples de organización del genoma eucarionte y tamaño relacionado. El DNA se pliega en múltiples escalas (indicadas a la izquierda) para construir cromosomas. El DNA que se enrolla alrededor de las histonas forma nucleosomas, que se organizan en agrupaciones, cada uno de los cuales contiene ~1–2 kb de DNA. Las agrupaciones de nucleosomas forman nanodominios de cromatina (CND) de ~100 kb de tamaño, donde tienen lugar la mayoría de los contactos entre enhancer-promotor. En la escala de ~ 1 Mb, los CND y las asas de cromatina dependientes de cohesina y del factor de unión a CCCTC (CTCF) forman dominios topológicamente asociados (TAD). En la escala más alta hasta cientos de megabases, la cromatina se segrega en compartimientos con genes activos y genes inactivos (A y B, respectivamente). En el nivel topológico más alto, el núcleo está organizado en territorios cromosómicos. Figura modificada de Jerkovic I and Cavalli G. 2020 (22)

En general , las características fundamentales de la organización del genoma han surgido a partir de un abordaje que ha empleado en principio la microscopía, para documentar características sub-nucleares a gran escala, como por ejemplo, los bloques de heterocromatina morfológicamente reconocidos, la existencia de cuerpos subnucleares, y la organización del DNA en CTs (8). Complementariamente, enfoques bioquímicos, basados en

el entrecruzamiento de la cromatina, han proporcionado un panorama molecular de la topología genómica y han demostrado la existencia de dominios y asas de cromatina como características fundamentales de la organización genómica (17). A continuación, se hace referencia a algunas técnicas que se han utilizado para el estudio de la arquitectura genómica y que han sido de vital importancia para el estudio y reconocimiento de lo que se consideran elementos básicos de organización del genoma.

1.1.3 Técnicas para el estudio de la arquitectura genómica

El estudio de la arquitectura nuclear y la organización de la cromatina en el núcleo ha sido fundamental para comprender su función y aunque aún falta mucho por discernir, se han desarrollado diversas tecnologías que han aportado grandes avances en este rubro. Dado lo extenso del tema (para una revisión profunda ver (22)), nos centraremos en las técnicas que se abordan en el presente estudio, que incluyen la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la microscopía de súper resolución. Adicionalmente, daremos una introducción general a la metodología que ha representado un gran avance en la biología de la cromatina, denominada captura conformacional de cromosomas (3C), la cual ha sentado las bases para el desarrollo de nuevas metodologías que han contribuido en gran medida al conocimiento actual de la arquitectura nuclear.

1.1.3.1 Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Tradicionalmente, las interacciones y posicionamiento de regiones genómicas, así como la observación precisa de estructuras, se han detectado mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Esta técnica implica la fijación química de las células, la desnaturalización de la cromatina y el marcaje de sitios blanco mediante la hibridación con sondas fluorescentes. Esto permite la visualización de genes específicos, regiones genómicas o cromosomas completos mediante microscopía de fluorescencia. En esta técnica, las regiones genómicas se detectan como señales fluorescentes brillantes y el uso de etiquetas multicolores permite la detección simultánea de diferentes *loci*. Las distancias entre los puntos fluorescentes se pueden medir para proporcionar información sobre la proximidad de las regiones investigadas, por ejemplo, este enfoque se utilizó para analizar la organización del gen *IgH* durante la recombinación VDJ (23).

La técnica de FISH permitió por vez primera la visualización de los CTs, demostrando su existencia, así como el solapamiento que ocurre en los bordes de estos. Así mismo, la técnica de FISH hizo posible la observación de que las regiones cromosómicas ricas en genes transcripcionalmente activos se encuentran en gran medida en el interior nuclear, mientras que las regiones cromosómicas ricas en genes inactivos se localizan en gran medida en la periferia nuclear (24–27).

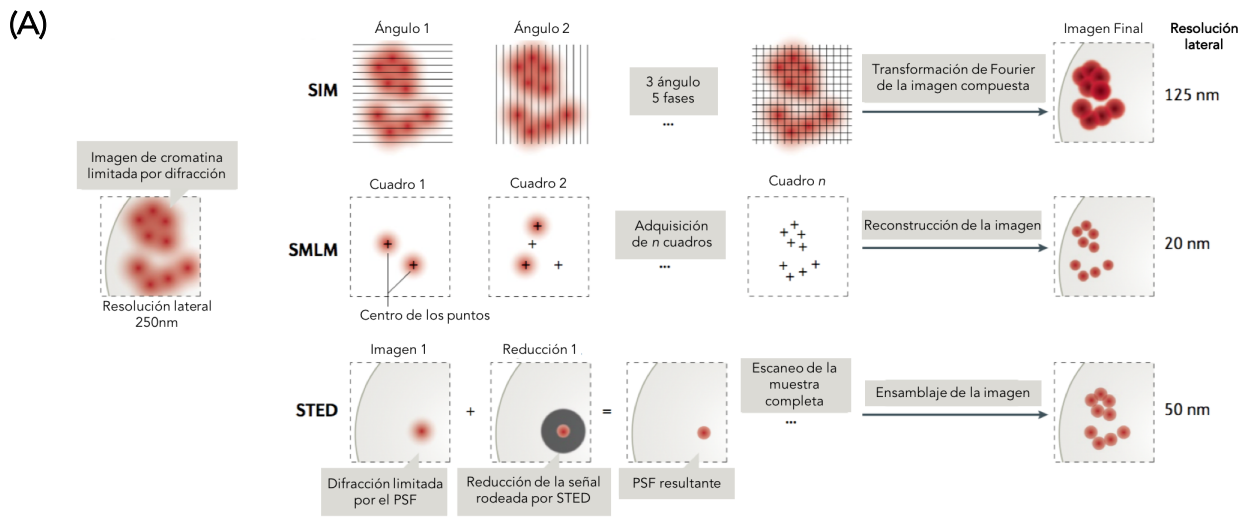
La ventaja de la técnica de FISH es la capacidad de interrogar las interacciones a nivel de una sola célula, lo que permite determinar la fracción de células en una población que alberga una interacción particular. Sin embargo, los métodos basados en FISH pueden verse limitados por el bajo número de *loci* que pueden ser hibridados simultáneamente debido al escaso número de canales de fluorescencia independientes disponibles, y por la resolución espacial limitada de los microscopios ópticos tradicionales. Estas limitaciones se han eliminado gracias a los importantes avances tecnológicos en las aplicaciones de microscopía óptica.

1.1.3.2 Microscopía de Súper-resolución

La luz emitida por cualquier fuente puntual se difracta de tal manera que el punto aparecerá en una imagen como el llamado patrón de difracción aérea, cuyo tamaño es proporcional a la longitud de onda. En la práctica, esta propiedad de la luz, junto con las aberraciones de los sistemas ópticos y la dispersión de la luz, limita la resolución (la distancia mínima a la que se pueden distinguir dos señales), siguiendo una fórmula derivada por el físico Ernst Abbe, a aproximadamente 250 nm en los ejes 'x' e 'y' (resolución lateral) y 600 nm en el eje 'z' (resolución axial), incluso utilizando los mejores microscopios confocales y software de procesamiento de imágenes. Durante décadas, se creía que la resolución de la microscopía de luz estaba intrínsecamente limitada por la difracción, pero las tecnologías de imagen han progresado a una velocidad notable, lo que ha permitido la detección de un número cada vez mayor de componentes nucleares a una resolución espacial que supera el límite de Abbe (22). Estos métodos, denominados colectivamente microscopía de súper-resolución, aumentan la resolución espacial de tres maneras diferentes que incluyen la Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM, por sus siglas en inglés), la microscopía de localización de una sola molécula (SMLM, por sus siglas en inglés) y la Reducción de la Emisión Estimulada (STED, por sus siglas en inglés), dichas metodologías se esquematizan y detallan las características técnicas diferenciales de cada una en la **Figura 4**.

1.1.3.2.1 Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM)

El procedimiento de obtención de una imagen por microscopía SIM incluye la iluminación de una muestra con una serie de patrones en rayas sinusoidales de alta frecuencia espacial conocidos como patrón Moiré (**Figura 4A**). Estos patrones son generados por un láser que pasa a través de una rejilla óptica móvil y que se proyecta a través del objetivo sobre la muestra. El movimiento de esta rejilla disminuye la difracción de la luz y genera patrones con diferentes orientaciones los cuales son capturados por el microscopio (**Figura 4**).



(B)

	Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM)	Reducción de la Emisión Estimulada (STED)	Microscopía de localización de una sola molécula (SMLM)
Principio	Usan patrones de luz interferida para crear un efecto Moire a partir del cual la información de de alta resolución puede ser extraída	Reduce el volumen de excitación efectivo con un láser de agotamiento	Activa estocásticamente un subconjunto de sondas fotoactivables a la vez, y entonces determina la posición del centroide de cada función de dispersión de puntos
Tipo de microscopía	Iluminación de campo amplio	Confocal de escaneo laser	Iluminación de campo amplio
Resolución xy	100-130 nm	20-70 nm	10-30 nm
Resolución axial	~300 nm	40-70 nm	10 – 75 nm
Sondas	Colorantes orgánicos foto-estables comunes y proteínas fluorescentes	Colorantes orgánicos fotostables particulares y proteínas fluorescentes	- Proteínas fluorescentes fotoactivables - Colorantes orgánicos fotoactivables
Resolución temporal	Milisegundos a segundos	Milisegundos a segundos	Segundos a minutos
Fotodaño	Bajo a moderado	Moderado a alto	Moderado
Fotobleaching (Fotobleaching)	Moderado a alto	Moderado a alto	Alto para fluoróforos sencillos, bajo en general
Imágenes en células en vivo	Si	Si	Si
Procesamiento de imágenes post-captura	Si	No	Si
Número máximo de colores simultaneos	4	3	3
Consideraciones	Preparación de muestras. El algoritmo de reconstrucción puede causar artefactos	La mejor resolución temporal en la resolución espacial más alta; sin embargo, puede ser a expensas de la resolución axial	La resolución espacial más alta; sin embargo es sensible a densidad del marcaje. La interferencia entre fluoróforos puede ser un problema

Figura 4. Métodos de microscopía de súper-resolución empleados en la investigación del genoma 3D. (A) Las técnicas de microscopía de súper-resolución superan el límite de difracción utilizando diferentes enfoques. En la microscopía de iluminación estructurada (SIM), la muestra se expone a una serie de iluminación no uniforme desde diferentes ángulos y fases axiales. El patrón de luz resultante se analiza mediante la transformación de Fourier para lograr una reconstrucción matemática final de la imagen, que mejora la resolución lateral y axial al doble. La microscopía de localización de una sola molécula (SMLM) utiliza una energía de excitación baja que provoca una excitación estocástica de los fluoróforos fotoconmutables para la localización precisa del centro de emisión. Se toman imágenes secuenciales de la muestra, en las que los fluoróforos se vuelven brillantes u oscuros, y la imagen final se crea mediante una superposición de todos los ciclos de imágenes. En la mayoría de las aplicaciones prácticas, este método produce una resolución lateral de hasta 20 nm. La reducción de emisiones estimuladas (STED) se realiza a través de la combinación de dos láseres: un láser de excitación que ilumina la muestra en el medio y un haz de agotamiento o reducción en forma de rosquilla que reduce la señal circundante. En la práctica, STED alcanza una resolución lateral de unos 50 nm y una resolución axial de alrededor de 80-600 nm. (B) Características técnicas diferenciales de los métodos de microscopía de súper-resolución. Figura modificada de Jerkovic I and Cavalli G. 2020 y López-Saavedra, et. al. 2019 (22,28).

La imagen generada es luego procesada usando algoritmos computacionales, los cuales estiman los parámetros para discernir los componentes superpuestos en la imagen, obteniendo de este modo una imagen de alta resolución (28). Con la tecnología SIM es posible capturar imágenes tridimensionales con una resolución lateral aumentada dos veces más comparado con el límite de difracción clásico. Por lo tanto, con 3D-SIM se puede resolver un volumen aproximadamente ocho veces menor en comparación con la microscopía convencional (28).

1.1.3.2.2 Localización y Composición de una sola molécula (SMLM)

Otro enfoque desarrollado para superar la difracción de la luz es el método de microscopía de localización de una sola molécula. Este método se basa en el fotoencendido de los fluoróforos entre un estado 'encendido' y 'apagado' (**Figura 4**). Este fotoencendido estocástico ofrece la posibilidad de que solo un subconjunto aleatorio de fluoróforos activados puedan ser lo suficientemente escasos para ser resueltos ópticamente en un momento determinado. En cada ciclo de formación de imágenes un subconjunto disperso de fluoróforos es activado y ópticamente resuelto, lo que permite que sus posiciones se determinen con precisión después del análisis de las imágenes por un algoritmo matemático. En última instancia, las imágenes de súper resolución se reconstruyen mediante la integración de la información de la posición de miles de marcos. La precisión de localización de esta técnica depende de que se capturen suficientes fotones en cada evento de activación y por tanto, de la confiabilidad de los fluoróforos utilizados (28).

1.1.3.2.3 Reducción de la Emisión Estimulada (STED)

En esta microscopía se usa una fuente de luz, llamada luz de agotamiento, la cual lleva un fluoróforo excitado al estado de energía más bajo (es decir, el estado basal) antes de que pueda emitir una señal de fluorescencia. En la práctica, la luz de agotamiento se aplica como un patrón que rodea el punto focal del láser de excitación. Este haz de agotamiento tiene una forma de rosquilla con una intensidad cero en el centro, generado por el paso a través de una placa apropiada. Esto reduce el tamaño de la región de excitación en las moléculas que emiten fluorescencia, como si el "punto focal" del láser estuviera afilado. Al escanear este punto afilado a través de una muestra, se puede grabar una imagen de súper resolución (**Figura 4**). No se requiere de ningún procesamiento posterior a la adquisición. En muestras biológicas, las imágenes STED han alcanzado una resolución de 20 nm cuando se usan colorantes orgánicos y una resolución de 50–70 nm cuando se usan proteínas fluorescentes (28).

1.1.3.3. Captura conformacional de cromosomas

Paralelamente al progreso tecnológico de la microscopía de súper resolución, se han desarrollado enfoques bioquímicos que mapean las interacciones físicas del genoma. El método considerado como pionero, es denominado captura conformacional de cromosomas o 3C, el cual usa la ligación proximal de secuencias para cuantificar la frecuencia en la que dos *loci* genómicos se encuentran en cercanía.

Subsecuentemente se derivaron otras técnicas que han expandido el número de contactos por pares se pueden sondear simultáneamente, como 4C ("uno a todos"), 5C ("muchos a muchos") y Hi-C ("todos a todos") y se denominan colectivamente métodos basados en 3C. La familia de técnicas de 3C es un conjunto de enfoques bioquímicos para determinar la interacción física de las regiones del genoma. Los enfoques de la tecnología C invariablemente involucran cinco pasos: (1) fijación con formaldehído para reticular la cromatina en los sitios de interacción física, (2) escisión de la cromatina por enzimas de restricción o sonicación, (3) ligación en condiciones diluidas que favorecen la ligación entre los extremos del DNA capturados en el mismo complejo sobre ligaciones de colisiones aleatorias, (4) detección de uniones de ligación utilizando pasos variables de biología molecular según la variante de los métodos y (5) análisis computacional para determinar las frecuencias de interacción capturadas en la ligadura de la cromatina entrecruzada (**Figura 5**) (29).

Las tecnologías C (3C, 4C, 5C, Hi-C) difieren en su forma de detección y el alcance de las interacciones que pueden investigar. El método 3C prueba la interacción entre dos sitios conocidos en el genoma, el 4C permite sondear secuencias desconocidos que interactúan de una secuencia cebo conocida, el 5C identifica todas las regiones de interacción dentro de un dominio del genoma dado y el Hi-C sondea todas las interacciones que ocurren de manera imparcial en todo el genoma. La elección del método depende en gran medida de la naturaleza específica y el alcance de la cuestión biológica, pero también de la disponibilidad de recursos, incluida la cantidad de material de partida y la capacidad de secuenciación. Se han desarrollado muchos derivados de las técnicas C estándar, a menudo inspirados en la cuestión biológica específica abordada o con el objetivo de mejorar la especificidad o reducir el fondo (**Figura 5**) (30).

Una desventaja que cabe mencionar de estas tecnologías es que se tratan de enfoques basados en una población completa que solo generan datos promedio y no pueden interrogar el comportamiento de células individuales o subpoblaciones. Sin embargo, actualmente se han extendido y mejorado las técnicas basadas en 3C al punto de poder mapear la organización 3D del genoma en células individuales (31). Estos avances representan una herramienta mucho más poderosa que, en conjunto con técnicas basadas en hibridación *in situ* y microscopía de súper-resolución ayudarán a resolver la cuestión de cómo se organizan espacialmente los genomas y sus mecanismos reguladores en un futuro cercano (22).

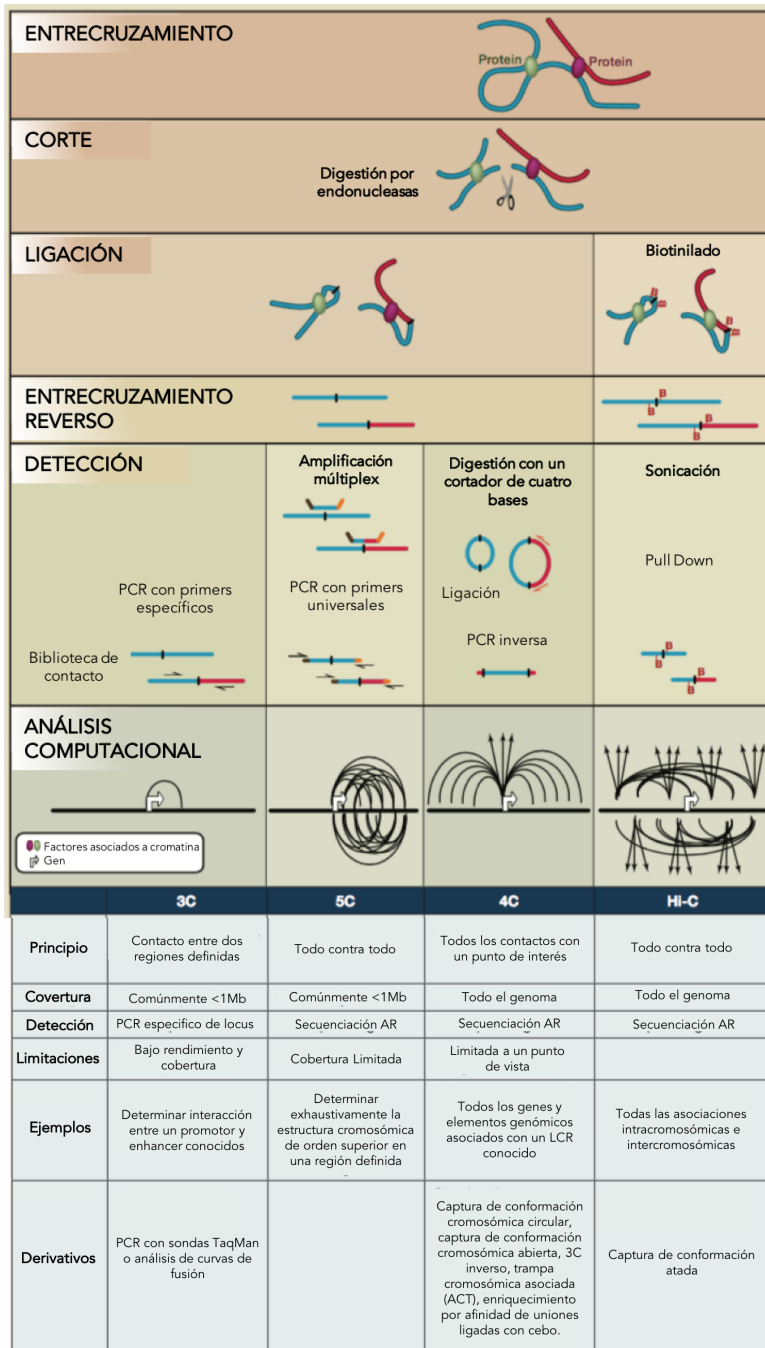


Figura 5. Comparación entre las técnicas derivadas de captura conformacional de cromosomas (3C) y sus derivados. Figura modificada de (30)

A continuación, y dado que es materia de estudio del presente trabajo de investigación, se profundizará en la historia y concepto de los territorios cromosómicos, así como en sus implicaciones fisiológicas en la estructuración del núcleo.

1.1.3. Territorios Cromosómicos

1.1.4.1 Historia

La teoría de los CTs fue propuesta por primera vez en 1885 por Carl Rabl, quién a partir de sus hallazgos, concluyó que cada cromosoma en interfase ocupa un territorio nuclear distinto.

Posteriormente, en 1905 Theodor Boveri propuso el término "territorios cromosómicos" para transmitir la idea de que los cromosomas conservan su individualidad a lo largo del ciclo celular, proporcionando así, la primera teoría formal de los CTs (32). Sin embargo, todas las conclusiones de Boveri se basaron en evidencia indirecta de la organización nuclear, evidencia poco aceptada por sus pares, sin embargo, una visualización directa de los CTs resultó imposible en ese tiempo. Las ideas de Boveri fueron rechazadas, y en su lugar, se apoya un modelo denominado de "espagueti", el cual argumentaba que las fibras de ADN de los cromosomas de los mamíferos se disgregan aleatoriamente en el núcleo durante la interfase y se agregaban de nuevo en forma de cromosomas al comenzar la mitosis.

La teoría de los CTs fue abandonada tras la falta de evidencia. Hasta 1977 se retomó el avance de este modelo en el trabajo desarrollado por Stephen M. Stack, David B. Brown y William C. Dewey. Los resultados de su experimento muestran evidencia de la existencia de los TCs. Después de un proceso de fijación con ácido acético, las células fueron tratadas con tripsina, fijadas, para inmediatamente después ser aplastadas para revelar la organización de la cromatina dentro del núcleo (**Figura 3**) (33). La huella dejada por la cromatina sugiere que los cromosomas no se encuentran disgregados en una masa uniforme, en cambio, se aprecia agrupaciones distintivas. Stack y colaboradores concluyeron que cada cromosoma permanece en un dominio distinto a lo largo del ciclo celular. Aunque en el artículo nunca se hace referencia a los CTs, estas evidencias fueron importantes en su posterior validación.

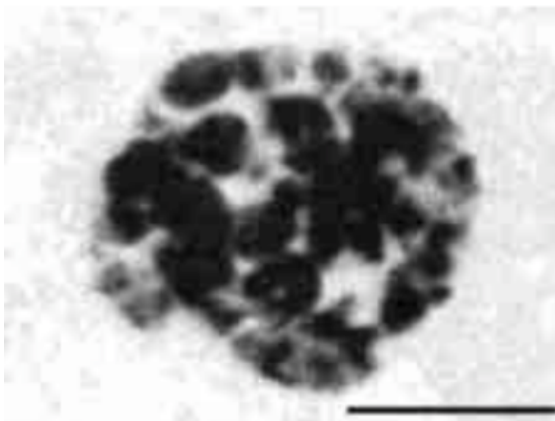


Figura 3. Evidencia de territorios cromosómicos proporcionada por Stephen B. Stack, David B. Brown y William C. Dewey (1977). El núcleo de una célula de hámster chino (línea CHO) en G1 muestra grupos de cromatina condensada que probablemente representan territorios cromosómicos . Barra correspondiente a 10 μ m (33).

No fue hasta 1982 que Thomas Cremer, un biólogo celular alemán, y su hermano, el físico Christoph Cremer, proporcionaron pruebas experimentales innovadoras para respaldar la hipótesis de los territorios cromosómicos.

Los Cremer se propusieron investigar la organización de los cromosomas en el núcleo en interfase utilizando un enfoque simple pero inusual. Microirradiaron un área estrecha de núcleos en interfase y los incubaron en un medio que contenía timidina radiomarcada, que se incorporaría a los cromosomas dañados a medida que se reparaban. Las áreas de nucleótidos radiomarcados incorporados marcaron el ADN recién sintetizado en las regiones irradiadas como "cicatrices plateadas", lo que hizo posible detectarlas más tarde en los cromosomas

mitóticos condensados mediante autorradiografía. Si los cromosomas estuvieran dispuestos al azar en el núcleo, como los espaguetis en un plato, estas cicatrices plateadas estarían esparcidas por muchos cromosomas. Sin embargo, si cada cromosoma ocupa un espacio distinto dentro del núcleo, las cicatrices se concentrarían en uno o solo unos pocos cromosomas, lo que probablemente represente territorios cromosómicos en las coordenadas nucleares microirradiadas (**Figura 4**).

El análisis de la distribución de las cicatrices mostró que el daño se localizaba solo en unos pocos cromosomas, favoreciendo así el modelo de territorios cromosómicos. Este experimento relativamente sencillo no solo demostró directamente las ideas propuestas hace décadas por Rabl y Boveri, sino que también representa un hito en la investigación de la arquitectura del genoma: la primera evidencia convincente de una disposición no aleatoria de los cromosomas en el núcleo de la interfase (5).

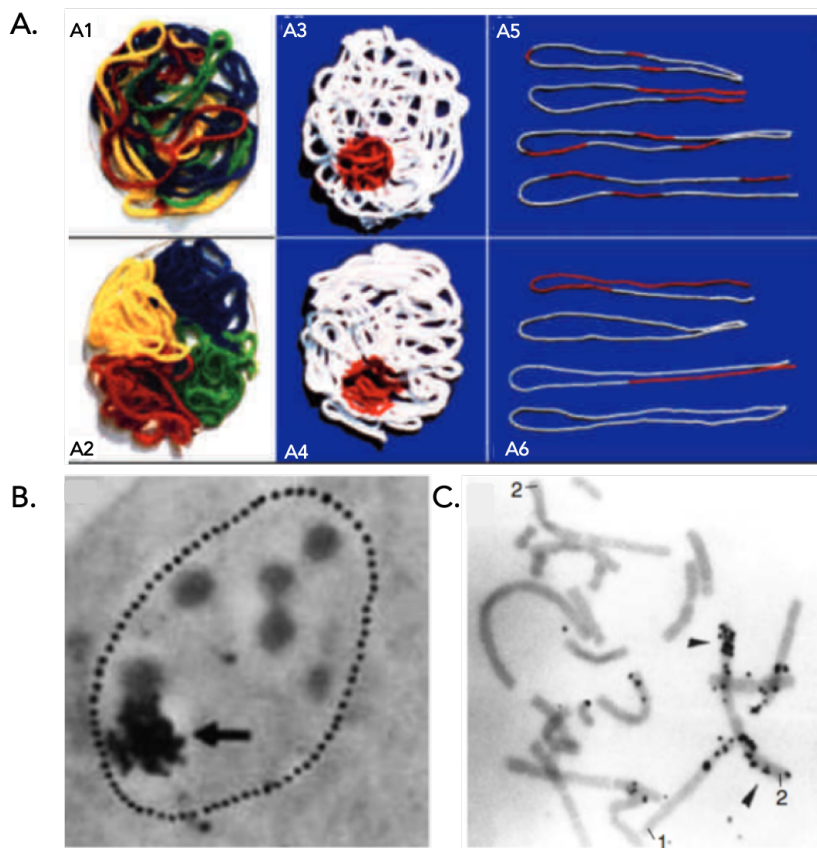


Figura 4. Evidencia experimental para una organización territorial de cromosomas interfásicos. **A.** Justificación experimental de los ensayos de microirradiación. La disposición de la cromatina de orden superior en el núcleo en interfase se compara con una madeja compuesta por varios hilos (cromosomas). Los ejemplos que se muestran no se refieren a una disposición cromosómica real de ningún tipo de célula en particular. **A1)** Los hilos se extienden y entremezclan **A2)** Cada hilo forma un territorio distinto. **A3 y A4)** Las disposiciones de los hilos que se muestran en A3 y A4 no se pueden distinguir cuando todos los hilos tienen el mismo color. Una pequeña parte de la madeja está marcada con color rojo. **A5 y A6)** Los hilos muestran marcas rojas después de desensamblar las madejas. La distribución de estas marcas muestra las regiones de los hilos ubicados juntos en las dos madejas. **(B).** Autorradiografía

de una célula diploide de hámster chino. El núcleo de la célula viva se microirradió en G1, se marcó con pulsos de timidina 3H y se fijó inmediatamente después. La flecha apunta a un grupo de granulos de plata detectados sobre el sitio de microirradiación. **(C).** Metafase del mismo experimento obtenido aproximadamente 40 horas después de la microirradiación. Un cromosoma 1 y un cromosoma 2 están intensamente marcados con granulos plateados, lo que indica que el microhaz golpeó los territorios respectivos durante la interfase, mientras que sus homólogos no están marcados, lo que argumenta en contra de la asociación espacial de los territorios homólogos. Figura modificada de Cremer T and Cremer M, et al. 2010 (5).

Desde entonces, comenzó un esfuerzo por desarrollar nuevas técnicas que permitieran visualizar uno o más cromosomas dentro del núcleo. Dicho esfuerzo rindió frutos con el inicio de técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés) al comienzo de 1980 (34). Esta metodología terminó por confirmar la presencia de CTs mediante el uso de sondas fluorescentes complementarias específicas a cada cromosoma. La evidente presencia de los CTs en el núcleo celular revolucionó nuestra comprensión de la organización del genoma en 3D y abrió nuevas interrogantes enfocadas a entender los mecanismos y factores involucrados en dicha organización.

1.1.4.2 Concepto y organización de CTs

Como se mencionó anteriormente la organización territorial de los cromosomas en interfase (CTs) constituye una característica básica de la arquitectura nuclear (5). Un CT se define como el espacio tridimensional que ocupa un cromosoma durante la interfase (35). La formación de los CTs se ha observado en una amplia gama de especies y tipos celulares mediante técnicas de FISH y técnicas basadas en captura conformacional de cromosomas (ver glosario) (5,36,37). En células de mamíferos, un CT generalmente presenta una forma esférica pero amorfa y se caracteriza por una alta relación superficie/volumen dado que su interior está permeado por una compleja red de canales anastomosados que se cree, facilitan el acceso de factores reguladores de la cromatina. Las fibras de cromatina de los cromosomas vecinos a menudo se sobrelapan (concepto discutido más adelante en el texto), pero no se entrelazan, creando así un continuo de cromatina en todo el espacio nuclear, aunque se ha observado una menor densidad de cromatina en las convergencias entre cromosomas (5,25).

Tras el establecimiento de los CTs como base para la organización del genoma en el núcleo celular, las investigaciones se centraron en comprender cómo se organizaban los CTs individuales dentro de la arquitectura tridimensional del núcleo. Como primer paso, se examinó la disposición radial relativa de los cromosomas con respecto a la periferia y el centro nuclear. Una pregunta fundamental era si los CTs estaban dispuestos al azar o si había un nivel de no aleatoriedad en sus posiciones dentro del núcleo. Estos estudios establecieron claramente un alto nivel de orden en el posicionamiento radial de CTs individuales en el núcleo (5,37–42).

Dado que la heterocromatina transcripcionalmente inactiva se localiza preferentemente a lo largo de la periferia nuclear, se analizó en detalle la relación de la posición periférica con la densidad génica y actividad transcripcional en cromosomas individuales. En un estudio inicial, se observó que el CT X (Xi) inactivo tenía una ubicación más periférica dentro del núcleo que su contraparte activa (Xa) (40,43,44). La relación entre el posicionamiento radial y la actividad génica también se puede demostrar en CTs que presentan una densidad génica baja, los cuales tienden a posicionarse hacia la periferia nuclear a diferencia de los CTs con alta densidad génica que son transcripcionalmente más activos. Por esta razón, varios estudios han

concluido que la densidad génica es el principal factor que contribuye al posicionamiento radial de los CTs (40,43,44). Por ejemplo, el CT18 con baja densidad génica se localiza más hacia la periferia que el CT19, el cual presenta alta densidad génica (38,40,45). Este paradigma se puede extender a genes individuales o grupos de genes dentro de los cromosomas. Genes individuales con una baja tasa transcripcional normalmente se encuentran con mayor frecuencia en el interior de su respectivo CT comparado con los genes que presentan mayor actividad transcripcional (6,46–49). Curiosamente, la localización aberrante en la periferia nuclear mediante la unión de regiones a la lámina nuclear da como resultado la inhibición de la transcripción (50). Así mismo, es de destacar que la posición radial de los CTs en el mismo tipo celular se conservan a lo largo de la evolución de los primates (Figura 5) (41).

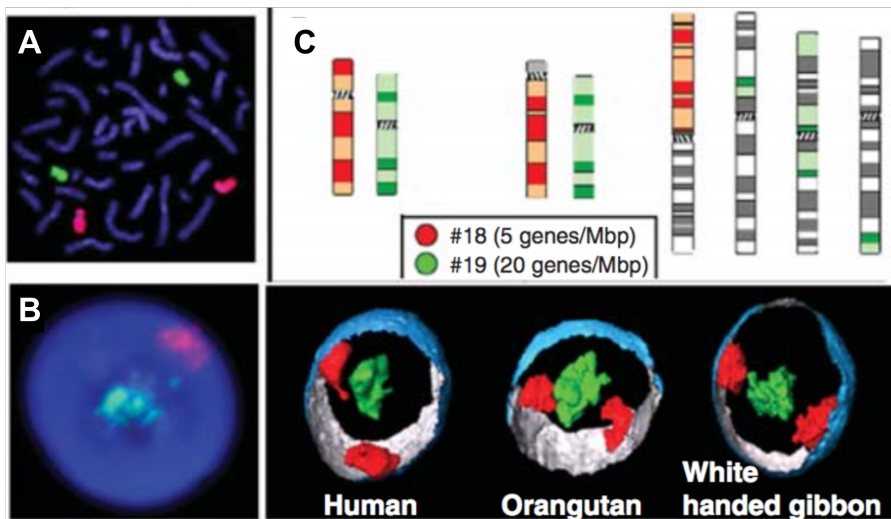


Figura 5. (A) Metafase de cromosomas humanos después de la hibridación mediante la técnica de FISH. Se muestran los cromosomas chr18 en rojo chr19 en verde utilizando sondas de cromosoma completo (WCP, por sus siglas en inglés). (B) Imagen muestra de un plano del núcleo de una célula linfoblastoide humana después de 3D FISH con las mismas sondas WCP que muestra el CT19 (verde) en el centro nuclear y un CT18 (rojo) en la periferia. (C) Arriba: Ilustración idiogramática de los chr18 (rojo) y chr19 (verde) de humano (extremo izquierdo), así mismo se muestran los cromosomas y regiones subcromosómicas ortólogas del orangután (*Pongus pygmaeus*, centro) y el gibón de manos blancas (extremo derecho). Obsérvense los pronunciados reordenamientos cromosómicos entre el cariotipo del gibón y el humano: el brazo largo de un cromosoma del gibón es ortólogo al cromosoma humano 18, mientras que cuatro segmentos cromosómicos ortólogos del chr19 humano están distribuidos en otros tres cromosomas del gibón. Abajo: reconstrucciones tridimensionales representativas de núcleos de células linfoblastoides correspondientes a humano (izquierda), orangután (centro) y gibbon (derecha) que revelan las mismas posiciones nucleares radiales no aleatorias del chr19 denso en genes ortólogos (verde) y cromatina pobre en genes chr18 (rojo). Imagen modificada de Cremer, T and Cremer, M. 2010.

la periferia. (C) Arriba: Ilustración idiogramática de los chr18 (rojo) y chr19 (verde) de humano (extremo izquierdo), así mismo se muestran los cromosomas y regiones subcromosómicas ortólogas del orangután (*Pongus pygmaeus*, centro) y el gibón de manos blancas (extremo derecho). Obsérvense los pronunciados reordenamientos cromosómicos entre el cariotipo del gibón y el humano: el brazo largo de un cromosoma del gibón es ortólogo al cromosoma humano 18, mientras que cuatro segmentos cromosómicos ortólogos del chr19 humano están distribuidos en otros tres cromosomas del gibón. Abajo: reconstrucciones tridimensionales representativas de núcleos de células linfoblastoides correspondientes a humano (izquierda), orangután (centro) y gibbon (derecha) que revelan las mismas posiciones nucleares radiales no aleatorias del chr19 denso en genes ortólogos (verde) y cromatina pobre en genes chr18 (rojo). Imagen modificada de Cremer, T and Cremer, M. 2010.

Los estudios que demostraron una estrecha correlación entre la densidad génica y el posicionamiento radial se realizaron predominantemente en núcleos relativamente esféricos de linfocitos. Sin embargo, el análisis de posicionamiento radial en células más planas, como los fibroblastos, ha mostrado una situación más compleja en la que el tamaño de los cromosomas se convierte en un factor importante. En estos casos, el posicionamiento radial generalmente se correlaciona con el tamaño del cromosoma y no con la densidad del gen (27,51–53).

Adicionalmente, otros estudios han reportado cambios en el posicionamiento de CTs al evaluar líneas celulares de mama y compararlas con su equivalente línea celular cancerosa (51). Así mismo, cambios en la disposición de los CTs se han observado durante la diferenciación celular (54). Estas observaciones apoyan el código de posicionamiento radial probabilístico el cual fue propuesto por Cremer y colaboradores, en dicho código se propone que el posicionamiento de los CTs es específico del tipo celular, y sufre alteraciones durante la diferenciación celular y durante la progresión maligna donde generalmente ocurren cambios masivos en los programas de expresión genómica (43).

Otros factores que se han asociado con la disposición radial de los CTs, además de la densidad génica o el tamaño de los cromosomas, son las interacciones con otros compartimentos nucleares. Un ejemplo destacable es el nucléolo y de los cromosomas acrocéntricos que contienen regiones organizadoras nucleolares (NOR) responsables del posicionamiento de sus respectivos CTs (27,54,55). También se ha demostrado que la lámina nuclear es importante para la organización radial de los CTs (56). Específicamente, se han observado alteraciones en la disposición de los CTs en células que expresan la proteína de lamina-A truncada (progerina) (57). Además de las interacciones con otros compartimentos nucleares, varios factores y/o modificaciones proteicas pueden desempeñar un papel en el posicionamiento radial de los CTs. Algunos de los ejemplos evaluados incluyen Arp6, proteína miembro de la familia de actina (58), la variante de histona H2A.Z (58), miosina (56), y la inhibición de la desacetilación de histonas (1), todos estos factores han demostrado una asociación en la disposición anormal de los CTs cuando son alterados.

La tasa de proliferación de las células y la forma nuclear también se han implicado como factores que influyen en la organización de los CTs. Por ejemplo, las células en proliferación tienden a seguir una organización basada en la densidad de genes en comparación con la distribución basada en el tamaño cromosómico encontrada en células quiescentes o senescentes (59). Además, el núcleo esférico de linfocitos humanos sigue una organización basada en la densidad de genes, que se conserva en varias especies relacionadas (44,60), mientras que la distribución basada en el tamaño de los cromosomas es más frecuente en los núcleos de fibroblastos elipsoidales (27). No obstante, a pesar de la prevalencia y conservación generalizadas de los CTs, los determinantes moleculares, mecanismos y la función de este nivel de organización no han sido totalmente dilucidados.

1.1.4.3 Interacciones y sobrelapamiento/intermingling entre CTs

El descubrimiento del posicionamiento radial no aleatorio de los CTs también sugirió la intrigante posibilidad de que pudiera haber patrones de interacciones no aleatorias entre los diferentes CTs. Los estudios iniciales que utilizaron técnicas de FISH fueron consistentes con este punto de vista, y mostraron un sobrelapamiento entre cromosomas homólogos y no homólogos los cuales mostraron una disposición no aleatoria aunque probabilísticas (27,61).

El sobrelapamiento de cromosomas, conocido en el argot científico como 'intermingling', puede ser entendido como el hecho de rodear los dominios de cromatina de un cromosoma con los de otro cromosoma o como la mezcla de asas de cromatina que se extienden desde un CT hasta el compartimento de la intercromatina o dentro de otro CT. También puede entenderse como la existencia de dominios de cromatina en los cuales convergen secuencias de DNA de más de un cromosoma. Estas regiones de sobrelapamiento de cromosomas no parecen diferir morfológicamente del resto del genoma y están presente en toda la extensión de espacio nuclear (62). Además, la condensación de la cromatina en estas regiones no difiere de alguna otra región del CT que no se sobrelapa (25).

Algunos ejemplos de interacciones intra-cromosómicas incluyen la dinámica entre promotores y terminadores, al igual que interacciones entre promotores y potenciadores o enhancers ubicados a kilobases o hasta megabases de distancia (63). Otro tipo de interacción intracromosómica son los contactos mediados por aisladores o insulators, que parecen contribuir a la organización del genoma en regiones funcionalmente distintas al separar regiones reguladas diferencialmente entre sí (64).

Por otro lado, una clara evidencia de la interacción inter-cromosómica, es decir entre cromosomas no homólogos, a gran escala es la observada en la formación del nucleolo. En los núcleos humanos, alrededor de 300 genes ribosómicos ubicados en cinco pares de cromosomas acrocéntricos diferentes se acercan físicamente para construir el preensamblaje ribosómico en el núcleo (65,66). Esta formación espacial del nucléolo es un fenómeno conservado y valida que los cromosomas no homólogos pueden sobrelaparse de manera no aleatoria en todos los núcleos. Además, existen algunos ejemplos que sugieren que las interacciones inter-cromosómicas también pueden estar involucradas en la regulación de genes, por ejemplo, en el control de los receptores olfativos, los cuales están ubicados en varios cromosomas diferentes y se someten a una dinámica compleja para conglomerarse en el mismo espacio nuclear y regular la expresión individual de cada gen involucrado de manera selectiva y específica (67). Dadas estas observaciones, se ha relacionado el sobrelapamiento entre CTs con la organización nuclear de la expresión génica en la que se pueden encontrar grupos de genes reunidos en sitios subnucleares enriquecidos en factores transcripcionales o de silenciamiento (68).

1.1.4.4 Sobrelapamiento entre CTs heterólogos y regulación genómica

Es importante resaltar que el grado de sobrelapamiento entre CTs se puede usar como una medida sensible en la determinación de las posiciones relativas de los cromosomas. Se demostró que esta medida es más informativa que las posiciones absolutas de los CTs, ya que el volumen de sobrelapamiento revela una menor variabilidad dentro de un tipo celular dado. Además, estudios anteriores han demostrado que los cromosomas con una actividad transcripcional similar tienden a estar espacialmente cercanas (69). Curiosamente, los

volúmenes de solapamiento se correlacionan mejor con la actividad transcripcional que con la distancia entre los centroides de los cromosomas, lo que sugiere la importancia del solapamiento entre CTs para la regulación de la expresión génica (70). Experimentos de captura de cromosomas 3C y FISH sugieren que las regiones de solapamiento entre CTs (68,71) contienen una mayor densidad de secuencias reguladoras y median las interacciones entre ellos (3,17,25,69,70).

Asimismo, análisis de correlación en los que evaluaron secuencias embebidas dentro de regiones de solapamiento, actividad transcripcional del genoma global y los perfiles epigenéticos han comenzado a revelar la agrupación espacial de genes corregulados (68,71,72). Las regiones de solapamiento pueden comprender múltiples TADs derivados de diferentes cromosomas. Además, se ha demostrado que las regiones de solapamiento están enriquecidas con modificaciones epigenéticas de activación como la H3K9ac y la H3K4me3, así como la localización preferencial de RNA Pol2 fosforilada en estas regiones y en general, muestran similitudes en las modificaciones de histonas presentes, estado de metilación nivel de sensibilidad a la DNase y nivel de expresión (25,70,73,74). En concordancia, estas regiones también están enriquecidas con enzimas remodeladoras de cromatina dependientes de ATP; las cuales sintonizan los patrones de acetilación y metilación para modular la accesibilidad local a los sitios reguladores en la fibra de cromatina (75). Estos hallazgos en conjunto sugieren que las regiones de solapamiento son sitios transcripcionalmente activos con presencia de fábricas transcripcionales. Experimentos recientes también han demostrado que las regiones de solapamiento permanecen estructuralmente estables después de la inhibición de RNAPol2 fosforilado, pero el volumen de solapamiento se reduce al inhibir los factores de transcripción (70).

Finalmente es importante destacar que la estabilización de la arquitectura cromosómica es muy importante durante la diferenciación celular, y dicha estabilización se debe en gran medida a la formación de redes de solapamiento o 'intermingling' entre los diferentes CTs. Lo cual a su vez, está correlacionado con la actividad transcripcional entre dos CTs, la distancia de estos a los factores transcripcionales, el co-agrupamiento de los mismos y la activación de estas unidades específicas en las mismas células diferenciadas (76). Esta creciente evidencia apunta a una relación crítica entre la corregulación de genes y el solapamiento entre CTs, que se establece gradualmente durante la diferenciación de células troncales. Además de sugerir la existencia de patrones de plegamiento y organización tridimensional del genoma que están optimizados para la transcripción específica del tipo celular. Sin embargo, y a pesar de los grandes avances que se han realizado a diversos niveles, el entendimiento sobre los mecanismos reguladores de la organización del genoma, así como su impacto en la regulación génica aún es limitada.

1.1.4.5 Impacto de la organización cromosómica en la formación de translocaciones

Las translocaciones son consideradas como anomalías cromosómicas características de las células cancerosas. Estos reordenamientos genómicos están formados por la unión ilegítima de extremos de DNA en cromosomas distintos o iguales. Las translocaciones pueden representar un efecto secundario debido al aumento de la inestabilidad genómica y los defectos de reparación del DNA en las células cancerosas. De igual forma, las translocaciones pueden ser causales en la carcinogénesis, como en el caso de la fusión entre los genes *BCR-ABL1* en la leucemia mieloide crónica (LMC) o los genes *PML-RAR* en la leucemia promielocítica (77). Aunque este tipo de aberraciones son relevantes en el desarrollo del cáncer, su etiología es muy poco comprendida.

Se ha propuesto un modelo general de formación de translocaciones cromosómicas el cual integra un proceso multi-etapas: En primera instancia debe ocurrir un rompimiento de doble hebra (DSB, por sus siglas en inglés) y este debe suceder simultáneamente en al menos dos cromosomas. Segundo, los mecanismos de reparación deben fallar al tratar de eliminar el daño. Tercero, los extremos rotos de los cromosomas deben estar físicamente cercanos dentro del espacio nuclear y finalmente debe ocurrir una reunión ilegítima (recombinación ilegítima) de dichos extremos (78–80).

La formación de las translocaciones esta vinculada estrechamente con el arreglo espacial de los cromosomas implicados, dado que se requiere que exista interacción física de la pareja involucrada en la translocación (78). Por lo tanto, el papel de la proximidad espacial en la formación de translocaciones cromosómicas parece ser obvia, e inclusive se ha correlacionado el grado de solapamiento 'intermingling' entre cromosomas heterólogos, y la cercanía física de los *loci* involucrados en la translocación con la frecuencia con la que se presenta esta aberración cromosómica en Cáncer (25,78–81). Es por ello que la formación de las translocaciones se vincula directamente a la arquitectura nuclear en interfase (**Figura 6**).

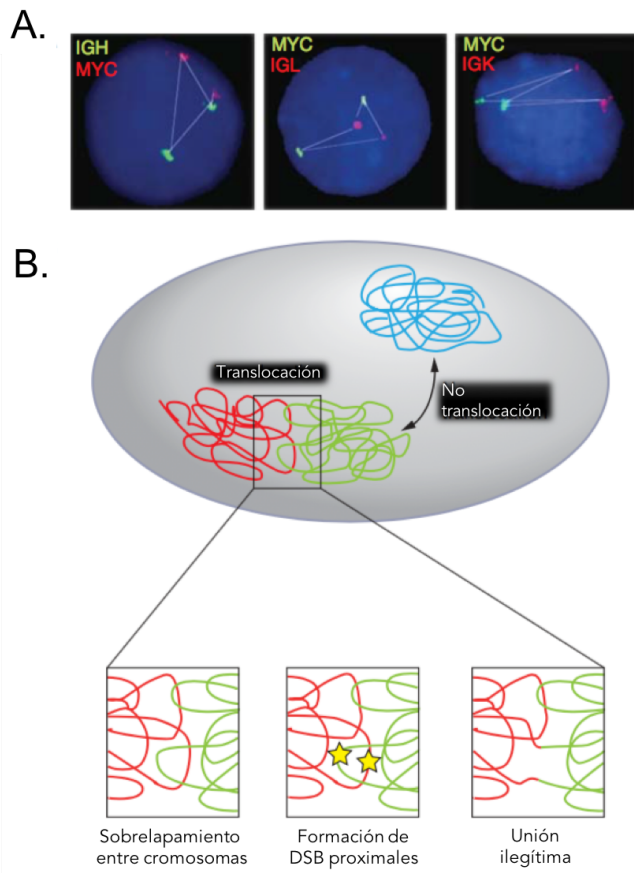


Figura 6. Importancia de la organización del genoma en la determinación de las translocaciones cromosómicas. La organización no aleatoria de genes y cromosomas contribuye a la formación de translocaciones en cáncer. (A) La distancia física de MYC a sus parejas de translocación IGH, IGL e IGK se correlaciona con la frecuencia en la que estas se presentan (MYC-IGH; MYC-IGL; MYC-IGK). (B) Las translocaciones ocurren preferentemente entre los cromosomas ubicados proximalmente o cercanos (rojo, verde), y rara vez entre los cromosomas ubicados distalmente (azul). Las rupturas de doble hebra estrechamente yuxtapuestas (estrellas amarillas) que se producen en el sobrelapamiento entre cromosomas crean extremos cromosómicos libres que pueden recombinarse para formar una translocación cromosómica por unión ilegítima. Imagen modificada de Dekker J and Misteli, T. 2015

La organización de los CTs es específica de tipo celular, esta característica se ha asociado con la presencia y frecuencia de translocaciones particulares en ciertos tipos de cáncer. De hecho, existe una correlación entre la proximidad espacial y la prevalencia de translocaciones específicas de tejido. Por ejemplo, en una línea celular de ratón con linfoma de células T que presenta una translocación $t(12;14)$ recurrente, se encontró una gran proximidad entre los CTs 12 y 14 tanto en las células de linfoma como en los esplenocitos normales (42). En adipocitos diferenciados, los CTs 12 y 16 están estrechamente asociados espacialmente, característica a la que se le atribuye la frecuente presencia de la $t(12;16)$ en liposarcoma humano (82). Asimismo, en un estudio llevado a cabo en células de ratón evaluaron la proximidad entre los CTs 5,6,12 y 15 en diferentes estirpes celulares y observaron que la proximidad entre CTs dependía del tipo celular; es así que en linfocitos de ratón los CTs 12 y 15 se encontraban en cercanía a diferencia de los CT 5 y 6, y por el contrario, en hepatocitos los CTs más cercanos fueron los CTs 5 y 6 pero no así los CTs 12 y 15 (7). Estos resultados concordaron con las translocaciones $t(12;15)$ encontrados frecuentemente en linfomas y la $t(5;6)$ común en hepatomas, lo cuál evidencia la especificidad tisular de las interacciones y translocaciones intercromosómicas.

Por otro lado, experimentos en los que se muestran imágenes de células vivas de mamíferos han demostrado que después de inducir DSB, los extremos libres de los cromosomas están

en gran medida inmóviles en el núcleo celular (83). Como consecuencia, se infiere que las translocaciones ocurren preferentemente entre regiones genómicas que a menudo se encuentran en estrecha proximidad espacial debido a la disposición no aleatoria del genoma en el núcleo de la interfase. Congruentemente, ensayos realizados con la técnica de FISH y, más recientemente, los enfoques basados en técnicas de captura conformacional de cromosomas han revelado la yuxtaposición de las regiones de translocación en el núcleo celular intacto (84–87). Por ejemplo, los genes *MYC* e *IGH*, cuya translocación da lugar al linfoma de Burkitt, se encuentran con frecuencia interactuando o ubicados muy cerca de las células B (85,86). Se han encontrado correlaciones similares entre la frecuencia de translocación y la proximidad física para numerosas parejas de translocación en células humanas y de ratón (88,89).

La noción de que las interacciones espaciales entre las regiones de translocación son un determinante clave en la formación de la translocación también está respaldada por las observaciones sobre las translocaciones en cáncer de próstata. En el cáncer de próstata, son frecuentes las translocaciones entre el gen *TMPRSS2* y *ETV1* o *ERG* (88,90). En las células prostáticas normales, estos genes no se asocian físicamente; sin embargo, la estimulación con andrógenos conduce a su asociación física y, cuando se les expone además a la radiación ultravioleta, estos se translocan. Claramente, los análisis de translocaciones aleatorias que ocurren de forma natural e inducibles experimentalmente han revelado una fuerte correlación entre la frecuencia de la translocación y la proximidad espacial (87,91–93).

Asimismo, y en concordancia con las evidencias previas, se ha observado que la frecuencia de translocaciones se corresponde estrechamente con el grado de solapamiento entre CTs (25). Parece probable que las translocaciones ocurran preferentemente cuando se produce daño en el DNA en esta región de solapamiento creando una DSB, cuyo rango de movilidad es limitado y propensa a sufrir uniones ilegítimas con rupturas proximales (especialmente cercanas). El hallazgo de que las translocaciones ocurren preferentemente entre regiones posicionadas proximalmente significa que la organización espacial no aleatoria del genoma es un factor clave para determinar las parejas de translocación.

1.2 Translocación t(9;22)

Un ejemplo prototípico de la relevancia de la organización y posicionamiento de los CTs en la determinación de las translocaciones es la t(9;22). Esta translocación fusiona los genes *ABL1* y *BCR* y origina el "cromosoma Filadelfia (Ph)". Los loci *ABL1* y *BCR* y sus correspondientes CT9 y CT22, respectivamente, se han descrito en proximidad espacial en células hematopoyéticas y se han propuesto como un factor crucial en la génesis de la translocación t(9;22) (94,95). Históricamente, estudios emblemáticos revelaron una proximidad muy cercana entre los genes *ABL1* y *BCR* en células de diferentes linajes hematopoyéticos (84), y paralelamente otro estudio corroboró esta cercanía particularmente en linfocitos B (94). Por lo tanto, se concluyó

que esta translocación característica está mediada por la estrecha asociación de los CTs participantes en el tipo de célula normal que da lugar a estas células leucémicas.

Esta aberración cromosómica única tiene un papel fundamental en la patogénesis de la leucemia mieloide crónica (LMC) ya que el gen de fusión *BCR-ABL1* codifica una proteína quimérica con actividad constitutiva de cinasa de tirosina (TK). Esta proteína quimérica se forma como resultado de una translocación recíproca balanceada entre los brazos largos del cromosoma 9 y 22, t(9;22)(q34;q11) (96,97). Esta translocación transpone el protooncogen *ABL* (Abelson) del cromosoma 9 a una región genómica relativamente pequeña de 5.8 kb en el cromosoma 22 llamado región del grupo de puntos de ruptura (bcr por sus siglas en inglés breakpoint cluster region). Se han caracterizado tres puntos principales de rompimiento en *BCR*: mayor (M-bcr), menor (m-bcr), y micro (u-bcr). La zona de puntos de rompimiento en *ABL1* es más variable y generalmente, ocurren río arriba del segundo exón (a2) dando como resultado la translocación del exón 1 de *ABL1*. Cabe resaltar que los puntos de ruptura de ambos genes han sido estudiados para explicar el origen del cromosoma filadelfia y se ha definido que este es independiente de rompimientos espontáneos o la expresión de sitios frágiles (98).

En la mayoría de los pacientes con LMC están presentes dos genes quiméricos *BCR-ABL* ligeramente diferentes, dependiendo de la localización precisa de los puntos de ruptura en el gen *BCR*. Las rupturas pueden ocurrir entre el exón 13 (también conocido como b2) y el exón 14 (b3), produciendo un RNA mensajero (RNAm) de fusión b2a2, mientras que si la ruptura ocurre entre los exones 14 y 15 produce un RNAm de fusión b3a2. Históricamente b3a2 ha sido referido como la región mayor del grupo de puntos de ruptura (M-BCR). Alguno de los dos transcritos (b2a2 o b3a2) esta presente en la mayoría de los pacientes, sin embargo, ocasionalmente pueden presentar ambos transcritos, los cuales son referidos como *BCR-ABL* p210, describiendo el peso de la proteína de 210kD (99,100).

La proteína de fusión *BCR-ABL* se encuentra en el citoplasma y presenta una actividad constitutiva de cinasa de tirosina en comparación con la actividad estrechamente regulada del producto normal *ABL* (p145). *BCR-ABL* se une y fosforila a numerosas proteínas intracelulares. El efecto neto de esta actividad es la inducción de las anomalías observadas en pacientes con LMC, esto incluye la proliferación celular incrementada y la disminución de apoptosis de las células troncales hematopoyéticas o las células progenitoras dirigiendo a un incremento masivo en el número de células mieloides, e inestabilidad genética resultando en una progresión de la enfermedad (96,97).

1.3 Leucemia Mieloide Crónica

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un desorden hematopoyético clonal y heterógeno, que se origina por una transformación neoplásica de células troncales hematopoyéticas (HSC,

por sus siglas en inglés) a consecuencia de la presencia de la t(9;22) en dichas células (96,101). Este evento resulta en la expresión constitutiva de la proteína quimérica BCR-ABL1, transformando la HSC en una célula troncal de LMC, que consecuentemente da lugar a una enfermedad mieloproliferativa clonal (102).

La LMC representa aproximadamente el 15% de todas las leucemias, con aproximadamente 10,000 nuevos casos diagnosticados en México, y aunque ocurre en todos los grupos de edad, la incidencia aumenta en adultos, siendo la media de edad de 66 años al momento del diagnóstico. Los pacientes mayores de 70 años representan más del 20% y los niños y adolescentes <5% (96). La LMC es una enfermedad bi- o trifásica, en donde la mayoría de los pacientes son diagnosticados en una fase relativamente crónica indolente o estable caracterizada por un número excesivo de células maduras de linaje mieloide. El progreso de la enfermedad a una fase más agresiva puede ser subdividida en una fase acelerada y una fase blástica.

Las tres fases diferentes por las que puede progresar la LMC son la fases crónica, acelerada y blástica. La LMC en fase crónica (LMC-FC) no tratada eventualmente progresará a LMC en fase acelerada (LMC-FA) o LMC en fase blástica (LMC-FB) en un promedio de 3 a 5 años (103). La progresión de LMC-FC a FA vincula un continuo de características clínicas (es decir, fiebre, dolor óseo, tamaño del bazo), cambios citogenéticos y recuento de blastos. El perfil de expresión génica ha mostrado una estrecha correlación de la expresión génica entre LMC-FA y -FB, lo que indica que la mayor parte de los cambios genéticos en progresión ocurren en la transición de la LMC-FC a -FA. La activación de la vía de señalización de beta-catenina en los progenitores de granulocitos y macrófagos de la LMC (que aumenta la actividad de autorrenovación y el potencial leucémico de estas células) puede ser un evento patobiológico clave en la evolución a la LMC-FB (103).

1.3.1 Diagnóstico

La evaluación inicial debe consistir en una historia clínica y un examen físico, incluida la palpación del bazo, hemograma completo, perfil químico y panel de hepatitis B, C y VIH (104). Posteriormente, el diagnóstico de la LMC típica consiste en documentar, en el contexto de una leucocitosis persistente inexplicada (u ocasionalmente trombocitosis), la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph), es decir la t(9;22)(q34;q11), mediante el análisis de cariotipo por citogenética de rutina, o las anomalías moleculares BCR-ABL1 relacionadas con Ph por FISH convencional o por estudios moleculares (105).

Cuando se diagnostica LMC, se requiere un aspirado de médula ósea para evaluar la morfología celular, ya que la proporción de células blásticas y de basófilos es importante para distinguir la FC de la FA y de la FB. Durante el aspirado se puede realizar una biopsia central de hueso para evaluar el grado de fibrosis que tiene importancia pronóstica y puede identificar

nichos de blastos que no son evidentes en el aspirado (104). La citogenética debe realizarse mediante análisis de bandeo cromosómico de metafases teñidas con Giemsa de células de médula ósea. Es obligatoria una PCR de transcriptasa inversa cualitativa (RT-PCR) en células de sangre periférica para identificar la presencia de transcritos de BCR-ABL1 que se pueden seguir adecuadamente al evaluar la respuesta a la terapia. Por otro lado, los estudios de FISH se basan en la co-localización de sondas genómicas específicas de los genes *BCR* y *ABL1* que corroboran la presencia de la fusión de estos genes. La comparación de muestras simultáneas de médula ósea y sangre periférica mediante análisis de FISH muestra una alta concordancia (105).

El cromosoma Ph suele estar presente en el 100% de las metafases, a menudo como la única anomalía. Diez a 15% de los pacientes tienen cambios cromosómicos adicionales (evolución clonal) que involucran trisomía 8, isocromosoma 17, pérdida adicional de material de 22q o doble Ph, u otros (105).

1.3.2 Factores pronósticos basales

Se han utilizado tres sistemas de pronóstico, Sokal, Euro y EUTOS, derivados aritméticamente, pero basados en datos clínicos y hematológicos simples, para estimar el riesgo de supervivencia al inicio del estudio (104). Estos sistemas se han utilizado para la estratificación del riesgo de los pacientes en 3 grupos de riesgo (bajo, intermedio y alto) . La puntuación Sokal ha sido particularmente popular y se ha utilizado en la mayoría de los ensayos clínicos. Estas puntuaciones de riesgo se diseñaron para evaluar las diferencias en la supervivencia o la respuesta (104).

La puntuación de Sokal se basa en la la edad del paciente, el tamaño del bazo en el examen clínico, el recuento de plaquetas y el porcentaje de blastos en la sangre periférica. La puntuación Euro incluye eosinófilos y basófilos en la sangre periférica además de las mismas variables clínicas utilizadas en la puntuación Sokal. La puntuación de supervivencia a largo plazo (ELTS) del Estudio Europeo de Tratamiento y Resultados (European Treatment and Outcome Study, EUTOS) se basa en las mismas variables que la puntuación de Sokal y proporciona el predictor más útil de muerte relacionada con la LMC en pacientes tratados con imatinib de primera línea (103). Los pacientes en los grupos de riesgo intermedio y alto tienen probabilidades significativamente más altas de morir de LMC que los del grupo de riesgo bajo, y las probabilidades también son significativamente diferentes entre los grupos de riesgo intermedio y alto. Se recomienda la determinación de la puntuación de riesgo utilizando los sistemas de puntuación Sokal, Euro o ELTS antes de iniciar la terapia con TKI para los pacientes diagnosticados con LMC en FC (103).

1.3.3 Tratamiento

Hasta el año 2000, la terapia farmacológica para la LMC se limitaba a agentes inespecíficos como busulfán, hidroxiurea e interferón-alfa (IFN- α) (106). El IFN- α provocó la regresión de la enfermedad y mejoró la supervivencia, pero se vio obstaculizado por su modesta eficacia y las importantes toxicidades asociadas. El alotrasplante de células madre (Allo-SCT, por sus siglas en inglés) puede llegar a ser curativo, pero conlleva riesgos de morbilidad y mortalidad. Además, el Allo-SCT es una opción solo para pacientes con buen estado funcional y funciones orgánicas, y que tienen un donante apropiado (106).

El panorama terapéutico de la CML cambió drásticamente con el desarrollo de moléculas pequeñas inhibidoras de la actividad cinasa de tirosina (TKI, por sus siglas en inglés), que interfirieron de manera potente con la interacción entre la oncoproteína BCR-ABL1 y sitio activo del trifosfato de adenosina (ATP), bloqueando la proliferación celular de la clona maligna. Este enfoque "dirigido" alteró la historia natural de la CML, mejorando la tasa de supervivencia a 10 años de aproximadamente 20% a 80%-90% (104).

Con la excepción de los casos de LMC recién diagnosticados durante el embarazo, el tratamiento de primera línea es un TKI, tal como imatinib. Se puede administrar un curso corto de hidroxiurea en pacientes sintomáticos con recuentos elevados de glóbulos blancos o plaquetas mientras está pendiente la confirmación molecular y citogenética del diagnóstico de LMC (103). Desde el revolucionario potencial de tratamiento de imatinib, aprobado por la FDA y la EMA en 2001, el enfoque ha sido optimizar el uso de la terapia con TKI.

Después del imatinib, se desarrollaron los TKI de segunda y tercera generación: bosutinib, dasatinib, nilotinib, radotinib y ponatinib. Todos estos compuestos se dirigen al sitio de unión de ATP en el dominio cinasa de la oncoproteína BCR-ABL, pero tienen una afinidad diferente en presencia de ciertas mutaciones en el dominio cinasa debido a variaciones en su estructura química. Esto también da como resultado diferentes efectos secundarios en otras cinasas de tirosina y, por lo tanto, en el perfil de toxicidad específico, que es un factor clínico importante, ya que aproximadamente la mitad de las interrupciones del tratamiento se deben a la toxicidad de los TKI (107).

Imatinib y tres TKI de segunda generación (2GTKI; nilotinib, dasatinib y bosutinib) están aprobados en el entorno de primera línea. En general, todos los TKIs son muy eficaces en la fase crónica de la LMC recién diagnosticada, con una SG a largo plazo que se aproxima a la de los controles pareados por edad (108–110). Cabe mencionar que los TKI de segunda generación, en comparación con el imatinib, por lo general producen respuestas citogenéticas y moleculares más rápidas, con menos progresión de la LMC a fase avanzada; y hasta el momento, en ensayos clínicos aleatorios, no hay diferencias significativas en la SG en pacientes que comienzan con imatinib versus un TKI de segunda generación (dasatinib,

nilotinib y bosutinib). La selección de la terapia TKI de primera línea (bosutinib, dasatinib, imatinib o nilotinib) en un paciente determinado debe basarse en la puntuación de riesgo, el perfil de toxicidad, la edad del paciente, la capacidad para tolerar la terapia y la presencia de condiciones comórbidas (103). Cabe mencionar que otro factor dado en países en vías de desarrollo como México es el costo económico del medicamento, lo que influye de manera significativa en la selección del tratamiento, siendo el imatinib el menos oneroso.

Aunque la gran mayoría de los pacientes con LMC en fase crónica tienen un pronóstico excelente, la intolerancia a los TKI actualmente disponibles no es infrecuente y la resistencia a esta terapia ocurre con frecuencia independientemente del tipo de TKI (aproximadamente 40%) (111). La muerte relacionada con la LMC debido a la progresión de la enfermedad de fase crónica a avanzada sigue siendo una realidad y varía hasta un 15%, según los factores clínicos en el momento del diagnóstico (112).

1.3.3.1 Imatinib

Imatinib, se considera el TKI de primera generación, y el ensayo clínico que condujo al registro de imatinib fue el ensayo aleatorizado IRIS, donde mostró tasas más altas de respuestas citogenéticas y moleculares en comparación con una combinación de interferón alfa recombinante (IFN α) y dosis bajas de citarabina y mejor supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) (113). Imatinib se convirtió inmediatamente en la opción de primera línea para el tratamiento de la LMC. Tres ensayos adicionales confirmaron y ampliaron rápidamente IRIS al probar imatinib en combinación con IFN α o citarabina en dosis bajas y en dosis más altas, proporcionando puntos de referencia para respuestas moleculares profundas y demostrando una expectativa de vida normal en la mayoría de los pacientes. La información adicional sobre imatinib provino de otros estudios prospectivos y retrospectivos, así como de registros basados en la población (104).

Después del tratamiento con imatinib, las tasas de respuesta molecular temprana a los 3 y 6 meses (presencia de transcritos BCR-ABL1 \leq 10% de acuerdo a escalas internacionales, IS) oscilan entre el 60 y el 80%. Después del primer año las tasas de respuesta molecular mayor (Ver Anexo 6.2) oscilan entre 20 y 59 % y en 5 años, entre 60 y 80 %. Los cambios de imatinib, en su mayoría a otro TKI, van desde el 26,5 % en 10 años hasta el 37 % y el 50 % en 5 años. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la SG a cinco años oscilan entre 80 y 90 % y 90 y 95 %, respectivamente. La SG a diez años oscila entre el 82 y el 85 %, con una tasa de mortalidad relacionada con la leucemia de alrededor del 6 % (104).

1.3.3.2 Dasatinib

Dasatinib se estudió inicialmente como segunda línea para aquellos pacientes que no respondían favorablemente al imatinib, incluidos varios estudios de fase 2 que probaron

diferentes dosis y programas de dosificación (114–116). Dasatinib a una dosis de 100 mg diarios para LMC-FC y 140 mg diarios para LMC-FA/FB fueron sugeridas como las dosis recomendadas. Los estudios de fase 3 llevados a cabo por un grupo de colaboración (Southwestern Working Group SWOG S0325) y patrocinados por la industria (Estudio de dasatinib versus imatinib en pacientes con LMC sin tratamiento previo, DASISION) compararon dasatinib 100 mg al día con imatinib 400 mg al día en pacientes con LMC-FC recién diagnosticados. Dasatinib demostró ser superior en los criterios de valoración primarios, respuesta molecular mayor (RMM) y respuesta citogenética completa (RCC) a los 12 meses, respectivamente (Ver **Anexo 7.2**) (117,118). No se observaron diferencias en la supervivencia global. Basados en los resultados del estudio DASISION, se aprobó el uso de dasatinib en pacientes con LMC recién diagnosticados.

1.3.3.3 Nilotinib

Nilotinib mostró por primera vez muy buenos resultados en pacientes con LMC-FC y LMC-FA que no respondieron al tratamiento con imatinib (119). Más tarde se aprobó como terapia de segunda línea en base a los resultados confirmatorios en estudios de fase 2 a una dosis de 400 mg dos veces al día (120). Según los resultados de la evaluación de la eficacia y la seguridad de nilotinib en ensayos clínicos: pacientes LMC recién diagnosticados (ENESTnd), se aprobó nilotinib (300 mg dos veces al día) como tratamiento de primera línea para la LMC-FC. A diferencia de cualquier otro TKI de segunda generación, nilotinib mejoró significativamente la supervivencia libre de progresión en comparación con imatinib en el entorno de primera línea, pero la supervivencia general mejoró solo en el caso de nilotinib a una dosis de 400 mg dos veces al día (109) . Desafortunadamente, se descubrió que nilotinib causa hiperglucemia e hiperlipidemia junto con un aumento de los eventos adversos cardiovasculares en comparación con imatinib. Estos eventos cardiovasculares incluyeron enfermedad oclusiva arterial periférica, eventos isquémicos cerebrales y cardiopatía isquémica (121) .

1.3.3.4 Bosutinib

Bosutinib se aprobó inicialmente a una dosis de 500 mg diarios para el tratamiento de tercera línea de la LMC en todas las fases (122). En el entorno de primera línea, bosutinib no logró mejorar la RCC a los 12 meses en comparación con imatinib, lo cual fue el criterio principal de valoración del estudio y, en consecuencia, se le negó la aprobación regulatoria a pesar de las tasas superiores de RMM que mostró (123). Posteriormente, el ensayo bosutinib como primera línea de tratamiento en pacientes LMC (BFORE) utilizó una dosis reducida de bosutinib (400 mg diarios) y demostró superioridad en cuanto a la RMM a los 12 meses, pero no hubo diferencias en la supervivencia global y libre de progresión (108). En base a estos datos, bosutinib se convirtió en el cuarto TKI aprobado para la terapia de primera línea de LMC-FC.

1.3.3.5 Ponatinib

Los TKI de primera y segunda generación no están diseñados para el tratamiento de pacientes con la presencia de la mutante *BCR/ABL1*^{T315I} (124). Ponatinib se diseñó para abordar este problema específico. A diferencia de otros TKI, el ponatinib rodea la isoleucina 315 a través de un triple enlace carbono-carbono (125). Ponatinib se considera el TKI contra *BCR/ABL1* más potente actualmente aprobado y que presenta una vida media larga. Sin embargo, esta potencia tiene el costo de una selectividad reducida que conduce a la inhibición de múltiples cinasas adicionales (121). Ponatinib a una dosis inicial de 45 mg diarios se probó en LMC en recaída/refractaria en todas las fases, así como en leucemia linfoblástica aguda (LLA) Ph+ en recaída/refractaria (126). Las respuestas fueron duraderas en LMC-FC, menos estables en LMC-FA y transitorias solo en LMC-FB y LLA Ph+. Los eventos cardiovasculares surgieron con un seguimiento más prolongado del estudio de eficacia y seguridad de ponatinib en la leucemia con cromosoma Filadelfia positivo (PACE) y esto condujo a la finalización prematura de un ensayo de primera línea de fase 3 en curso (127). La toxicidad vascular se atribuyó a la inhibición fuera del objetivo de las cinasas del sistema vascular, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y la tirosina cinasa con dominios 2 similares a inmunoglobulina y EGF (TIE2). Existe evidencia de que la toxicidad de ponatinib depende de la dosis, y se recomiendan reducciones de dosis una vez que se haya logrado la respuesta deseada. Los datos presentados recientemente del ensayo aleatorizado prospectivo OPTIC mostraron que un régimen de dosificación de ponatinib ajustado a la respuesta (que comienza con 45 mg y se reduce a 15 mg según la respuesta) conserva la eficacia y reduce la toxicidad (128).

1.3.4 Resistencia al tratamiento

La resistencia a los TKI en LMC implica dos mecanismos fundamentalmente diferentes. Primero, la resistencia dependiente de la cinasa *BCR-ABL1* es impulsada por la reactivación de su actividad. Esto generalmente ocurre como resultado de mutaciones sin sentido en el dominio de la cinasa que perjudica la unión de fármacos a través del impedimento estérico o los cambios conformacionales, o a través de la amplificación genómica *BCR1-ABL1* (129). El otro mecanismo incluye alteraciones metabólicas en la entrada del fármaco o el aumento del flujo de fármaco. Por ejemplo, Oct-1, un transportador catiónico, se ha implicado en el transporte transmembrana de imatinib, y la actividad o expresión reducida de esta proteína se asocia con la resistencia a los medicamentos (130). Por el contrario, la alta expresión de MDR1 se asocia con la respuesta favorable a nilotinib (131).

La resistencia a consecuencia de mutaciones en el dominio cinasa de la proteína quimerica *BCR-ABL1* resulta en la reducción de la eficiencia de los TKI. Estas mutaciones explican la resistencia en aproximadamente un tercio de los pacientes LMC en FC resistentes y en aproximadamente dos tercios de los pacientes con FA y FB resistentes (132). Los mecanismos

alternativos de resistencia incluyen la evolución clonal (aberraciones cromosómicas adicionales, ACA) y la activación de vías independientes de BCR-ABL1. No todos los ACA indican progresión por igual. Por lo tanto, se ha propuesto una clasificación de riesgo citogenético para permitir la adaptación del tratamiento basada en el riesgo (103).

Las mutaciones de BCR-ABL1 se pueden detectar con sensibilidades de alrededor del 20% mediante secuenciación Sanger y de alrededor del 3% mediante secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés). La mayor sensibilidad de NGS permite la detección temprana de mutaciones de BCR-ABL1 relacionadas a resistencia clínicamente relevantes, por lo que es la tecnología recomendada para detectar dichas mutaciones en pacientes que no responden adecuadamente a TKI (112). Sin embargo, alrededor de dos tercios de los pacientes con LMC en FC resistentes y en alrededor de un tercio de los pacientes en FA y FB resistentes, no se detecta una mutación dejando en evidencia que se no es la única causa de la resistencia (104).

La resistencia independiente de la mutación del dominio cinasa de BCR-ABL1 también se asocia con la presencia de mutaciones en reguladores epigenéticos tales como ASXL1, DNMT3A, IDH1 y SETBP1 (133). De hecho, la presencia de tales mutaciones en el momento del diagnóstico se asocia con un mayor riesgo de malos resultados en el tratamiento (134). Además, tales mutaciones también están asociadas con la progresión a crisis blástica (135). No está claro exactamente cómo estas mutaciones provocan la resistencia a los TKI en la LMC, aunque algunos estudios en leucemia mieloide aguda proporcionan evidencia de que dichas mutaciones facilitan cierto grado de detención en la diferenciación en los blastos leucémicos, lo que puede resultar en una disminución de la sensibilidad a los TKI.

Por otro lado, en algunos pacientes la falta de respuesta puede estar relacionada con un deficiente o intermitente apego al tratamiento, y estos pacientes deben ser interrogados sobre su adherencia a la dosis recomendada y el programa de medicación (103). Los factores microambientales también desempeñan un papel en la resistencia a los TKI. Las citocinas derivadas del estroma promueven la fosforilación de STAT3 en las células primarias de LMC, y la activación de STAT3 independiente de BCR-ABL1 se observa en células primarias de LMC resistentes a TKI (136). Los niveles del factor de crecimiento placentario derivado de la médula ósea aumentan en la LMC y promueven la proliferación celular independientes de BCR-ABL1 (137). El factor de crecimiento de fibroblastos 2 liberado del estroma de la médula ósea también impulsa la resistencia al imatinib a través de la activación de la vía de señalización MAPK (138). Estas evidencias apuntan a que las células de LMC son hipersensibles a ciertos factores derivados del microambiente que pueden conferirles resistencia a la terapia con TKI. No obstante, son necesarios mayores estudios que revelen si estas observaciones son resultado del tratamiento con TKIs o son alteraciones genómicas adicionales adquiridas durante el proceso de transformación maligna.

2. PROPUESTA DE INVESTIGACIÓN

2.1 Planteamiento del problema

Los cromosomas en interfase, denominados territorios cromosómicos (CTs), se organizan de manera no aleatoria dentro del espacio nuclear tridimensional (3D), esta organización es específica de tipo celular e influye en la expresión génica y la función nuclear. Así mismo, la determinación de las secuencias involucradas en una translocación cromosómica también se ve influenciada por la organización 3D del genoma. Un ejemplo clásico que evidencia la importancia de dicha organización en la formación de translocaciones, es la t(9;22) cuya etiología ha sido asociada a una cercanía entre las secuencias involucradas en células hematopoyéticas. El impacto funcional de esta translocación cromosómica es evidente en la leucemia mieloide crónica (LMC), sin embargo, las consecuencias en la organización espacial en interfase de los cromosomas derivados producto de la t(9;22) dentro del núcleo aún no han sido exploradas.

2.2 Hipótesis

La organización del genoma es un principio fundamental para la modulación de las funciones celulares, y el posicionamiento de elementos estructurales tan importantes como los CTs dentro del núcleo no es azaroso. Por tanto, se especula que la presencia de la translocación cromosómica t(9;22) afectará directamente en la organización y topología de los CTs derivados involucrados. Así mismo, cambios en dicha organización y topología serán evidentes en las células troncales hematopoyéticas de pacientes con LMC.

2.3 Objetivo

El presente proyecto tiene como finalidad explorar los cambios en las propiedades topológicas de los CTs involucrados en una translocación cromosómica. Con este objetivo planteamos como modelo la t(9;22) presente en la LMC para evaluar dichas propiedades en los CTs 9 y 22 así como de los genes *BCR* y *ABL1* los cuales están directamente involucrados en la translocación. El abordaje de este proyecto se basa en el uso de microscopía de alta resolución y fluorescencia por hibridación *in situ* en núcleos conservados (3D-FISH), los cuales son metodologías que han demostrado ser una herramienta poderosa para el estudio de la organización y topología del genoma tridimensional.

3. METODOLOGÍA

3.1 Captación de muestras

En este estudio se utilizaron muestras de MO de pacientes diagnosticados con LMC en seguimiento clínico (rango de edad de 23 a 64 años; mediana = 37 años). La descripción de la población de estudio captada para este estudio, así como los criterios de inclusión y eliminación se describen detalladamente en el **Anexo 6.1**.

Los pacientes con LMC en el momento del diagnóstico (Naïve) se subclasificaron como respondedores (R) o no respondedores (No-R) según su respuesta al tratamiento con Imatinib (inhibidor de TKI de primera línea para el tratamiento de LMC). Así mismo, los pacientes con LMC que recibieron tratamiento con imatinib se subclasificaron también en subgrupos de R y No-R. Los criterios de respuesta que se emplearon para esta clasificación se basaron en las Guías de Práctica Clínica en Oncología para LMC de la Red Nacional Integral de Cáncer de Estados Unidos (NCCN, por sus siglas en inglés) (103), que se describen en el Anexo 6.2.

Por otro lado, los controles sanos incluyeron 2 muestras de MO de donadores sanos, una de las cuales se compró a Lonza (1M-105, Lonza) y SPM de 5 donadores sanos obtenidos del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Los detalles sobre los pacientes y los donadores sanos se describen en la **Tabla 1**. Así mismo los criterios de inclusión, exclusión y eliminación de las poblaciones de estudio, se describen en el **Anexo 6.1.1**.

Cabe destacar que el presente estudio fue sometido y aprobado por los Comités de ética y de investigación del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). Protocolo autorizado codificado como 013/030/ICI CEI/856/13 (Anexo 6.5). Todos los participantes en el presente estudio fueron informados del mismo y firmaron carta de consentimiento informado antes de la toma de muestra. La plantilla de las cartas de consentimiento informado para las poblaciones de pacientes y donadores sanos se agregan en los **Anexos 6.6.1 y 6.6.2**. Así mismo, el presente estudio fue conducido de acuerdo como las guías de la Declaración de Helsinki.

3.2 Definición de criterios de respuesta

Los criterios de respuesta a imatinib empleados en este estudio han sido definidos previamente (139,140). La respuesta hematológica completa se definió como un recuento de glóbulos blancos inferior a 10×10^9 células/L, recuentos de plaquetas inferiores a 450×10^9 células/L, ausencia de células inmaduras (blastos, promielocitos, mielocitos) en la sangre periférica y desaparición de todos los signos y síntomas relacionados a la leucemia (incluida la esplenomegalia palpable). La respuesta citogenética se define como completa (0% t(9;22)/Ph

negativo), parcial (1% a 35% Ph positivo), menor (36% a 65% Ph positivo) y mínima (66% a 95% Ph positivo). La remisión citogenética se evaluó mediante análisis citogenético de bandas GTG estándar en 20 metafases. La respuesta molecular mayor (RMM) se definió como una relación del transcrito de BCR-ABL/ABL1 inferior al 0,05% por qRT-PCR, lo que representa una reducción de más de 3 log desde el valor inicial. La respuesta molecular completa se definió como niveles indetectables de la transcripción BCR-ABL1, lo que representa una reducción de al menos 4,5 logaritmos de los niveles iniciales.

La respuesta óptima al tratamiento se definió por la respuesta citogenética completa (RCC), la respuesta subóptima al tratamiento se definió por la respuesta citogenética parcial y la resistencia al tratamiento se definió por la respuesta citogenética mínima. Solo los pacientes con respuestas hematológicas, moleculares y citogenéticas óptimas con un seguimiento mínimo de 12 meses se consideraron respondedores. Los pacientes con una respuesta subóptima y resistente después de 12 meses de seguimiento se consideraron no respondedores (Ver **Anexo 7.2**).

3.3 Análisis de cariotipo

El análisis de cariotipo se realizó en todas las muestras de MO y SPM incluidas en este estudio. La preparación de cromosomas y el cariotipo se realizaron de acuerdo con métodos estándar. Se estableció cultivo directo y a corto plazo de MO y SPM. La cosecha y el bandeo GTG se realizaron de acuerdo con procedimientos estándar, y el cariotipo se describió de acuerdo con las pautas del Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenómica Humana 2020 (141).

Como parte de los criterios de inclusión, solo las muestras con cariotipos normales se incluyeron en la población sana de MO, SPM y los pacientes que respondieron a imatinib. Como parte de los criterios de inclusión para pacientes sin tratamiento previo, se requirió la detección de t(9;22). Sin embargo, dado que el grupo TKI No-R no obtiene una respuesta citogenética completa, las células de estos pacientes mostraron mosaicismo, pudiendo observarse cariotipos con y sin t(9;22). Ninguno de los pacientes incluidos mostró anomalías cromosómicas adicionales diferentes de t(9;22) (**Figura 10**).

3.4 Aislamiento de células CD34 +

Es importante resaltar que en la LMC, la célula troncal hematopoyética (HSC) de largo plazo que contiene la translocación t(9;22) se ha establecido como la célula de origen mediante estudios de clonalidad in vivo en humanos (142,143). El antígeno CD34 es uno de los marcadores más importante y usados para la selección de las HSC humanas, y es ello que se utilizó este antígeno como marcador para el aislamiento de estas células en particular.

Se aislaron células troncales y progenitoras hematopoyéticas CD34 + de MO y SPM. Primero, se separaron las células mononucleares de las muestras usando gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich). Posteriormente, las células CD34 + se purificaron a partir de la fracción mononuclear mediante selección positiva utilizando microperlas recubiertas con anti-CD34 y columnas de separación Midi-Macs (Miltenyi, Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.5 Metodología convencional de Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

El patrón de hibridación de las sondas utilizadas en nuestro estudio se verificó mediante FISH convencional en preparaciones de metafase de cada una de las muestras incluidas en el estudio. La técnica de FISH se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vysis and MetaSystems Company). En la **Figura 11** se muestran imágenes representativas del pintado o tinción de cromosoma completo conocido como 'whole chromosome painting' (WCP, por sus siglas en inglés) para los cromosomas 9 y 22 en metafases.

3.6 FISH 3D

Las células CD34+ se colocaron en cubreobjetos (No.1.5) revestidos con poli-L-lisina y se dejaron adherir a 37°C durante 10 min en una incubadora de CO₂. Las células se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 min a TA y luego se lavaron tres veces en Triton X-100 al 0,05%/1xPBS a TA (5 min cada lavado). Posteriormente, las células fijadas se incubaron en Triton X-100 al 0,5%/1xPBS a TA durante 20 min y luego se transfirieron a glicerol al 20%/1xPBS a TA durante al menos 1h. Los cubreobjetos se sumergieron en nitrógeno líquido durante 30s, se dejó descongelar para después volver a sumergir en glicerol al 20%/1xPBS. La etapa de congelación/descongelación se repitió cuatro veces antes de lavar las células en Triton X-100 al 0,05%/1xPBS tres veces durante 5 min. Las células se incubaron en HCl 0,1 N durante 10 min, se lavaron en 2xSSC durante 5 min y se trataron con RNasa A a 37°C durante 1h. Finalmente, las células se mantuvieron en formamida al 50%/2xSSC a TA durante 24 h. Para la hibridación, se utilizó una sonda de fusión dual color BCR/ABL1 (Ref.30-191032 Abbott Molecular, Vysis) y una sonda painting de cromosoma completo para el TC9 y TC22 (Ref. D-1112-125-IR; D1113-125-IR, MetaSystems). La etapa de desnaturalización se realizó a 80 °C durante 3 min en un Hybrite Slide Stainer (Abbott Molecular) y posteriormente se incubó en una cámara húmeda a 37°C durante la noche. Después de la incubación, los portaobjetos se lavaron en 2xSSC durante 10 min y 2xSSC/IGEPAL al 0,1% durante 2 min a TA, 0,4xSSC / IGEPAL al 0,3% durante 2 min a 72 °C y 2xSSC/IGEPAL al 0,1% durante 1 min a TA. Los portaobjetos se tiñeron por contraste con DAPI (0,1 µg/ml), se incubaron durante 10 minutos seguido de tres lavados con 1xPBS y se montaron con una solución de fluorescencia de antidesvanecimiento (Vectashield).

3.7 Inmuno-FISH tridimensional

El 3D inmuno-FISH se realizó en células CD34+ humanas de MO y SPM adheridas a portaobjetos recubiertos de poli-L lisina, como se describe en la sección anterior. Después de tres enjuagues en 1xPBS, las células se permeabilizaron en Triton-X-100/1xPBS al 0,4% durante 20 min en hielo y se incubaron en solución de bloqueo durante 1 h (2,5% de albúmina de suero bovino (BSA), 10% suero normal de cabra, Tween-20 al 0,1%). Las células se incubaron con el anticuerpo primario H3K9ac (Abcam Cat. No. ab10812) y H3K27 me3 (Abcam Cat. No. ab6002) durante una noche a 4°C en una cámara húmeda. Al día siguiente, las células se lavaron con BSA al 0,2%/Tween-20 al 0,1% /1xPBS tres veces durante 5 min a TA y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario ATTO 647N (Thermo Fisher, Cat. No.15048) y DyLight 405 (Thermo Fisher, Cat. No.35501BID) diluido en solución de bloqueo durante 1h a TA en una cámara oscura y húmeda. Los enjuagues se realizaron con Tween-20 al 0,1%/1x PBS tres veces durante 5 min con agitación manteniendo en la oscuridad. La postfijación de las células se realizó con PFA al 2% durante 10 min con tres enjuagues adicionales de 1xPBS. Las células se incubaron con RNasa A durante 1h a 37°C y se lavaron tres veces con 1xPBS. Se realizó una etapa de permeabilización con Triton-X-100/HCl 0,1 M enfriado durante 10 min en hielo. Las células y las sondas painting para el TC9 y el TC22 (Ref. D-1112-125-IR; D1113-125-IR, MetaSystems) se desnaturalizaron simultáneamente en una placa caliente a 80°C durante 3 min y se hibridaron durante la noche a 37°C en cámara oscura y húmeda. Los lavados finales se realizaron tres veces en formamida al 50%/2xSSC y tres veces en 2xSSC a 37°C durante 5 min cada uno. Finalmente, las células se montaron con 10 µl de medio de montaje (Vectashield) y se sellaron.

3.8 Microscopía y adquisición de imágenes

Se realizó microscopía de iluminación estructurada tridimensional (3D-SIM) en un microscopio Zeiss Elyra PS.1 equipado con una lente de objetivo invertido de inmersión en aceite Zeiss Plan Apochromat 100x/1.46 usando una cámara Andor EM-CCD. Se utilizaron láseres de diodo a 405, 488, 561 y 642 nm y los correspondientes filtros de emisión estándar. Los planos en el eje 'z' se adquirieron con cinco fases por plano de imagen. Los planos de las imágenes 3D-SIM se adquirieron a intervalos de 200nm para las imágenes de TCs, 125nm para inmuno-FISH y 85nm para los genes *BCR* y *ABL1* y FISH cuádruple en cada núcleo, y consistieron en 60-120 cortes tomados secuencialmente. Se seleccionó un campo de visión y los límites del plano 'z' se definieron manualmente. Se utilizaron perlas TetraSpeck (200 nm) (T7280, Thermo Fisher Scientific) para calibrar los parámetros de alineación entre los diferentes canales. El tamaño de píxel lateral, D_x y D_y , fue de 79 nm en las imágenes grabadas y de 40 nm en la imagen reconstruida. La reconstrucción computacional de imágenes para ELYRA PS.1 se realizó utilizando funciones de transferencia óptica teóricas (OTF) y el algoritmo Zeiss (ZEN Black).

3.9 Análisis de imágenes

La reconstrucción y el análisis de imágenes tridimensionales se realizaron con el software Imaris (Versión 9.1.2, Bitplane). Para el análisis se utilizó la imagen en 3D completa y se estudió un mínimo de 25 células por sujeto. Para todas las imágenes analizadas, se utilizó un filtro de sustracción de fondo, aplicando un filtro gaussiano para definir el fondo en cada vóxel y realizando una sustracción de línea base de este fondo variable. La segmentación de los compartimentos de los TCs se llevó a cabo en cada conjunto de imágenes 3D que representa los canales de cada color para los TCs híbridos y se identificaron automáticamente. Todas las intensidades de vóxel por debajo de un umbral establecido automáticamente se establecieron en cero. Con un procedimiento iterativo, se estimó un valor de umbral para cada conjunto de datos de imágenes 3D de los TCs. El tamaño y la forma de la superficie generada fueron un mapa directo de la distribución de intensidad del marcado de la sonda dentro del núcleo detectado por Imaris. El procedimiento de segmentación se supervisó fusionando el contorno del objeto segmentado con el objeto original. Cualquier ajuste a la forma de la superficie se realizó alterando el tamaño de la superficie para reducir el ruido de fondo alrededor de la periferia durante la detección en lugar de encoger o expandir manualmente el modelo 3D. Esto resultó en el mejor enmascaramiento 3D para el núcleo, los cromosomas y los genes, que es fundamental para la cuantificación de los parámetros estudiados.

3.9.1 Definición de compartimentos en CTs

La reconstrucción 3D generada utilizando los parámetros antes mencionados se aplicó para la identificación del compartimento. Para identificar un compartimento separado, demostramos visualmente la disposición polarizada de los compartimentos. Calculamos el índice de polarización para los compartimentos definidos de la siguiente manera:

$$\sqrt{\left(1 - \frac{VS}{VA}\right) \left(1 - \frac{VS}{VB}\right)}$$

donde VA y VB son los volúmenes de los compartimentos y VS es el volumen compartido entre ellos (4). Solo los compartimentos con un índice de polarización de 1, lo que significa una desconexión completa entre ellos, se consideraron y contaron como compartimentos separados.

3.9.2 Volumen de los CTs

El volumen absoluto de cada CT se calculó sumando el número de vóxel dentro de la imagen segmentada en 3D. El volumen cromosómico normalizado se calculó dividiendo el volumen cromosómico absoluto por el volumen nuclear absoluto (ver **Figura 13**).

3.9.3 Factor de descompactación de cromatina (CDF)

Para estimar el factor de descompactación cromosómica, obtuvimos la longitud de secuencia para los cromosomas 9 y 22 de la base de datos de NCBI ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid9606\[orgn\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=txid9606[orgn])). El factor de descompactación cromosómica se definió como $\frac{Norm V_{CT}}{L_{CT} (Mbp)} \times 10^4$, donde $Norm V_{CT}$ es el volumen cromosómico normalizado y L_{CT} es la longitud del cromosoma en Mbp (144). Consultar **Figura 17A**.

3.9.4 Cuantificación de la ocupación de las MPTs histonas en TCs

Se utilizaron imágenes SIM en serie del 3D immuno-FISH para reconstrucciones 3D y la cuantificación de MPH de histonas. Para la estimación del umbral, se tomó en cuenta el conjunto de imágenes seriales para cada canal, se seleccionó un pequeño volumen 3D separado del área fuera del núcleo. La intensidad media de este "sub-conjunto de fondo" se calculó y se utilizó como línea de base para calcular el umbral. La cuantificación de la intensidad media del vóxel se midió con el software Imaris seleccionando el área del TC utilizando la herramienta 'Surfaces' y extrayendo la información de fluorescencia. El análisis de la intensidad de la señal frente al TC tridimensional se realizó midiendo el valor de gris medio en una región de interés (ROI) en cada conjunto de imágenes. Para la cuantificación de las señales superpuestas relativas, se creó un canal de colocalización y se realizó el análisis en todas las series ópticas en 'z'. Los niveles relativos de H3K9ac y H3K27me3 se calcularon como una relación de la suma de intensidad en el canal del anticuerpo sobre la del canal de tinción del DNA, tanto para CT9 (canal verde) como para CT22 (canal naranja).

3.9.5 Definición de distancia mínima

Los centros de gravedad de los CTs, es decir el punto central de cada compartimiento de los territorios tomando en cuenta su tridimensionalidad, se determinaron automáticamente con el software Imaris, y estos centros se utilizaron para estimar las distancias entre cada compartimiento de CT y la señal de *locus* de los genes. Las distancias más cortas se definieron después de medir todas las distancias entre los compartimientos identificados y el *locus* del alelo. Sólo se informaron las distancias mínimas entre los CTs heterólogos y entre los genes *BCR* y *ABL1*. Se debe tener en cuenta que se consideraron las distancias entre los genes que forman la fusión BA. Consultar la **Figura 20A-B**.

3.9.6 Posición radial relativa

La posición radial relativa se midió desde el centro de gravedad del núcleo, que se definió como 0, y la distancia entre 0 y cada señal alélica; los centros de gravedad del CT se definió como r_A . La relación nuclear (r_B) se definió como la distancia entre 0 y la periferia nuclear (1)

que pasa por el centro de la señal. La posición radial relativa (r) con respecto al centro nuclear se calculó como una fracción de r_B ($r=r_A/r_B$). Consultar la **Figura 21A-B**.

3.9.7 Determinación de la ubicación de los genes dentro de su respectivo TC

Se calculó la colocación de la señal como un determinante del posicionamiento del gen dentro de su TC. En este sentido, el software cuantificó el número de vóxeles correspondientes al *locus* del gen, que se superpusieron con su respectivo TC. Cuando el nivel de colocación fue inferior al 50%, la ubicación entre el *locus* del gen y el borde del TC se consideró fuera del TC. Por el contrario, si el nivel de colocación entre el *locus* génico y el TC era superior al 50%, la ubicación entre este *locus* génico y el TC se consideraba dentro del territorio.

3.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Un valor de p de 0,01-0,05 se consideró significativo (*), los valores de p de 0,001-0,01 se consideraron muy significativos (**) y los valores de $p < 0,001$ se consideraron extremadamente significativos (***, ****). Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 7.0.

4. RESULTADOS

Reconstrucción 3D a partir de imágenes 3D-SIM revelan que los CTs 9 y 22 se encuentran disociados en pacientes LMC que no responden al tratamiento con TKI

Utilizamos la tecnología de 3D-SIM para el análisis de CT9 y CT22 en células CD34+ aisladas de médula ósea (BM, por sus siglas en inglés) (n=2) o sangre periférica movilizada (MPB, por sus siglas en inglés) (n=5) de donantes sanos o pacientes con LMC que no habían recibido tratamiento previo (n=10) y tratados con inhibidores de la cinasa de tirosina (n=10). Los pacientes con LMC se subclasificaron según su respuesta o falta de respuesta al tratamiento de primera línea con TKI (imatinib), lo que dio lugar a 4 grupos de pacientes con LMC: **1)** pacientes sin tratamiento previo (Naïve, por su especificación en inglés) que respondieron a los inhibidores de cinasa de tirosina después de ser tratados (Naïve-R); **2)** pacientes sin tratamiento previo que no respondieron a su tratamiento posterior con TKI (Naïve non-R); **3)** pacientes que recibieron TKI y respondieron (TKI-R); y **4)** pacientes que recibieron TKI y no respondieron (TKI non-R) (**Figura 7**). Los criterios de respuesta utilizados en este estudio se definieron de acuerdo con las pautas de práctica clínica en oncología para la LMC de la Red Nacional Integral de Cáncer (NCCN, por sus siglas en inglés) (103).

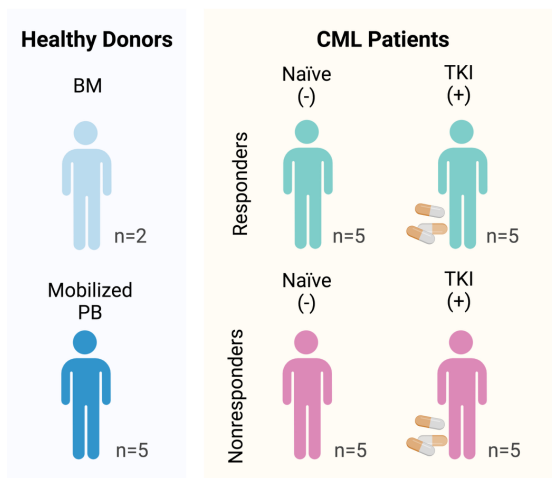


Figura 7. Se invitó a pacientes con LMC a participar en este estudio al momento del diagnóstico (sin tratamiento previo o Naïve) y se clasificaron como respondedores (R) o no respondedores (no R) según su respuesta posterior al tratamiento de primera línea con TKI. Se estudió otro subconjunto de pacientes después del tratamiento con TKI y se clasificó como R y no R (ver Tabla 1). Las células CD34+ analizadas se aislaron de muestras de médula ósea (BM) de los pacientes con LMC. Asimismo, se utilizaron como controles muestras de MO y sangre periférica movilizada (MPB) de donantes sanos.

Se evaluaron las respuestas hematológicas, moleculares y citogenéticas de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio. Los detalles sobre las características demográficas y de la enfermedad de todos los pacientes se resumen en la **Tabla 1**. Las muestras se procesaron para 3D-FISH y la reconstrucción 3D se realizó utilizando imágenes SIM. Para cada célula CD34+ adquirida, se realizó una reconstrucción 3D-FISH para los genes *ABL1* y *BCR* en los ejes x, y, x, z (**Figura 8A**), así como una reconstrucción 3D-FISH para las sondas de cromosoma completo de CT9 y CT22 en los ejes x,y y x,z (**Figura 8B**).

Tabla 1. Características demográficas y basales de los pacientes con LMC y de los donantes sanos incluidos en el estudio

Grupo	Clave de identificación	Género	Edad al momento de la toma de muestra (años)	Cariotipo al momento de la toma de muestra	Etapa de la enfermedad al momento de la toma de muestra	Edad al momento del diagnóstico (años)	Índice Sokal de riesgo	Tratamiento TKI previo al momento de la toma de muestra	Tiempo de seguimiento después del diagnóstico (meses)	Estado actual
Healthy BM Médula ósea sana	HBM-1	F	33	46,XX[20]						
	HBM-2*	M	25	No performed						
MPB Sangre periférica movilizada (MPB)	MPB-1	M	33	46,XY[20]						
	MPB-2	M	46	46,XY[20]						
	MPB-3	F	29	46,XX[20]						
	MPB-4	M	27	46,XY[20]						
	MPB-5	F	38	46,XX[20]						
Naïve-R Pacientes LMC al momento del diagnóstico y que posteriormente respondieron a TKI Imatinib	CML-1	M	34	46,XY,t(9;22)[20]	CP	34	Bajo	0	47	Vivo
	CML-2	M	25	46,XY,t(9;22)[20]	CP	25	Alto	0	39	Vivo
	CML-3	M	47	46,XY,t(9;22)[20]	CP	47	Alto	0	36	Vivo
	CML-4	M	30	46,XY,t(9;22)[20]	CP	30	Alto	0	32	Vivo
	CML-5	F	23	46,XX,t(9;22)[20]	CP	23	Alto	0	31	Vivo
Naïve Non-R Pacientes LMC al momento del diagnóstico y que posteriormente NO respondieron a TKI Imatinib	CML-6	M	34	46,XY,t(9;22)[20]	CP	34	Alto	0	32	Muerte
	CML-7	F	47	46,XX,t(9;22)[20]	CP	47	Alto	0	30	Muerte
	CML-8	F	27	46,XX,t(9;22)[20]	AP	27	Alto	0	28	Muerte
	CML-9	M	64	46,XY,t(9;22)[20]	CP	64	Alto	0	15	Vivo
	CML-10	M	44	46,XY,t(9;22)[20]	CP	44	Alto	0	29	Vivo
TKI-R Pacientes LMC en tratamiento que han respondido favorablemente al TKI Imatinib	CML-11	F	48	46,XX[20]	DFS	36	Bajo	Imatinib	204	Vivo
	CML-12	M	26	46,XY[20]	DFS	20	Bajo	Imatinib	132	Vivo
	CML-13	M	54	46,XY[15]	DFS	41	Alto	Imatinib	204	Vivo
	CML-14	M	35	46,XY[20]	DFS	23	Alto	Imatinib	186	Vivo
	CML-15	F	49	46,XX[20]	DFS	43	Bajo	Imatinib	108	Vivo
TKI Non-R Pacientes LMC con resistencia al tratamiento, es decir, NO han respondido al TKI Imatinib	CML-16	M	39	46,XY,t(9;22)[2]/46,XY[18]	Resistencia a TKI	37	Bajo	Imatinib Nilotinib	32	Vivo
	CML-17	M	36	46,XY,t(9;22)[5]/46,XY[10]	Resistencia a TKI	31	Bajo	Imatinib Dasatinib	86	Muerte
	CML-18	M	35	46,XY,t(9;22)[3]/46,XY[11]	Resistencia a TKI	34	Alto	Imatinib Dasatinib	31	Muerte
	CML-19	M	38	46,XY,t(9;22)[2]/46,XY[16]	Resistencia a TKI	32	Bajo	Imatinib Nilotinib	96	Vivo
	CML-20	F	42	46,XY,t(9;22)[1]/46,XY[19]	Resistencia a TKI	41	Bajo	Imatinib Nilotinib	29	Vivo

Abreviaturas: Healthy BM, médula ósea sana; MPB, sangre periférica movilizada; CML, leucemia mieloide crónica; TKI, inhibidor de cinasa de tirosina; R, respondedores; Non-R, sin respondedores; F, mujer; M, hombre; CP, fase crónica; AP, fase acelerada; SLE, supervivencia libre de enfermedad.

* Se adquirieron muestras de BM frescas y saludables de Lonza (1M-105, Lonza).

¥ El índice Sokal se basa en la edad del paciente, el tamaño del bazo en el examen clínico, el recuento de plaquetas y el porcentaje de blastos en sangre periférica.

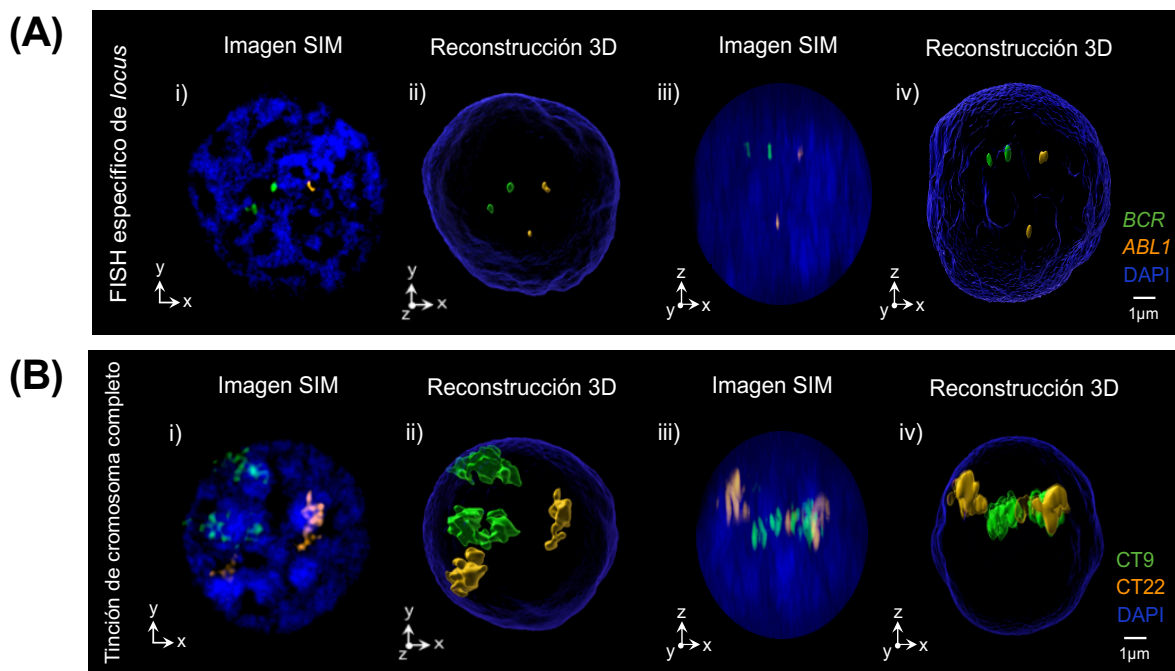


Figura 8. Imágenes representativas de SIM y sus respectivas reconstrucciones tridimensionales. (A) 3D-FISH para los genes *BCR* (señal verde) y *ABL1* (señal naranja). La imagen muestra una sección transversal media representativa (ejes x,y) de la captura 3D SIM (i) y su respectiva reconstrucción 3D (ii) de células CD34+ de un donante sano. Se muestra la sección transversal ortogonal a través de toda la pila de imágenes en 3D (ejes x,z) (iii) y su reconstrucción en 3D (iv) de la misma célula. Es importante resaltar que solo 3 de los 4 loci esperados en una célula sana son visibles en (i), y dado que la cuarta señal está localizada en otro plano, solo se observa en la reconstrucción 3D (ii) y la vista axial x,z (iii y iv). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul). **(B)** FISH tridimensional para los territorios cromosómicos (CT) 9 y 22. Sección transversal media representativa (ejes x,y) de una imagen 3D SIM (i) y su respectiva reconstrucción 3D (ii) de un núcleo correspondiente a una célula CD34+ en interfase, mostrando CT9 (verde) y CT22 (naranja). Sección transversal ortogonal a través de toda la pila de imágenes 3D (ejes x z) del mismo núcleo celular (iii) y su respectiva reconstrucción 3D (iv). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (azul).

El 3D-FISH específico de *locus* para *BCR* y *ABL1* mostró la translocación $t(9;22)$ esperada en los pacientes con LMC sin tratamiento previo, así como en los pacientes con LMC non-R con TKI (**Figura 9A**). Después de analizar las reconstrucciones 3D para CT9 y CT22, observamos una cantidad diferencial de compartimentos de cromatina por cada CT (**Figura 9B**); en particular, los pacientes non-R mostraron un patrón de compartimentación de CTs que aparentemente se vio alterado en comparación con los controles sanos. Cabe destacar que no se observaron alteraciones en los cromosomas en metafase de pacientes con LMC analizados por cariotipo convencional (**Figura 10**) y tampoco se observó ningún patrón alterado en la hibridación con FISH convencional de los cromosomas 9 y 22 en metafase (**Figura 11**), lo que indica que los reordenamientos topológicos aparecen exclusivamente durante la interfase.

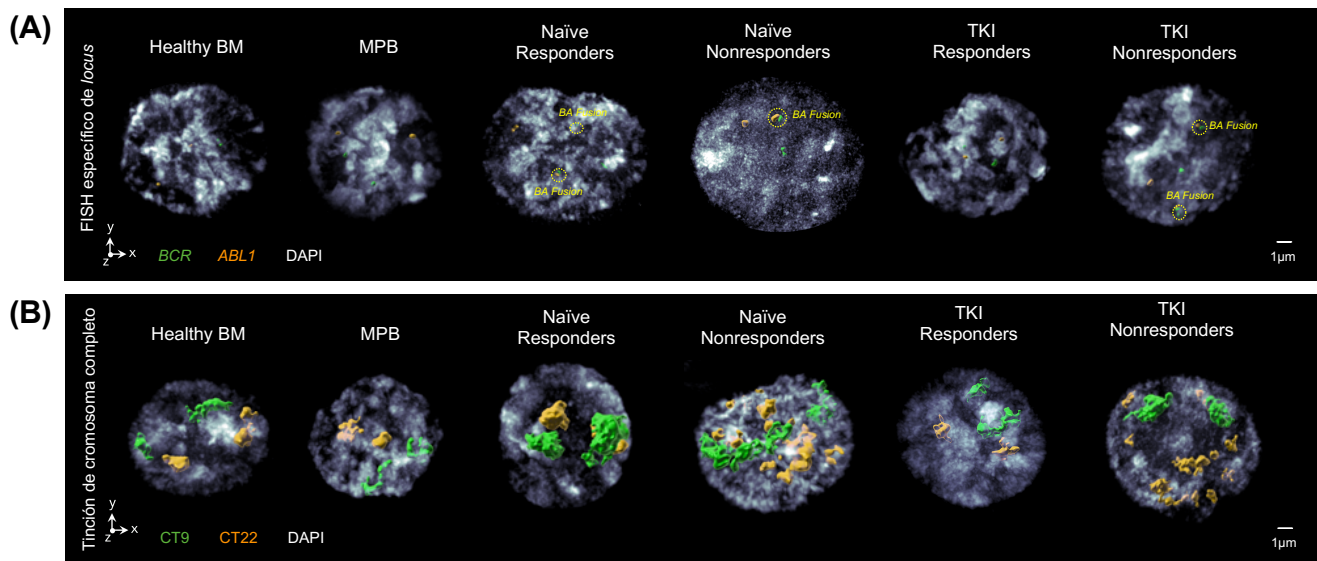


Figura 9. Análisis de imágenes 3D-SIM para el estudio de territorios cromosómicos en CML revelan una cantidad diferencial de compartimientos por CT. (A) Imágenes representativas de SIM y reconstrucción 3D de células CD34 + a partir de 3D-FISH de *locus* específicos para los genes *BCR* (verde) y *ABL1* (naranja). Es importante señalar que la translocación t(9;22), que fusiona los genes *BCR* y *ABL1*, está presente en células de pacientes con LMC sin tratamiento previo y en las muestras de pacientes TKI non-R (círculos punteados). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (blanco). (B) Imágenes representativas de SIM y reconstrucción 3D de células CD34+ a partir de 3D-FISH para cromosoma completo CT9 (verde) y CT22 (naranja). Tenga en cuenta que los CTs aparecen alterados en los grupos Naïve non-R y TKI non-R, en marcado contraste con las células CD34+ de donantes sanos y los grupos R y Naïve TKI-R. Los núcleos se contratiñeron con DAPI (blanco). Las barras de escala representan 1 μm.

Al cuantificar el número de compartimientos por CT, encontramos que variaban sustancialmente entre los grupos y que se identificaban en patrones distintos que llamamos "variantes de CTs". En este sentido, un CT se consideró "disociado" cuando estaba compartimentado en más de 5 compartimientos. Por lo tanto, se distinguieron un total de 14 variantes de CT distintas, que abarcan al menos 2 categorías: CT no interrumpidos (variantes 1-10) y CT interrumpidos (variantes 11-14) (Figura 12A).

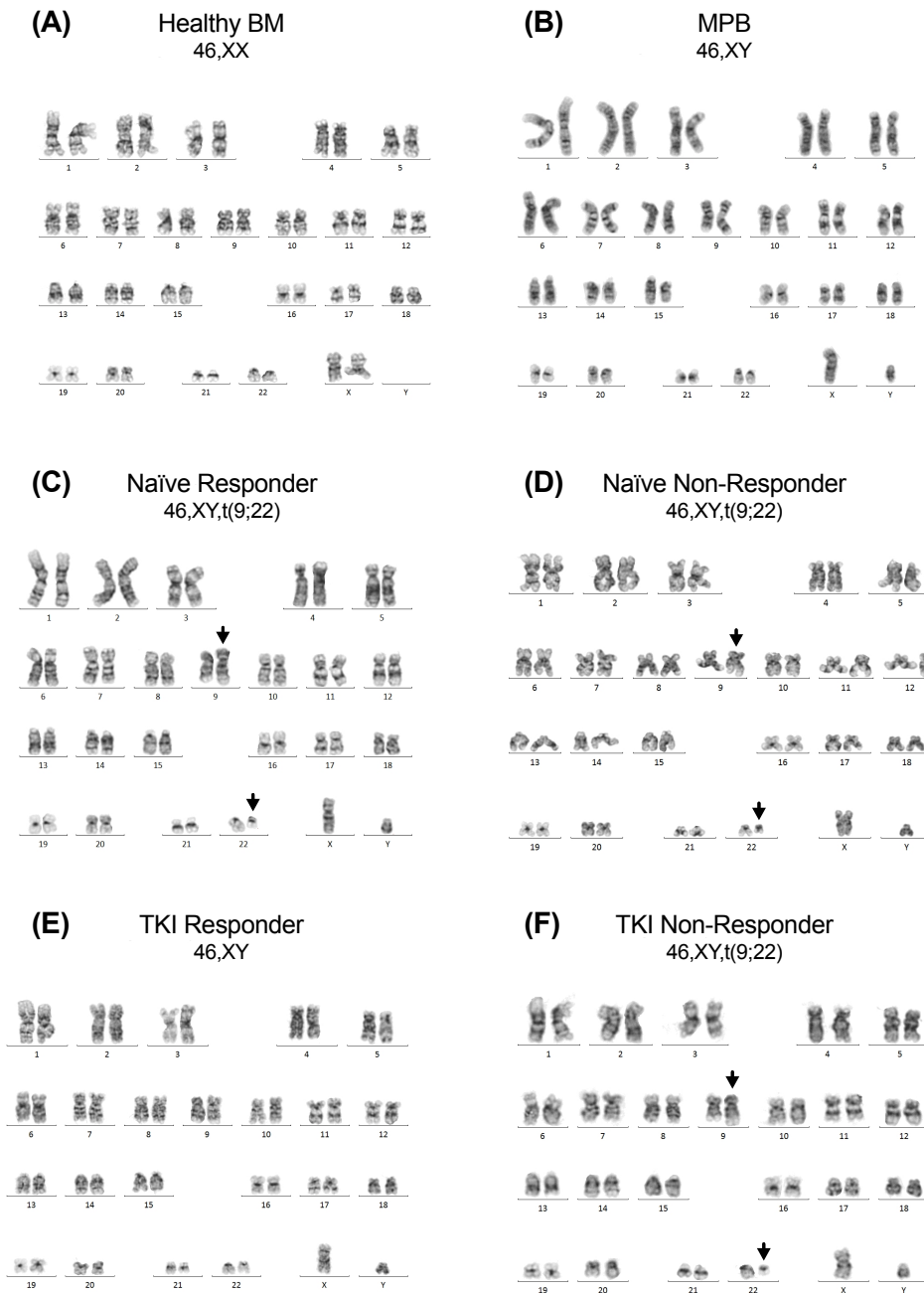


Figura 10. Cariotipos de bandas G representativos de la médula ósea de los pacientes incluidos en el estudio. (A) Cariotipo femenino normal (46,XX) de MO de un donante sano. (B) Cariotipo masculino normal (46,XY) en MPB de un donante sano. (C) Cariotipo anormal 46,XY,t(9;22) de MO de un paciente con LMC sin tratamiento previo al momento del diagnóstico. Este paciente respondió posteriormente al tratamiento de primera línea con TKI. (D) Cariotipo anormal 46,XY,t(9;22) de MO de un paciente con LMC sin tratamiento previo al momento del diagnóstico. Este paciente no respondió posteriormente al tratamiento de primera línea con TKI. (E) Cariotipo masculino normal (46,XY) de MO de un paciente con LMC con respuesta citogenética completa que ya no presenta translocación cromosómica t(9;22) tras recibir tratamiento con TKI. (F) Cariotipo anormal 46,XY,t(9;22) de MO de un paciente con LMC que, tras recibir tratamiento de primera línea con TKI, no presentó respuesta citogenética completa. Los cromosomas derivativos en todos los casos se indican con una punta de flecha.

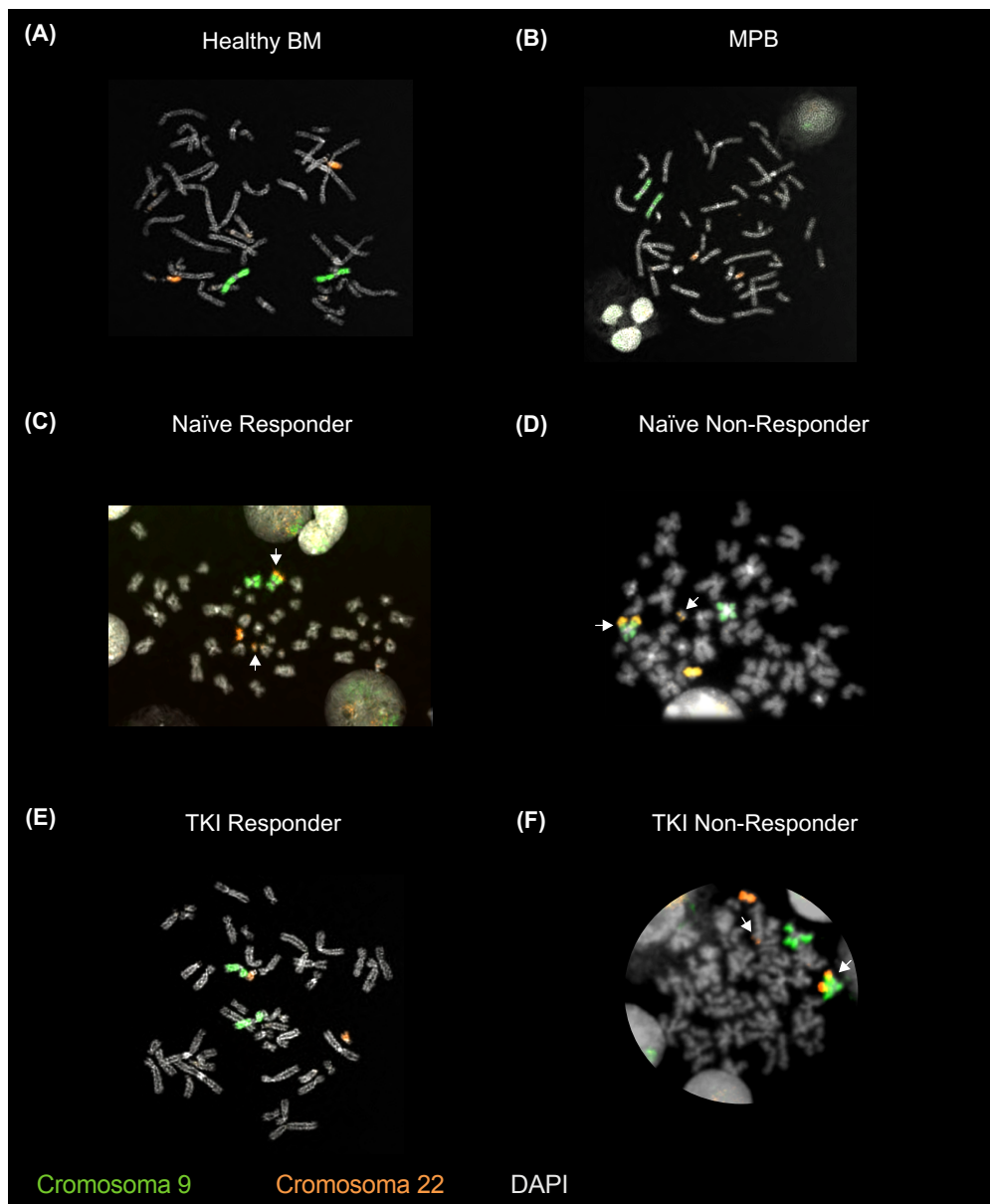


Figura 11. Metafases representativas de la población de estudio que muestran la tinción para cromosoma completo correspondientes a los cromosomas (Chrs) 9 (señal verde) y 22 (señal naranja), hibridados simultáneamente mediante la técnica convencional de FISH. (A) Localización de señales FISH normales de los Chrs 9 y 22 en una metafase de BM de un donante sano. (B) Localización de señales FISH normales de los Chrs 9 y 22 en una metafase MPB de un donante sano. (C) Localización de señales FISH en los Chrs derivados 9 y 22 originados a partir de la t(9;22) (indicados con flechas) en la BM de un paciente sin tratamiento previo. Este paciente respondió posteriormente al tratamiento de primera línea con TKI. (D) Localización de señales FISH en los Chrs derivados 9 y 22 originados a partir de la t(9;22) (indicados con flechas) en la BM de un paciente sin tratamiento previo. Este paciente no respondió posteriormente al tratamiento de primera línea con TKI. (E) Localización de señales FISH normales en los Chrs 9 y 22 en la BM de un paciente con LMC con una respuesta citogenética completa que ya no presenta la t(9;22) después del tratamiento con TKI. (F) Localización de señales FISH en los Chrs derivados 9 y 22 originados a partir de la t(9;22) (indicados con flechas) en la BM de un paciente con LMC que, después de recibir tratamiento de primera línea con TKI, no presentó una respuesta citogenética completa y todavía presenta la t(9;22) después del tratamiento con TKI. La contra-tinción con DAPI se convirtió en escala de grises para simular un patrón de bandas G.

El patrón más común en los grupos sanos y en los pacientes con LMC respondedores fue la variante 1, caracterizada por la presencia de dos compartimentos tanto para CT9 como para CT22. Las variantes 2, 3 y 4 fueron comunes en muestras sanas y se caracterizaron por la coalescencia de CT9 o CT22 en un solo compartimento sin separación distinguible. Las variantes 5-10 (excepto la variante 7) mostraron CT9 o CT22 con 2 o más compartimentos, pero no más de 4 compartimentos. En marcado contraste, las TC en los pacientes que no respondieron a la LMC exhibieron una mayor variabilidad de las variantes y mostraron sorprendentemente una alta proporción de 'variantes disociadas' (variantes 11-14) (Figura 12B). Esta variabilidad en la organización de CT9 y CT22 es un indicativo de heterogeneidad a nivel unicelular, posiblemente explicada por la variación intrínseca de las subpoblaciones de células CD34+, pero también un reflejo de los cambios funcionales en la arquitectura del genoma en interfase relacionados con el control de la expresión génica. A su vez, la alteración de los CTs revela cómo los mecanismos que mantienen la estructura de la cromatina están desregulados en la LMC.

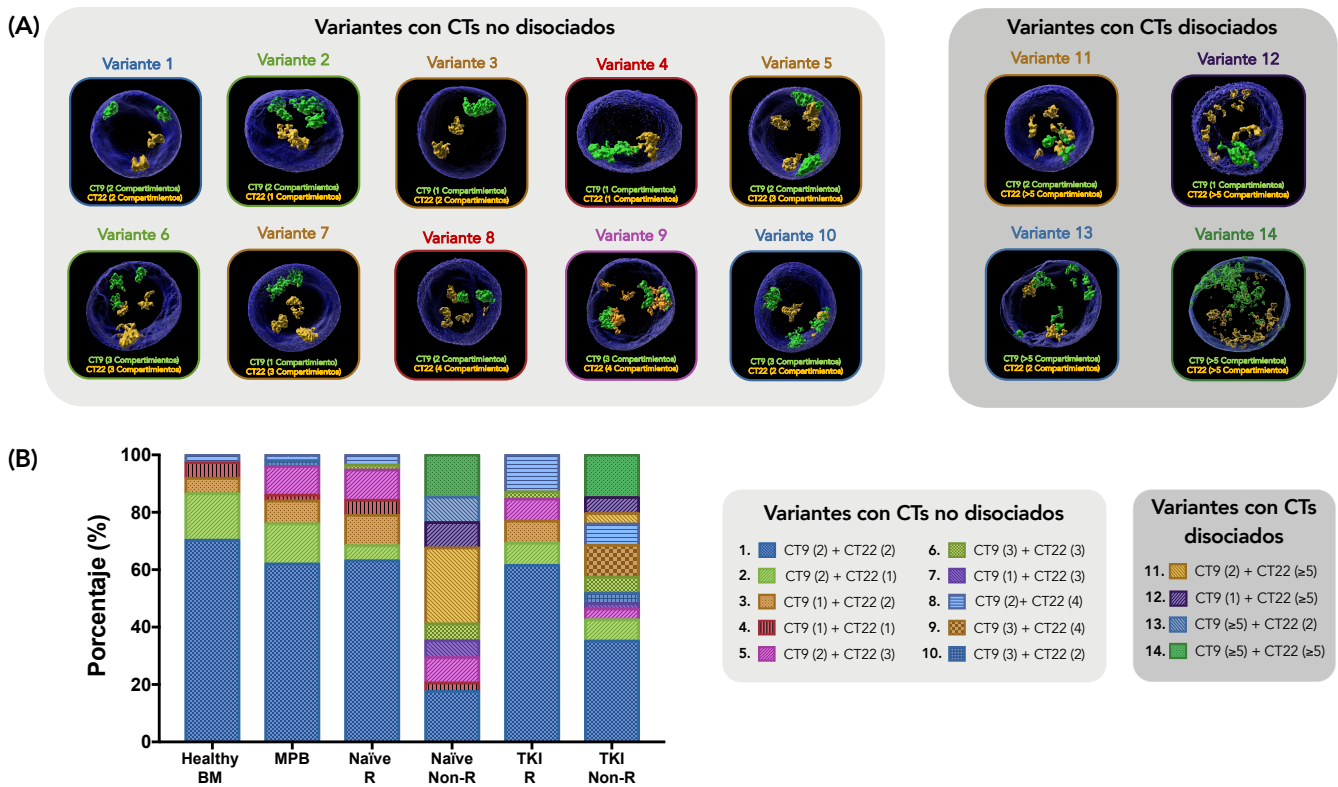


Figura 12. La disociación de los CTs se correlaciona con la ausencia de respuesta a los TKIs. (A) Reconstrucciones 3D representativas que muestran las diferentes variantes de CT identificadas en células CD34+. Las variantes de CTs se numeraron del 1 al 14 de acuerdo con las diferentes combinaciones de compartimentos de CTs identificados. Las células se clasificaron según el número de compartimentos identificados en 'CT no disociados' (variantes 1-10) o 'CTs disociados' (variantes 11-14) cuando se identificaron 5 o más compartimentos de CT9 y/o CT22. El número total de compartimentos por CT se indica entre paréntesis. **(B)** Distribución de las variantes de CT por grupo. Es destacable que los grupos no respondedores a TKI tienen una gran proporción de variantes de CTs disociados.

Además, cuantificamos el número de células con regiones sobrelapadas ('intermingling' es el término designado en inglés) entre CTs heterólogos, independientemente del número de compartimentos identificados (Figura 13A). Como era de esperar, los grupos con translocación t(9;22) mostraron un alto porcentaje de entremezclado entre sus CTs, particularmente en los grupos non-R, en comparación con los grupos sin translocación cromosómica (Figura 13B). Es de destacar que el porcentaje de células con CT entremezclados fue mayor en los pacientes con TKI-R que en los controles sanos, a pesar de la ausencia de la translocación t(9;22). Dada la asociación entre la proximidad espacial de los CTs y la probabilidad cada vez mayor de participar en una translocación cromosómica, la proporción elevada de CT entremezcladas en el grupo TKI-R sugiere una característica topológica que puede predisponer a los pacientes a la formación t(9;22).

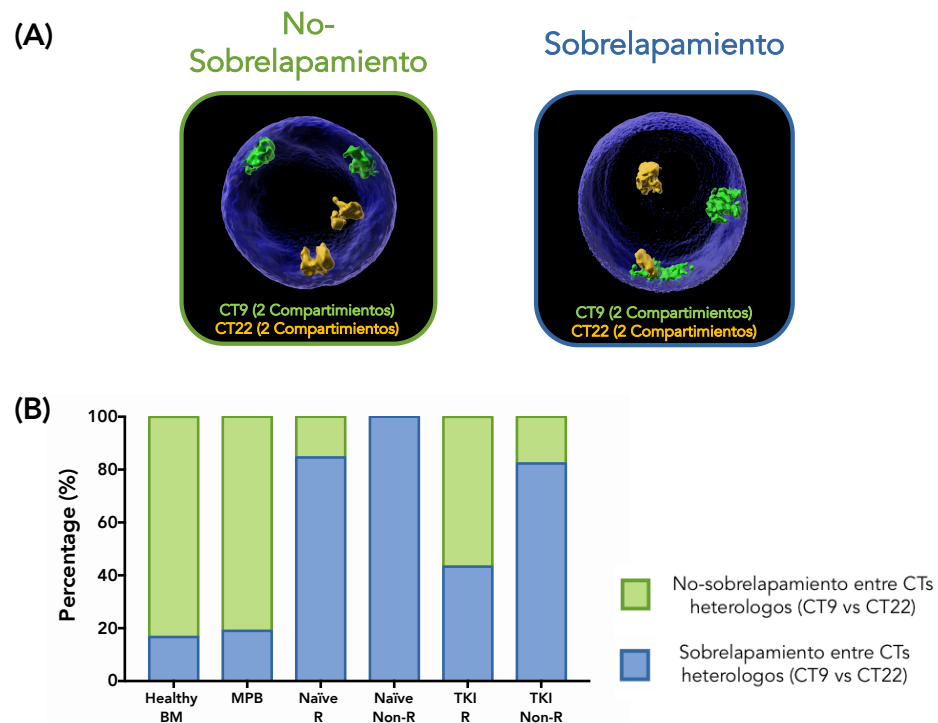


Figura 13. (A) Izquierda. Reconstrucción 3D representativa que muestra una célula con CTs heterólogos completamente separados (no sobrelapados). Derecha. Reconstrucción 3D representativa que muestra una célula con un sobrelapamiento entre CTs heterólogos (sobrelapados). (B) Proporción de sobrelapamiento entre los CTs heterólogos en cada grupo. La mayor proporción de células con sobrelapamiento entre CTs se muestra en los grupos con la translocación t(9;22).

La disociación de los CTs correlaciona con un aumento en los volúmenes, extensas regiones de sobrelapamiento y un aumento en la descompactación de la cromatina.

Dados los niveles de disociación de los CTs en los grupos no respondedores al tratamiento con TKI, decidimos explorar si estos cambios se reflejaban en los volúmenes de CT9 y CT22.

Para evitar artefactos derivados de la variación del tamaño de los núcleos, normalizamos los volúmenes de cada CT en referencia a sus respectivos núcleos (**Figura 14**).

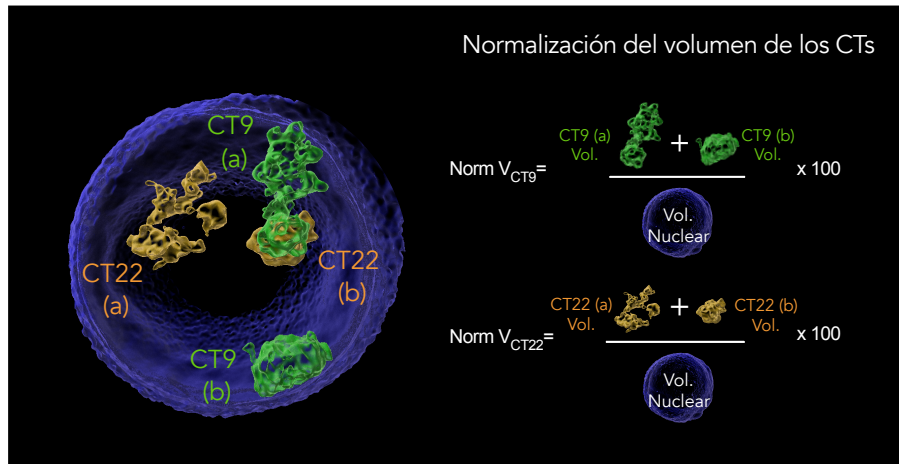


Figura 14. Imagen representativa que muestra la reconstrucción 3D de una célula CD34 + y sus respectivos CTs a partir de los cuales se realizaron cálculos de volumen y normalizaciones posteriores. Izquierda; La reconstrucción muestra dos compartimentos reconocibles para CT9 (verde, CT9 (a) y CT9 (b)) y dos compartimentos reconocibles para CT22 (naranja, CT22 (a) y CT22 (b)). Derecha; Esquemas que muestran cómo se normalizaron los volúmenes de CT9 y CT22. El volumen de los compartimentos reconocibles de CTs (CT9 o CT22) se dividió por el volumen nuclear de la célula y se multiplicó por 100.

Después de calcular los volúmenes nucleares de las células CD34+ de todos los grupos, observamos los núcleos más grandes en el grupo Naïve non-R y los núcleos más pequeños en el grupo MPB (**Figura 15A**). Después de la normalización de cada uno de los CTs, observamos claras diferencias entre los pacientes con LMC; en particular, las poblaciones Non-R mostraron los volúmenes más grandes tanto para CT9 (**Figura 15B**) como para CT22 (**Figura 15C**).

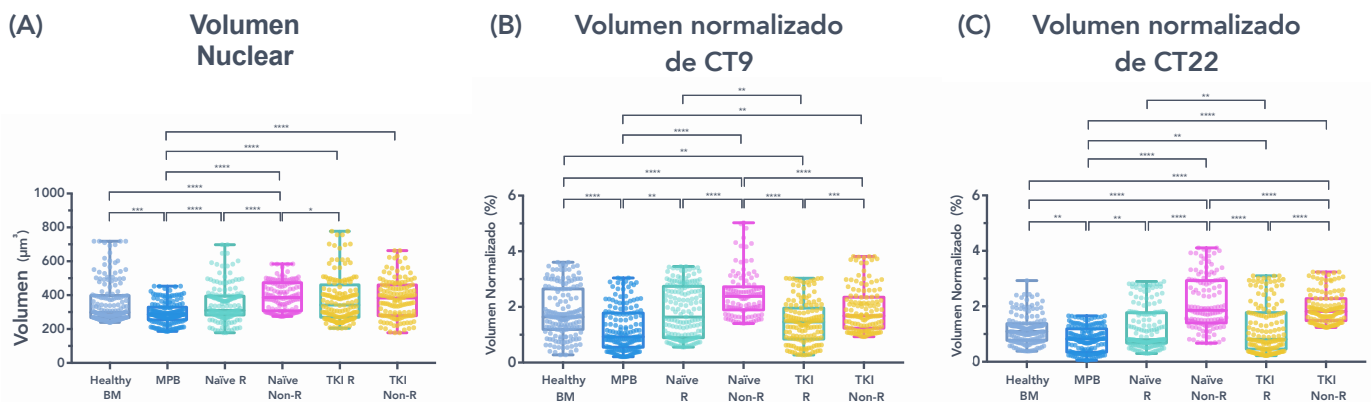


Figura 15. Volumen nuclear y volumen normalizado para los CTs. (A) Distribución del volumen nuclear entre los grupos de estudio. (B) Comparación de los volúmenes normalizados del CT9 entre los grupos de estudio. (C) Comparación de los volúmenes normalizados del CT22 entre los grupos de estudio.

Así mismo, se calculó el volumen de las regiones sobrelapadas entre los CTs heterólogos (Figura 16A), y el grupo Naïve non-R mostró el mayor volumen de sobrelapamiento (Figura 16B). Curiosamente, en algunas células del grupo TKI-R, el volumen de sobrelapamiento fue similar a los volúmenes observados en los pacientes con LMC que presentan la t(9;22).

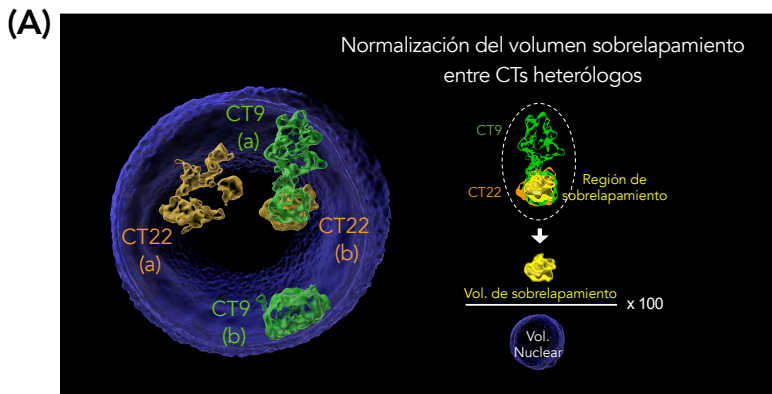
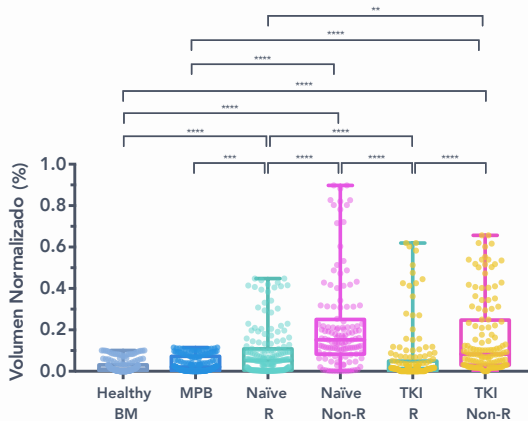


Figura 16. El volumen de sobrelapamiento entre CTs heterólogos muestra diferencias significativas entre los pacientes Naïve que respondieron y los que no respondieron al tratamiento con TKI. (A) Izquierda. Imagen representativa que muestra la reconstrucción 3D de una célula CD34+ y sus respectivos CTs. En la imagen se muestran dos compartimientos del CT9 (verde, CT9(a) y CT9(b)), y dos compartimientos reconocibles del CT22 (naranja, CT22(a) y CT22(b)). El sobrelapamiento en este ejemplo está dado por los CTs 9(a) y 22(b). Derecha. Reconstrucción esquemática en 3D que muestra la región de sobrelapamiento entre dos cromosomas heterólogos (amarillo). El volumen de sobrelapamiento normalizado se definió como el volumen total donde los CTs heterólogos se superpusieron y posteriormente se normalizaron al volumen nuclear y se multiplicaron por 100. (B) Volumen normalizado de sobrelapamiento entre CT9 y CT22 entre los grupos de estudio.

(B) Volumen normalizado de sobrelapamiento



Para evaluar la superposición entre CTs, calculamos la proporción de la región sobrelapada para cada CT (Figura 17A). De este modo, determinamos el porcentaje de CT9 que se superpone con CT22 (Figura 17B) y el porcentaje de CT22 que se superpone con CT9 (Figura 17C). Como observamos en el análisis de sobrelapamiento, la mayor proporción de superposición tanto para CT9 como para CT22 se produjo en el grupo sin tratamiento previo que no respondió al tratamiento, Naïve Non-R, seguido del grupo sin tratamiento que respondió posteriormente al tratamiento (Naïve R), y ambos CTs mostraron porcentajes de superposición similares.

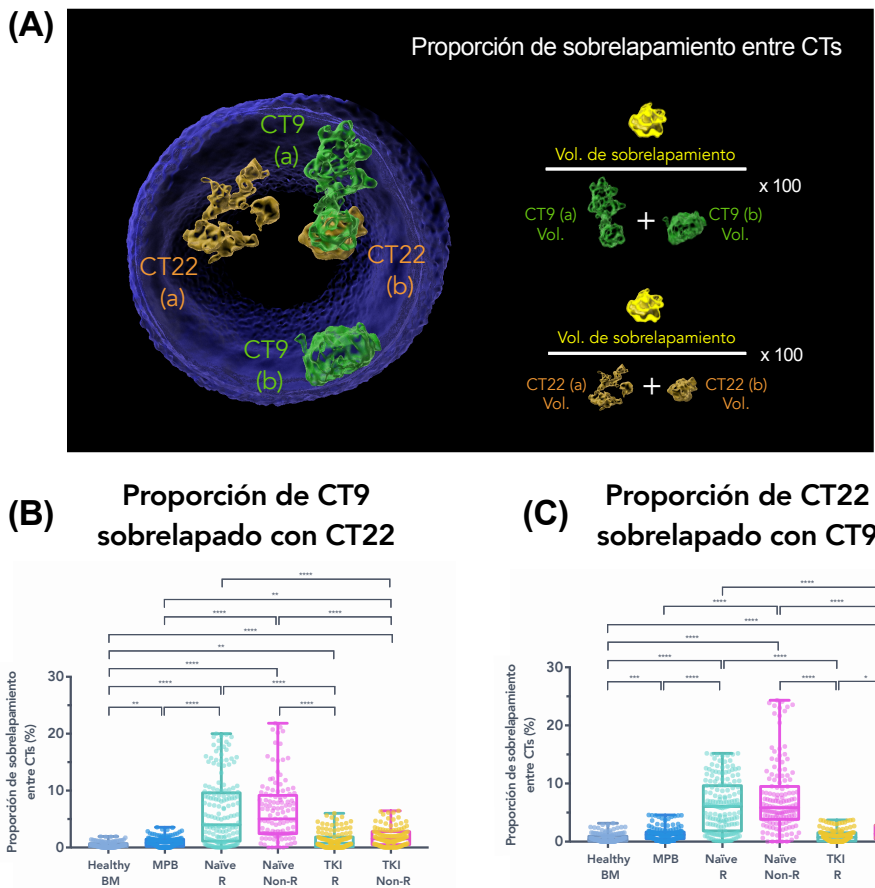
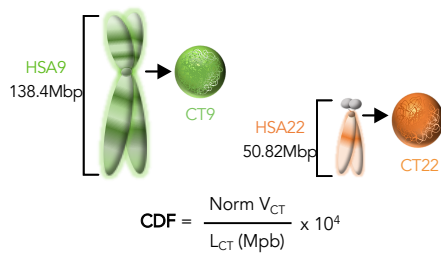


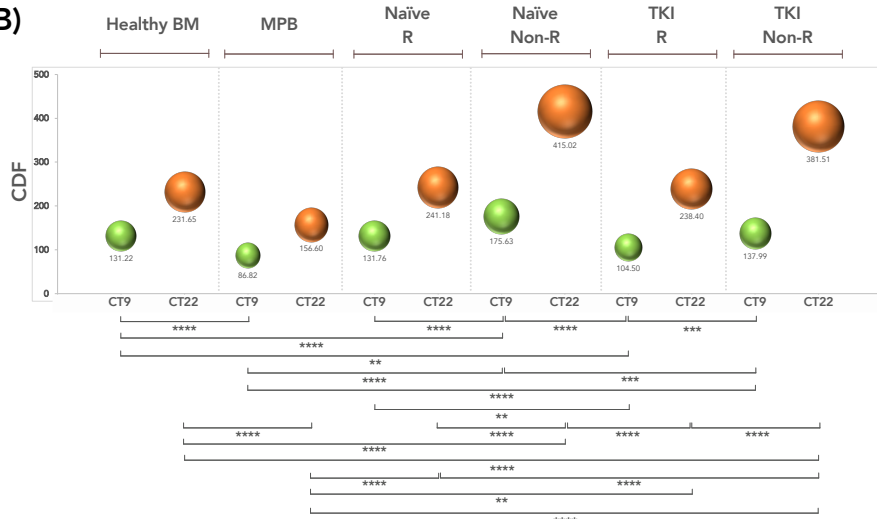
Figura 17. Análisis de proporción de solapamiento por CT. (A) La proporción de CT que se superpone se definió como el porcentaje de un volumen de CT ocupado por otro CT heterólogo. Para el cálculo de esta proporción, el volumen de solapamiento se dividió entre el volumen total de cada CT (CT9 y CT22 por separado) y se multiplicó por 100. (B) La proporción de CT9 que se superpone con CT22 expresada como porcentaje (%). (C) Proporción de CT22 que se superpone con CT9 expresada como porcentaje (%).

Utilizando el factor de descompactación de cromatina (CDF), definido como el volumen normalizado de 1 mega par de bases (Mbp) de la secuencia de DNA (144) (Figura 18A), encontramos que CT22 estaba más descompactado que CT9 en todos los grupos, y el CDF máximo tanto para CT9 como CT22 se observaron en las poblaciones que no respondieron al tratamiento (Naïve Non-R y TKI Non-R) (Figura 18B). El análisis de CDF del volumen nuclear total mostró que MPB fue el grupo con la menor descompactación, mientras que las células de la población Naïve Non-R se observan más descompactadas que las células de la población Naïve R (Figura 18C). Estos resultados sugieren que la disociación de los CTs observada en los grupos de pacientes no respondedores se asocia con un aumento en el volumen de los CTs y un alto grado de descompactación de la cromatina, particularmente en el CT22.

(A) Factor de descompactación de la cromatina (CDF)



(B)



(C)

CDF del Volumen Nuclear

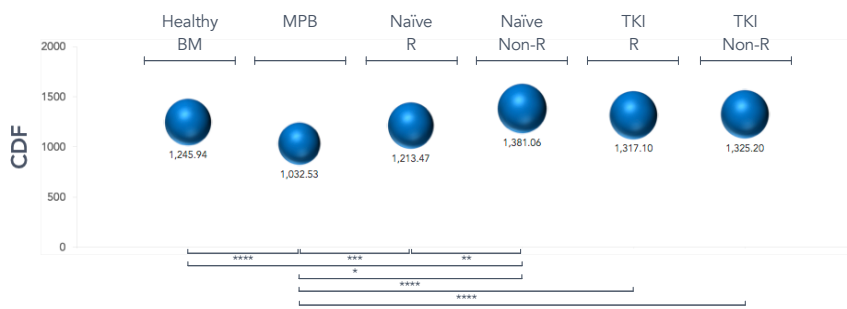
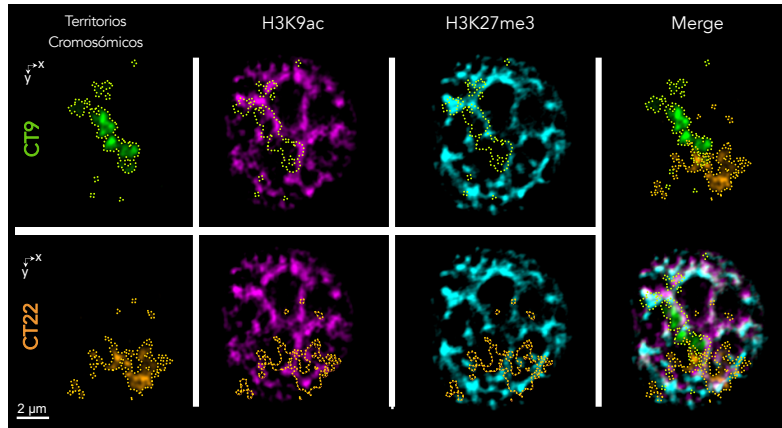


Figura 18. El factor de descompactación de la cromatina (CDF) muestra diferencias significativas en los niveles de descompactación en las poblaciones de pacientes que no responden al tratamiento particularmente en el CT22 (A) Representación esquemática de la obtención del CDF. La medición del CDF considera el volumen CT normalizado (Norm V_{CT}) y la longitud del cromosoma (L_{CT}). Con fines representativos, los cromosomas humanos 9 (HSA9) y 22 (HSA22) se muestran en sus conformaciones mitótica y en sus conformaciones representativas de interfase. (B) Comparación de la media del CDF entre grupos. Las comparaciones se realizaron solo entre CTs homólogos pero no entre CT heterólogos. El CDF para CT9 y CT22 fueron considerablemente mayores en los grupos de pacientes que no respondieron al tratamiento en comparación con los otros grupos. (C) Gráfico de burbujas que muestra el CDF del promedio de volumen nuclear para cada grupo.

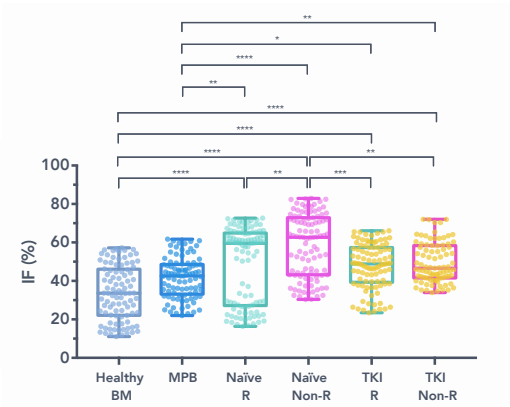
Las MPTs de histonas se distribuyen diferencialmente en los CTs y en el núcleo de las poblaciones Naïve-R y Naïve Non-R

Las MPTs de histonas son preponderantes en los diferentes estados de compactación y activación de la cromatina, que en última instancia determinan la formación de los TADs y los compartimentos de CTs. Dadas las diferencias en la descompactación (CDF) de los CTs observadas entre los grupos de LMC, decidimos evaluar si las MPTs de histonas están asociadas con estos cambios. Por lo tanto, mediante el uso de inmuno-FISH 3D, cuantificamos la presencia de H3K9ac y H3K27me3, que se consideran marcas de cromatina abierta y cerrada respectivamente, en CT9, CT22 (Figura 19A) y en todo el núcleo (Figura 20A).

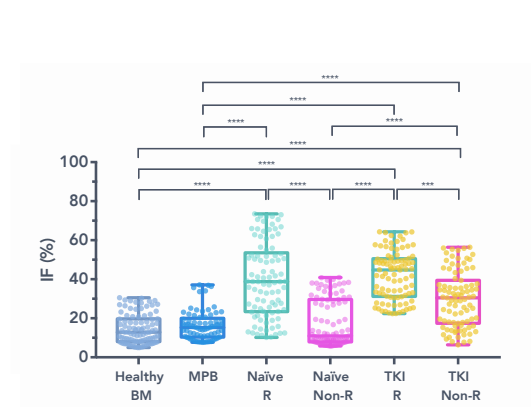
(A)



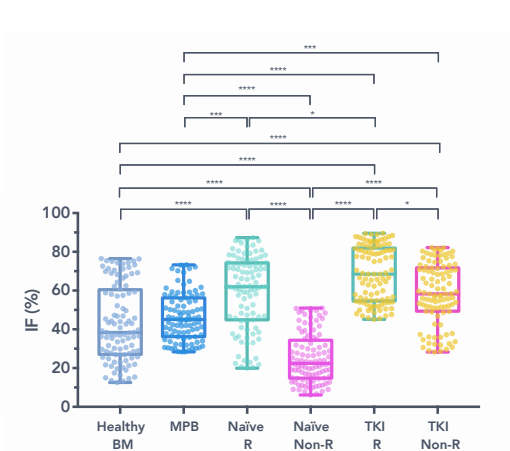
(B) IF relativa de H3K9ac en CT22



(C) IF relativa de H3K27me3 en CT22



(D) IF relativa de H3K9ac en el CT9



(E) IF relativa de H3K27me3 en CT9

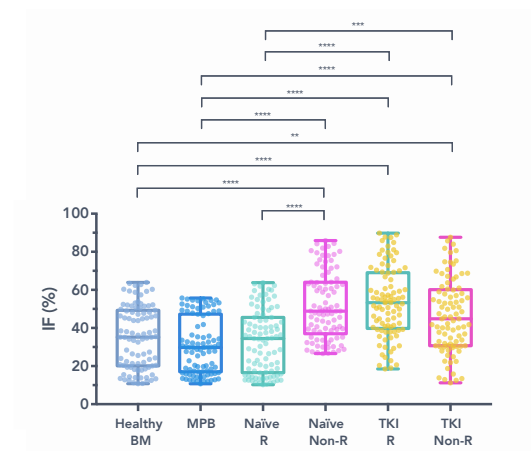


Figura 19. Análisis de la presencia de MPTs de histonas en los TCs 9 y 22. (A) Imágenes 3D-SIM representativas de inmuno-fluorescencia y 3D-FISH simultáneos en células CD34+ de un paciente con LMC Naïve que no respondió al tratamiento subsecuente. Las imágenes muestran una tinción de cromosoma completo para CT9 (verde) y CT22 (naranja) combinada con inmuno-fluorescencia para las marcas de histonas H3K9ac (magenta) y H3K27me3 (cian). Los bordes de cada TC se representan con contornos de puntos. Barra de escala: 2 µm. (B) Comparación de la intensidad de fluorescencia relativa (FI) de H3K9ac en CT22 entre grupos. Los gráficos de barras muestran la relación de señal promedio H3K9ac / CT22. (Pie de figura continua en la siguiente página).

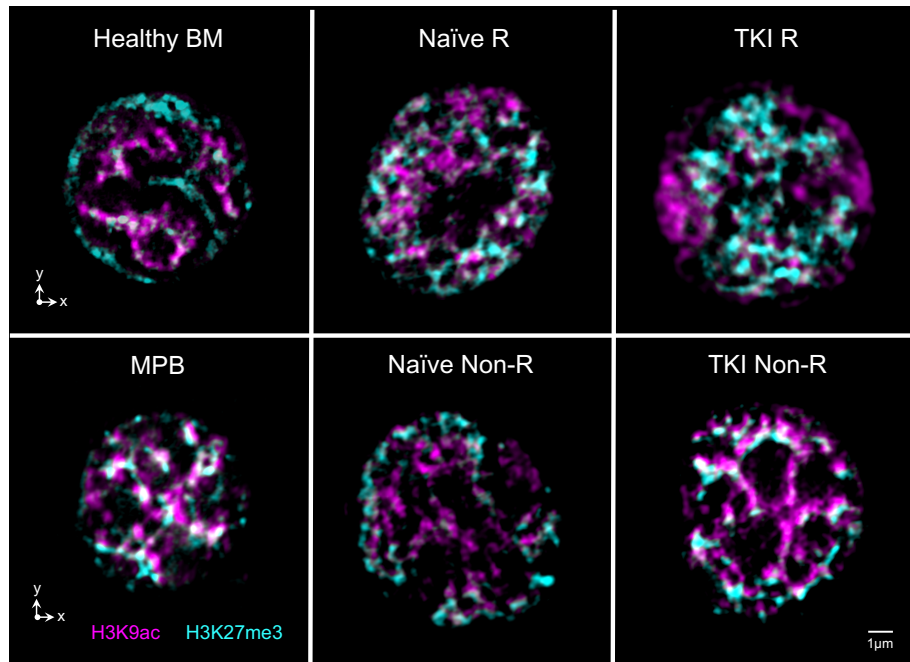
(C) Comparación de la intensidad de fluorescencia relativa (FI) de H3K27me3 en CT22 entre grupos. Los gráficos de barras muestran la relación de señal promedio H3K27me3 / CT22. (D) Comparación de la intensidad de fluorescencia relativa (FI) de H3K9ac en CT9 entre grupos. Los gráficos de barras muestran la relación de señal promedio H3K9ac / CT9. (E) Comparación de la intensidad de fluorescencia relativa (FI) de H3K27me3 en CT9 entre grupos. Los gráficos de barras muestran la relación de señal promedio H3K27me3 / CT9.

Para el grupo Naïve Non-R, observamos que el CT22 mostró niveles altos de H3K9ac (**Figura 19B**) y niveles reducidos de H3K27me3 (**Figura 19C**). Curiosamente, el análisis de ocupación de histonas de CT9 mostró el resultado opuesto: el porcentaje de ocupación de H3K9ac en CT9 fue significativamente bajo (**Figura 19D**), y H3K27me3 se incrementó en el grupo Naïve Non-R (**Figura 19E**). Asimismo, analizamos más a fondo la presencia de estas marcas de histonas dentro de todo el núcleo de las células CD34+, encontrando los niveles más altos de H3K9ac y H3K27me3 en el núcleo de los grupos TKI Non-R y Naïve R respectivamente (**Figura 20A-C**).

En conjunto, nos resulta interesante destacar el caso del CT22 de la población Naïve Non-R, en el que el aumento significativo del enriquecimiento de la marca de cromatina abierta, H3K9ac, coincide con su aumento significativo de volumen y CDF en comparación con los otros grupos de estudio. Esta observación sugiere una asociación directa, pero dada la complejidad de la dinámica de la cromatina, son necesarios análisis complementarios para determinar esta asociación sugerente.

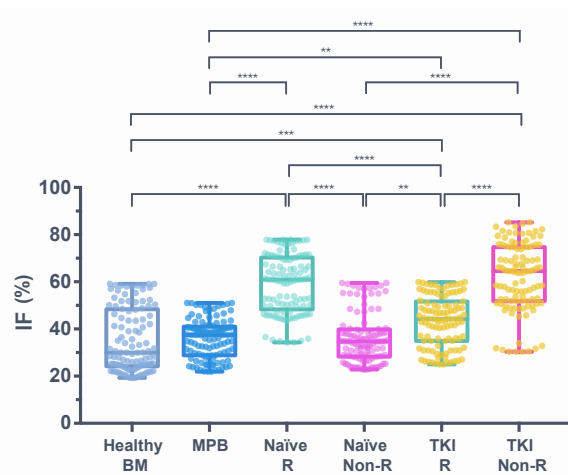
Finalmente, nuestros resultados exponen que además de las evidentes diferencias entre los grupos de estudio observadas al comparar el enriquecimiento de las MPT de histonas entre CTs y núcleos, nuestros datos también muestran diferencias intrínsecas al comparar estos elementos dentro de una misma población.

(A)



(B)

IF relativa de H3K9ac
en el núcleo



(C)

IF relativa de H3K27me3
en el núcleo

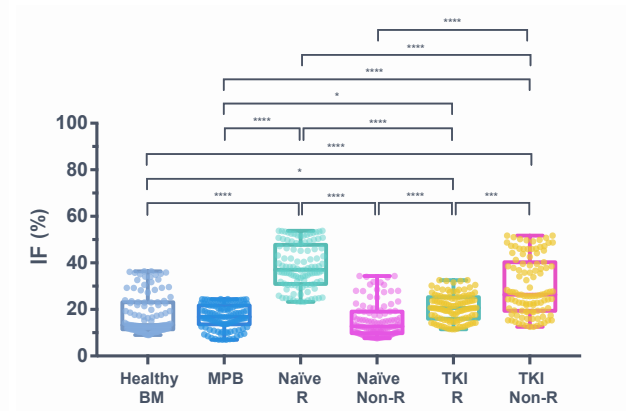


Figura 20. La ocupación de marcas de histonas nucleares muestra diferencias notables entre los pacientes LMC Naïve con respuesta favorable comparados con los pacientes LMC Naïve sin respuesta al tratamiento. (A) Imágenes 3D-SIM representativas de células CD34+ que muestran marcas de histonas H3K9ac (magenta) y H3K27me3 (cian) en un solo plano. Barra de escala: 1 μm. (B) Intensidad de fluorescencia relativa (FI) de H3K9ac en el núcleo completo de células CD34+, se muestra la comparación entre grupos. Los gráficos de barras muestran la relación de señal H3K9ac/núcleo promedio. (C) Intensidad de fluorescencia relativa (FI) de H3K27me3 en el núcleo completo de células CD34+, se muestra la comparación entre grupos. Los gráficos de barras muestran la relación de señal H3K27me3/núcleo promedio.

Las distancias mínimas entre CTs heterólogos correlacionan con el grado de solapamiento

Para investigar la correlación entre la distancia de *BCR* y *ABL1* o los CT heterólogos y sus regiones entremezcladas, medimos las distancias mínimas entre los genes *BCR* y *ABL1*, considerando las distancias entre los genes que forman la fusión *BCR-ABL* (fusión BA) en los grupos con la presencia de $t(9;22)$ (Figura 21A), así como entre CT9 y CT22 (Figura 21B). Los CT con un patrón disociado no se consideraron en este análisis ya que su variabilidad introduciría un sesgo en el análisis. Los grupos sanos mostraron las distancias mínimas más largas en ambas mediciones, entre genes (Figura 21C) y entre CTs heterólogos (Figura 21D). Además, la distancia mínima más corta en ambos casos se observó en los grupos Naïve, donde estaba presente la translocación $t(9;22)$. Estas observaciones respaldan la noción de que cuanto más corta es la distancia entre los CTs, mayor es su región de entremezclado y viceversa. Además, observamos una reducción significativa en las distancias mínimas entre los genes *BCR* y *ABL1* en el grupo TKI-R pero no entre los CTs en comparación con los controles sanos. Estos resultados sugieren una mayor probabilidad de ocurrencia de translocación en el grupo TKI-R en comparación con los grupos sanos, ya que los CTs heterólogos y los genes *BCR* y *ABL1* permanecen en una proximidad significativa a pesar de que la translocación $t(9;22)$ ya no está presente.

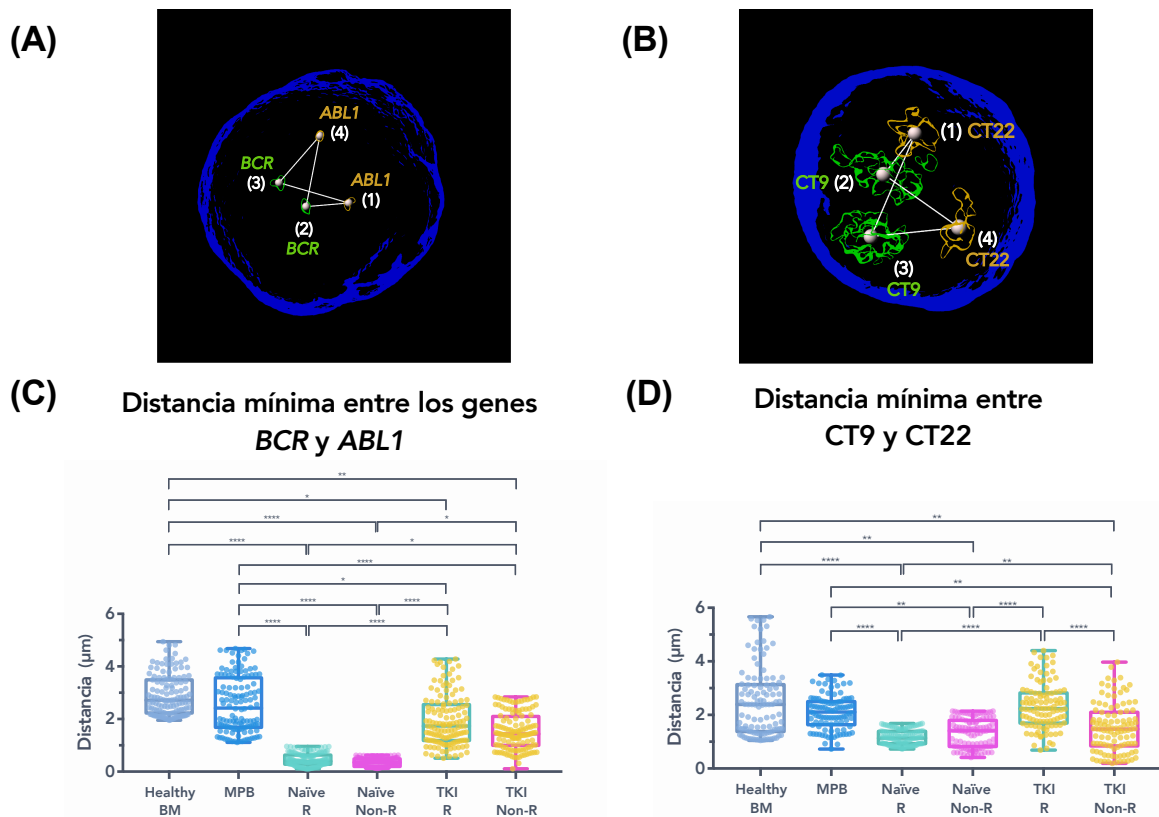


Figura 21. Las distancias mínimas entre los genes y CTs se presentan en las poblaciones de pacientes Naïve. (Pie de figura continua en la siguiente página).

Figura 21. (A) Distancias mínimas entre los genes *BCR* y *ABL1*. Reconstrucción 3D representativa que muestra cómo se obtuvieron las distancias entre el centro de las señales de la sonda génica. La distancia mínima se definió como la distancia más corta entre las señales de la sonda *BCR* y *ABL1* (marcadas numéricamente en la imagen), en este ejemplo, las señales *ABL1* (1) y *BCR* (2) son las más cercanas. (B) Distancias mínimas entre CT9 y CT22. Reconstrucción 3D representativa que muestra cómo se obtuvieron las distancias entre el centro de los TCs. La distancia mínima se definió como la distancia más corta entre los CTs heterólogos 9 y 22. En la imagen, cada uno de los CTs está numerado y CT22 (1) y CT9 (2) se ejemplifican como los CTs heterólogos más cercanos. (C) Comparación de las distancias mínimas entre los genes *BCR* y *ABL1* entre grupos. (D) Comparación de las distancias mínimas entre CT9 y CT22 entre grupos.

La posición nuclear de CT9 y CT22 no cambia cuando está presente la translocación t(9;22)

Se analizaron las posiciones radiales relativas de *ABL1*, *BCR* y el gen de fusión BA (**Figura 22A**), así como la posición radial relativa de cada CT (no se consideraron los CTs disociados) (**Figura 22B**), para determinar si los cambios en el volumen de los CTs y la compartimentación afectaría el posicionamiento nuclear de los genes *BCR* y *ABL1*, así como sus CTs.

Cuando comparamos las posiciones radiales relativas de *BCR* y *ABL1* por grupo (**Figura 22C**), observamos en el grupo MPB que el gen *ABL1* se posicionó significativamente más hacia la periferia nuclear que *BCR*. Además, observamos que el gen *ABL1* de los grupos de MO sanos y TKI-R estaba posicionado hacia el centro nuclear en comparación con el de los grupos MPB, naïve-R y naïve non-R. Sin embargo, la posición de los alelos *BCR* mostró diferencias solo entre los grupos MPB y naïve-R y se ubicó más hacia la periferia en el último grupo.

La posición de la fusión BA se comparó entre los grupos con la translocación t(9;22). Curiosamente, la posición de la fusión difería significativamente entre todos los grupos analizados. La fusión BA se ubicó más periféricamente en el grupo TKI non-R (**Figura 22C**), mientras que tendió a ubicarse más en el centro nuclear en el grupo no R ingenuo. Dado que en varios estudios se ha identificado una correlación entre los niveles de expresión génica y la posición radial relativa nuclear, la posición distintiva de la fusión BA en el grupo TKI no R podría indicar tal asociación.

La comparación de la posición radial relativa de los CTs mostró que CT9 tendía a ubicarse más hacia la periferia nuclear que CT22 (**Figura 22D**). Curiosamente, para ambos grupos de LMC no respondedores, los CT parecen acercarse. Además, la posición de CT9 en el grupo Naïve non-R se ubicó significativamente más hacia el centro nuclear que en el grupo Naïve-R. No observamos diferencias entre grupos en cuanto a la posición radial relativa de CT22. Cabe destacar que la posición de los CTs en los grupos con t(9;22) no difirió comparado con las posiciones de CT en el grupo sano de MO.

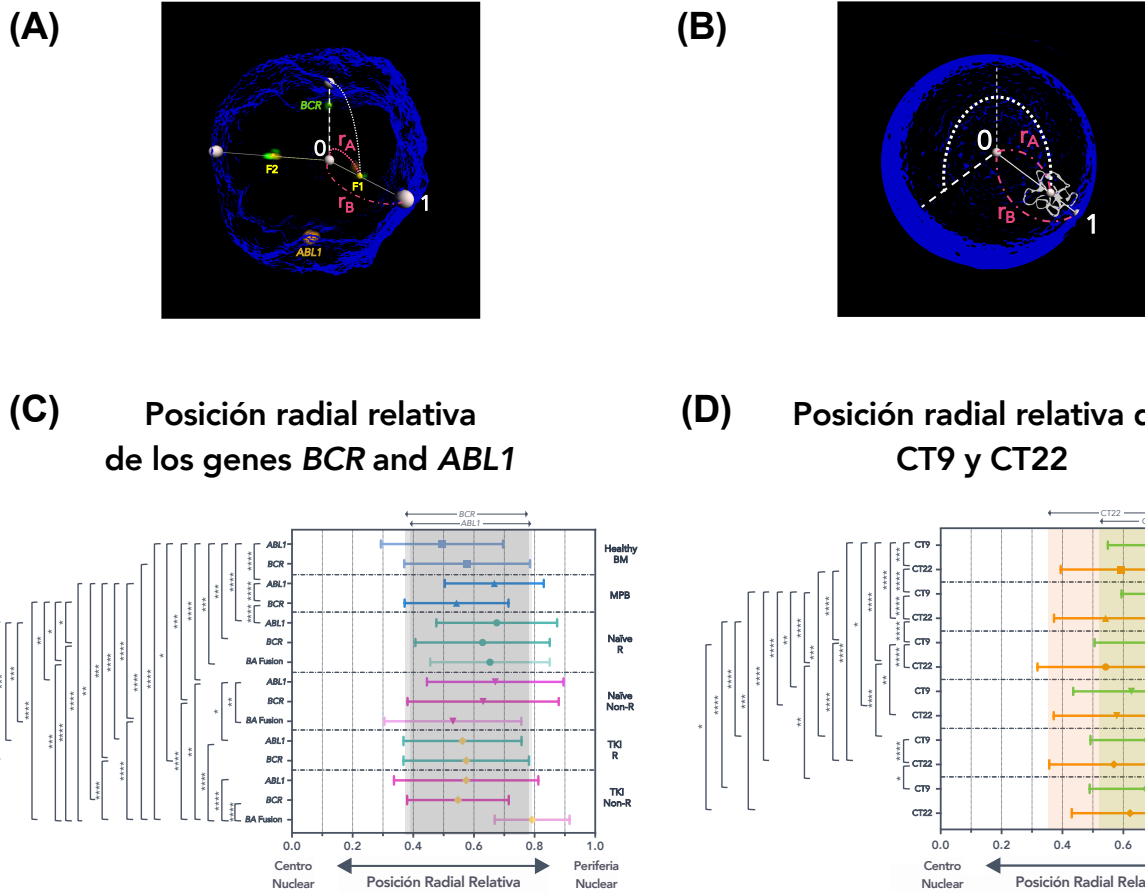
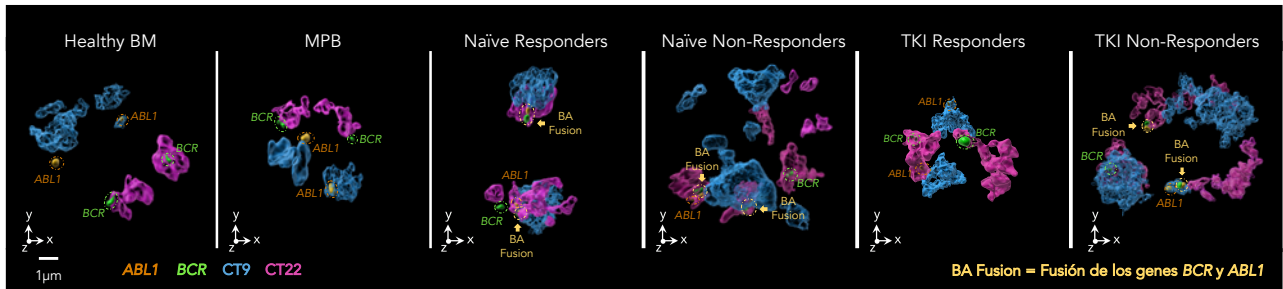


Figura 22. La presencia de la translocación $t(9;22)$ no cambia las posiciones radiales relativas de los TCs en el núcleo. (A) Reconstrucción 3D representativa de una célula con $t(9;22)$ que muestra una señal para el gen *BCR* (verde), una señal para el gen *ABL1* (naranja) y dos señales de fusión (*F1* y *F2*). Se calculó la posición radial relativa (r) de cada alelo. El centro del núcleo se definió como 0, y la distancia entre 0 y cada señal alélica se definió como r_A . La relación nuclear (r_B) se definió como la distancia entre 0 y la periferia nuclear (1) que pasa por el centro de la señal. La posición radial relativa (r) con respecto al centro nuclear se calculó como una fracción de r_B ($r=r_A/r_B$). **(B)** Reconstrucción 3D representativa que muestra cómo se calculó la posición radial relativa (r) de los TCs. La posición radial relativa se midió teniendo en cuenta el centro de cada compartimiento de TC. El centro del núcleo se definió como 0, y la distancia entre 0 y cada señal del centro de CT se definió como r_A . La relación nuclear (r_B) se definió como la distancia entre 0 y la periferia nuclear (1) que pasa por el centro de la señal. La posición radial relativa (r) con respecto al centro nuclear se calculó como una fracción de r_B ($r=r_A/r_B$). **(C)** Posiciones radiales relativas (r) de *BCR* y *ABL1*. Las barras representan el rango de posición de los genes de fusión *ABL1*, *BCR* y *BA* dentro del núcleo. Una tendencia a 0 indica proximidad al centro nuclear, mientras que una tendencia a 1 indica proximidad a la periferia. Las barras sombreadas dentro del gráfico cubren la dispersión (DE, desviación estándar) considerando todas las poblaciones para las posiciones *ABL1* (gris claro) y *BCR* (gris oscuro). **(D)** Posiciones radiales relativas (r) de *CT9* y *CT22*. Las barras representan el rango de posición de *CT9* y *CT22* dentro del núcleo. Una tendencia a 0 indica proximidad al centro nuclear, mientras que una tendencia a 1 indica proximidad a la periferia. Las barras sombreadas dentro del gráfico cubren la dispersión (DE) considerando todas las poblaciones para *CT9* (verde) y *CT22* (naranja).

La ubicación de los genes con respecto a sus CT es diferente entre los grupos de LMC

Continuamos analizando las características topológicas de los genes *BCR* y *ABL1* en LMC mediante el análisis de su ubicación con respecto a sus CTs utilizando FISH cuádruplex, seguido de una reconstrucción 3D-SIM que se analizó en los ejes x,y (**Figura 23A**) y los ejes x,z (**Figura 23B**). Con este análisis descubrimos varios patrones de ubicación de alelos, que se clasificaron según la ubicación de *ABL1*, *BCR* o el gen de fusión BA (dentro o fuera de su respectivo CT) (ver Metodología para detalles del análisis). Así mismo, es importante resaltar que las células con la fusión BA todavía presentan un alelo no fusionado para los genes *BCR* y *ABL1* (**Figura 24A**).

(A)



(B)

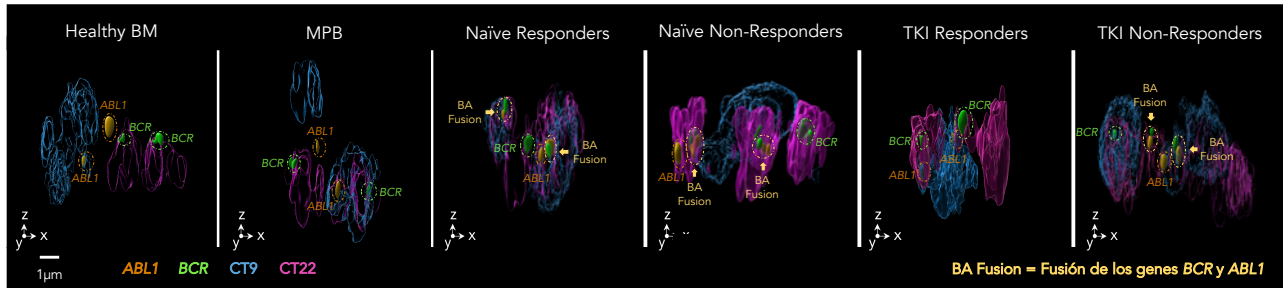


Figura 23. (A) Reconstrucción tridimensional de los genes *ABL1* (naranja) y *BCR* (verde) y sus respectivos TCs, TC9 (cian) y TC22 (magenta). Cuatro sondas se hibridaron simultáneamente para determinar la distribución/posición de los genes con referencia a su respectivo TC (interior o exterior). Se muestra una reconstrucción 3D representativa por grupo. **(B)** Reconstrucción tridimensional que muestra la proyección z de cada célula que aparece en (A). *ABL1* (naranja) y *BCR* (verde) y sus respectivas sondas por cada TC, TC9 (cian) y TC22 (magenta), se hibridaron en la misma prueba.

En este análisis (**Figura 24B**), el patrón más común observado en el grupo de MO sano fue un alelo dentro y otro alelo fuera de su CT (patrón de ubicación A). En contraste, la MPB mostró 9 patrones de ubicación diferentes, probablemente debido a cambios topológicos inducidos por el esquema de movilización. Curiosamente, la mayoría de los patrones combinatorios observados en los pacientes con LMC involucraron al alelo *ABL1* fuera de CT9. En particular,

en el grupo TKI-R que perdió la translocación t(9;22), solo se observaron 2 patrones de ubicación diferentes (patrones de ubicación D y F), y ninguno de ellos fue el patrón de ubicación observado con mayor frecuencia en la MO sana o grupo MPB. Finalmente, el grupo TKI non-R mostró la variedad más diversa y heterogénea de patrones de localización.

Sin embargo, cabe señalar que la señal de fusión BA se observó tanto en CT9 como en CT22, sin diferencias significativas en la frecuencia observada para cada CT ($p > 0.05$). En conjunto, estas observaciones demuestran una variabilidad sustancial en la ubicación de los genes entre los grupos de LMC y un comportamiento que se desvía de las condiciones consideradas como sanas o normales, lo que puede estar relacionado con las diferencias en la actividad transcripcional de estos genes en cada condición analizada (Figura 24B).

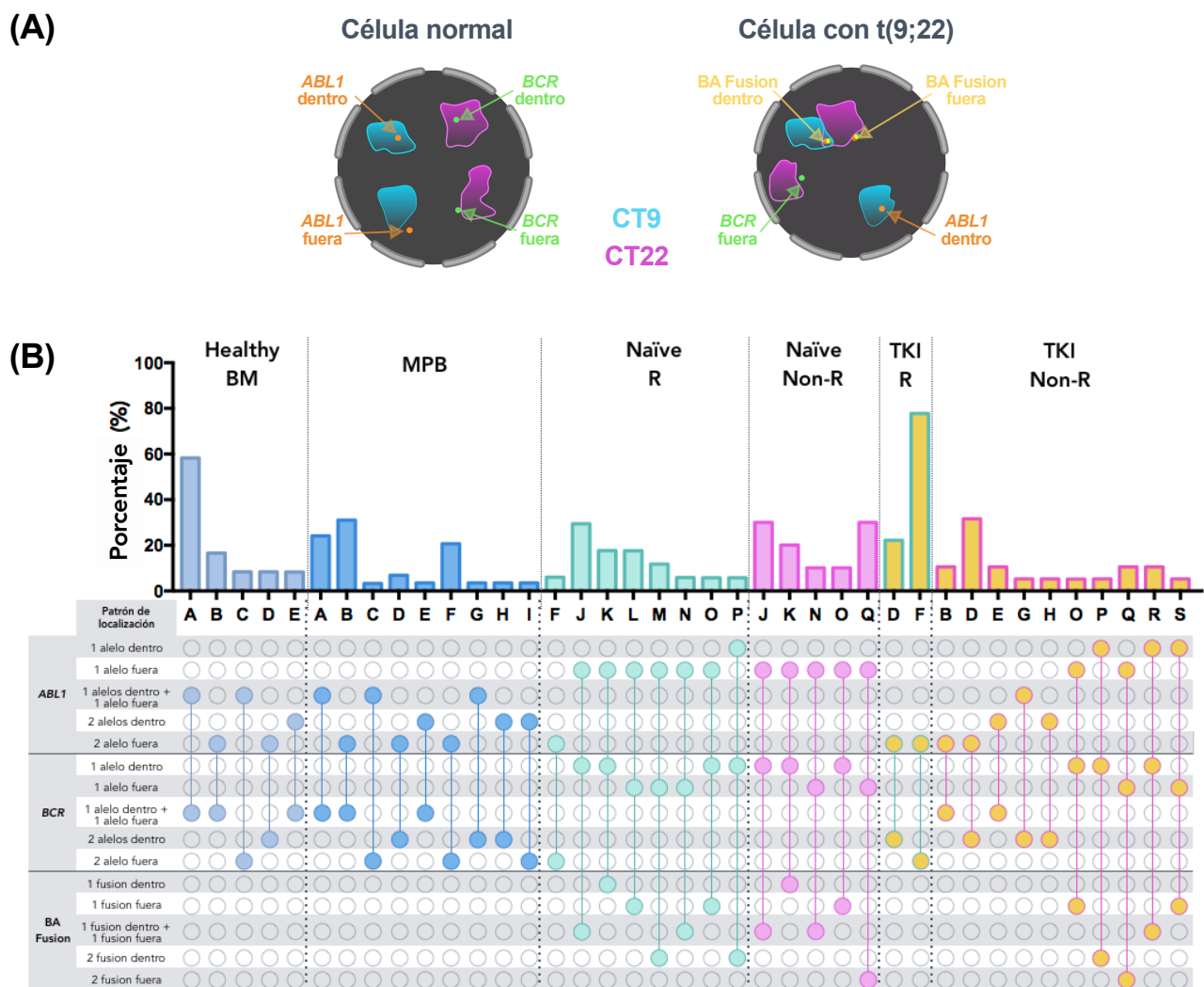


Figura 24. Los genes se reubican con referencia a sus TCs en presencia de t(9;22). (A) Esquemas que muestran las ubicaciones de los alelos BCR y ABL1 (interior/exterior) con referencia a sus respectivos TCs en una célula normal y en una célula con un par de genes de fusión BA. (B) Gráfica que muestra los diferentes patrones combinatorios de ubicación de los alelos BCR y ABL1 y el gen de fusión BA con respecto a su respectivo TC9 y TC22.

4.1 Resumen gráfico de los resultados del presente estudio



5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La organización del genoma tiene un papel fundamental en la regulación de las funciones celulares. Los cromosomas organizan una red de interacciones genéticas que involucra a todo el genoma, creando así un sistema de herencia con organización nuclear tridimensional. Por lo tanto, se espera que las alteraciones estructurales de los cromosomas, como las translocaciones, que reorganizan los dominios topológicos genómicos, tengan importantes consecuencias a diferentes niveles (145).

En el presente trabajo, utilizamos microscopía de súper-resolución para estudiar los efectos de la translocación $t(9;22)$ en la arquitectura del genoma a nivel tridimensional de las células de LMC. Usando 3D-SIM, estudiamos las células CD34+ de médula ósea de pacientes con LMC y descubrimos que la presencia de la $t(9;22)$ tiene un gran impacto en la organización de la cromatina de las células de LMC a distintos niveles, incluido el reposicionamiento de los alelos, la descompactación de la cromatina y el posicionamiento de CTs. Descubrimos una reorganización topológica a gran escala del genoma, reflejada como una disociación importante de CT9 y CT22, principalmente en pacientes con LMC que no responden (en comparación con donantes sanos y pacientes con LMC que respondieron favorablemente a imatinib). Estas observaciones sugieren una asociación directa entre las propiedades topológicas de CT9 y CT22 y la respuesta a la terapia de los pacientes con LMC. Es relevante recalcar la presencia de esta disociación de CT9 y CT22 en el momento del diagnóstico en pacientes con LMC que no responden (grupo Naïve non-R), lo que sugiere que las características estructurales nucleares de estos pacientes podrían ser un factor importante en la no respuesta al tratamiento.

CT9 y CT22 se observan altamente disociados en células CD34+ de pacientes con LMC que no responden al tratamiento con TKI

Las alteraciones estructurales genómicas, incluidas las translocaciones, son comunes en el cáncer, lo que lleva a la desregulación de la expresión génica. Interesantemente, las células cancerosas han mostrado configuraciones espaciales del genoma diferenciales a los de las células normales. La capacidad de detectar dichas interacciones de secuencias alteradas y modelar estructuras tridimensionales de cromatina ha sido posible gracias a técnicas como la captura conformacional de cromosomas (3C) y sus derivados globales.

Estudios previos en células cancerosas utilizando precisamente técnicas de 3C han demostrado que las alteraciones estructurales cromosómicas pueden dar lugar a alteraciones en la compartimentalización espacial del genoma y en los contactos entre asas de cromatina al ser comparados con células normales del mismo linaje (146). Así mismo, se han observado fusiones de TADs, formando así neo-TADs que reconfiguran las interacciones reguladoras

entre elementos genómicos (147). Por otro lado, otra investigación ha relacionado la formación dinámica de compartimentos de cromatina con la resistencia al tamoxifeno en el cáncer de mama (148). Esta evidencia revela una asociación entre la reorganización del genoma y la respuesta a la terapia en pacientes con cáncer. Nuestros resultados evidencian una disociación estructural de los CTs 9 y 22 observadas en los grupos de pacientes LMC que no respondieron al tratamiento, lo cuál amplía y sustenta los hallazgos de estudios previos. Además, es importante destacar el hecho de que la reorganización de la cromatina a gran escala no solo es evidente a nivel molecular, sino que también puede detectarse mediante microscopía. La combinación de ambas técnicas nos proporcionaría tanto la información de contacto entre secuencias de *loci* específica como la posición espacial de *loci* individuales, solo por mencionar un ejemplo, pero en definitiva ambos abordajes ampliaría nuestras perspectivas en el campo del estudio de la organización tridimensional del genoma.

En consecuencia, el estudio de la topología nuclear y la conformación de la cromatina se está volviendo cada vez más crucial para comprender los procesos cancerígenos y la resistencia a los tratamientos contra el cáncer. Este estudio tuvo como objetivo explorar los posibles cambios topológicos a gran escala en LMC centrándose en los CTs directamente involucrados en la enfermedad, CT9 y CT22.

La disociación de los CTs se asocia con un aumento en los volúmenes, extensas regiones de solapamiento y un aumento en la descompactación de la cromatina.

De acuerdo con la disociación estructural observada en los CTs 9 y 22, encontramos un aumento significativo en el volumen, particularmente del CT22, en los grupos que no respondieron. Así mismo y dado que la condensación de la cromatina se caracteriza por una reducción del volumen debido a una organización espacial en estructuras densamente empaquetadas de orden superior (149), evaluamos cualitativamente los volúmenes de los CTs utilizando un factor de condensación (CDF), que considera tanto el volumen del CT como la longitud de la molécula de DNA correspondiente a cada cromosoma (144). El aumento significativo de la descondensación de los CTs, particularmente en CT22, más allá de estar relacionado con los patrones de disrupción observados, podría estar asociado con la reorganización del dominio y, por lo tanto, dar como resultado una desregulación de las interacciones inter- e intra-cromosómicas.

Las diferencias en las interacciones intercromosómicas entre CT9 y CT22 se evidenciaron por el aumento del volumen de solapamiento en los grupos que no respondieron. Además, de acuerdo con estudios previos (25), encontramos que los CTs menos condensados exhiben una mayor proporción de solapamiento. Las implicaciones fisiológicas de estas regiones han sido ampliamente estudiadas; y el grado de solapamiento puede usarse como una medida cualitativa de las posiciones cromosómicas relativas, y además, se ha sugerido que las regiones de solapamiento entre cromosomas contienen potencialmente una mayor

densidad de secuencias reguladoras y podrían mediar en las interacciones entre los cromosomas (150). Curiosamente, los volúmenes de solapamiento se correlacionan mejor con la actividad transcripcional que la distancia entre los centroides de los CTs (70), en cuyo caso nuestros resultados sugieren una relación proporcional entre una reducción en la distancia entre CT9 y CT22 y un mayor volumen de solapamiento.

Cabe destacar que las regiones de solapamiento entre CTs heterólogos se han considerado un factor promotor de translocaciones (25), lo que concuerda con la asociación entre la proximidad de secuencias y su mayor probabilidad de translocación (78). Curiosamente, la proporción de células CD34+ con solapamiento entre los CTs heterólogos aumenta significativamente en el grupo TKI-R en comparación con los controles sanos, y también cabe resaltar, el nivel de solapamiento en algunas de estas células es tan alto como el solapamiento observado en las células con la presencia de la translocación t(9;22). Asimismo, se observa una distancia mínima más estrecha entre los genes *BCR* y *ABL1* en el grupo TKI-R en comparación con los controles sanos. Aunque estas observaciones resultan ser provocativas, se necesitan más estudios para evaluar la contribución de estas características topológicas en la génesis y reparación de la t(9;22) cuando los pacientes con LMC TKI-R interrumpen el tratamiento.

Las MPTs de histonas se distribuyen diferencialmente en los CTs y en el núcleo de las poblaciones Naïve-R y Naïve Non-R

El impacto recíproco de la estructura de la cromatina y la actividad génica está íntimamente vinculada a elementos epigenéticos. El término epigenética se refiere a los cambios heredables en el fenotipo que no conllevan a cambios en la secuencia del DNA (151). Elementos epigenéticos como las modificaciones post-traduccionales (MPTs) de histonas son reguladores de la cromatina y son responsables de la compartimentalización del genoma en distintos dominios. Marcas epigenéticas como la metilación y acetilación de histonas han sido bien caracterizadas. Ejemplo de ello es la trimetilación de H3K9 y de H3K27 que resulta en una configuración de cromatina cerrada, característica de heterocromatina. En contra parte, marcas como la acetilación de H3K9, y trimetilación de H3K4 y H3K36 son características de cromatina abierta o eucromatina (151).

Teniendo en cuenta que las MPTs de histonas están inherentemente involucradas en la regulación y la dinámica de la condensación de la cromatina y preservan la organización cromosómica específica de cada tipo celular (152), evaluamos dos marcas de histonas representativas de los estados de conformación de la cromatina abierta y cerrada, H3K9ac y H3K27me3, respectivamente. Tomados en conjunto, nuestros resultados revelan una presencia diferencial de MPTs de histonas no solo entre los grupos de LMC respondedores y no respondedores, sino también entre CTs individuales en una sola población. Estas observaciones respaldan el argumento de que las diferencias en el enriquecimiento de estas

modificaciones en todo el dominio proporcionan una firma global para cada dominio y CT dentro de la cual operan niveles más localizados de control funcional (153). Sin embargo, la estructura de la cromatina es el resultado de una interacción intrincada y dinámica entre variantes de histonas, MPTs, localización, chaperonas de histonas y remodeladores de nucleosomas dependientes de ATP; por lo tanto, se necesitan más estudios para revelar el panorama epigenético completo que regula tanto las características topológicas diferenciales entre los CTs como los mecanismos desregulados detrás de la disociación de los CTs.

La posición nuclear de CT9 y CT22 no cambia cuando está presente la translocación t(9;22)

Por otro lado, en el presente estudio también analizamos los posibles cambios en la posición radial nuclear de los CTs entre los grupos. Estudios previos han indicado que el posicionamiento de los CTs se correlaciona con la densidad de genes (40,41) y el tamaño de los cromosomas (27,37). Sin embargo, aberraciones estructurales como las translocaciones pueden afectar el posicionamiento espacial de los CTs y *loci* específicos, lo que puede desempeñar un papel importante en la carcinogénesis dada la alteración del acoplamiento entre la disposición espacial y la expresión (154). Sin embargo, no todas las translocaciones, incluso cuando están asociadas con la carcinogénesis, dan como resultado cambios en el posicionamiento espacial o la expresión génica (155).

En el presente estudio observamos que en las células hematopoyéticas sanas, CT9 se localiza hacia la periferia nuclear en comparación con CT22 y encontramos que sus posiciones se conservaron en todos los grupos, a pesar de la presencia de la t(9;22), exceptuando los casos en los que se encontraron los CTs disociados. El mantenimiento de la posición de los CTs no disociados probablemente esté relacionado con el alto contenido de heterocromatina pericentromérica en CT9 y las regiones organizadoras nucleolares (NOR) presentes en los cromosomas acrocéntricos como es el caso del CT22, lo que podría resultar en la estabilidad de la posición radial dentro del núcleo (156,157). No obstante, las posiciones radiales relativas de los genes *BCR* y *ABL1* no fueron estables, y la posición de la fusión BA cambió significativamente (incluso entre las poblaciones portadoras de la t(9;22)), esta variabilidad podría responder a requerimientos transcripcionales específicos de la célula. Sin embargo, mayores estudios serán necesarios para corroborar esta posible asociación. Además, las posiciones de los CTs con un patrón disociado en pacientes con LMC non-R cambiaron evidentemente los parámetros de posición de la fusión BA, particularmente en el grupo TKI non-R.

Los cambios en la posición nuclear de un gen tienen el potencial de cambiar la expresión génica, ya sea alterando las asociaciones funcionales con un compartimento nuclear específico o alterando el conjunto de otras secuencias con las que un gen puede interactuar (17,49). Por ejemplo, Harewood y colaboradores (2010) estudiaron el efecto de una translocación recíproca entre los cromosomas 11 y 22 (t(11;22)(q23;q11)) que se asocia con un mayor riesgo

de cáncer de mama. En un análisis de transcriptoma, las líneas celulares de individuos con la translocación presentaron un mayor número de genes expresados diferencialmente en comparación con la variación esperada en las líneas celulares de individuos sin la translocación (154).

El reposicionamiento de genes en células cancerosas, en comparación con tejido normal de la misma estirpe, también se ha relacionado con reordenamientos tridimensionales específicos de la enfermedad. Meaburn y colaboradores (2009) identificaron alteraciones en el posicionamiento de varios genes en células derivadas de cáncer de mama invasivo en comparación con células de tejido normal. El reposicionamiento de estos genes al parecer fue específico de las células cancerosas y no ocurrieron en enfermedades no cancerosas de la mama (hiperplasia y fibroadenoma) ni en tejido normal adyacente al tumor, por lo que se propone que el análisis de posicionamiento génico podría emplearse como herramienta diagnóstica (158). Estas evidencias ponen de manifiesto, una vez más, la importancia de la organización espacial en la función nuclear y su potencial utilidad en el área clínica.

La ubicación de los genes con respecto a sus CT es diferente entre los grupos de LMC

La relación entre estructura, posicionamiento y función de genes dentro de su respectivo CT es un cuestionamiento que aún no ha sido elucidado. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que el posicionamiento de los genes dentro de su CT también influye en su actividad transcripcional. Torabi y colaboradores (2017) mostraron que los genes sobre-expresados se posicionan más hacia la periferia de sus respectivos CTs, mientras que los genes sub-expresados se localizan en el interior de los territorios. Además demostraron que los genes, cuando se silencian a través de un RNA de interferencia, se re-posicionan hacia el compartimento interior de su respectivo CT (159). Así mismo, Nagano y colaboradores (2013) empleando la técnica de Hi-C de una sola célula (conocida como single cell Hi-C en inglés), sugirieron que la localización de dominios de genes transcripcionalmente activos en los bordes de los CTs es un sello distintivo de la estructura cromosómica a gran escala y la disposición espacial del núcleo (31).

Sin embargo, los datos experimentales aún son limitados para genes específicos involucrados en condiciones fisiológicas y de enfermedad como el caso del cáncer. Nuestros datos fueron analizados desde un punto de vista topológico en el que se observó heterogeneidad en la posición de *BCR* y *ABL1* con respecto a sus respectivos CTs, y la presencia de la *t(9;22)* afectó los patrones de localización de la fusión *BA* y los pares alélicos de *BCR* y *ABL1*. En referencia a estas observaciones, se ha sugerido que la descondensación de la cromatina de largo alcance, que conlleva la extrusión de asas de cromatina, localiza los genes activos en el borde o lejos de los CTs, lo cual se sugiere esta mediado por la actividad transcripcional (31,159,160); sin embargo, y como se ha mencionado, existen datos experimentales limitados sobre este tema. En el presente trabajo, mostramos un panorama de gran variabilidad en los patrones

de ubicación de *BCR*, *ABL1* y el gen de fusión *BA*, sin embargo, el responder si esta estructura está vinculada a algún patrón de actividad del genoma es un área que requiere mayores estudios.

Actualmente, la regulación y los mecanismos detallados involucrados en la compartimentación del genoma, la formación de dominios y la determinación del posicionamiento de los CTs y genes son en gran parte desconocidos. Sin embargo, las consecuencias funcionales de la interrupción del genoma 3D pueden afectar procesos celulares importantes y eventualmente conducir a enfermedades e influir en su progresión (147,161,162).

En conclusión, Los hallazgos del presente estudio proponen un modelo que puede contribuir a identificar alteraciones genéticas y epigenéticas que alteran la estructura tridimensional del genoma, principalmente en células de pacientes con LMC que no responden al tratamiento. Además, nuestros hallazgos abordan las propiedades topológicas de CT9 y CT22, así como los genes *BCR* y *ABL1*, en pacientes con LMC y brindan una nueva visión general de la conformación de la cromatina que podría estar relacionada con el pronóstico clínico. Estudios futuros serán críticos para delinear los factores y mecanismos involucrados en la alteración de la cromatina en pacientes con LMC que no responden a los inhibidores de la cinasa de tirosina, sin embargo, la capacidad de desarrollar herramientas con la habilidad de detectar estas diferencias celulares cuando los pacientes con LMC acuden a la clínica por primera vez contribuiría significativamente a su diagnóstico, estratificación de riesgo y posibles tratamientos.

6. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo empleamos microscopía de súper-resolución y reconstrucción tridimensional para describir las características topológicas de los CTs 9 y 22 y los genes *BCR* y *ABL1* involucrados en la t(9;22), característica de la LMC. Analizando células CD34+ de médula ósea de pacientes que respondían y no al tratamiento con TKI, encontramos que la falta de respuesta de estos pacientes correlaciona con los altos niveles de disociación en la estructura de los CTs 9 y 22, aumento de los volúmenes de los CTs (especialmente para CT22), aumento del solapamiento entre CT9 y CT22 y aumento de la ocupación de H3K9ac, una marca epigenética de cromatina abierta, en CT22. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la disociación a gran escala de los CT 9 y 22 se correlaciona con la respuesta clínica de los pacientes con LMC.

Aunque los ensayos realizados en este estudio estuvieron limitados por el número de células y su naturaleza irrecuperable, siendo la MO un tejido primario de difícil acceso y cantidad restringida, nuestros resultados abren nuevas perspectivas para el estudio de la resistencia al tratamiento con TKI en la LMC. Algunas de las preguntas que surgen a partir de nuestros hallazgos incluyen: ¿La disociación de los CTs 9 y 22 es un fenómeno restringido solo a los cromosomas involucrados en t(9;22)? ¿La disociación afecta a otros CTs en particular o es un fenómeno global similar al caos genómico? Dado que la progresión de la LMC implica la aparición de alteraciones cromosómicas además del cromosoma Ph, ¿cómo afectaría la co-ocurrencia de estas u otras alteraciones cromosómicas a la topología nuclear de estas células? ¿Podrían estar presentes aberraciones cromosómicas crípticas adicionales en las células analizadas que se pasan por alto debido a las limitaciones de resolución inherentes al cariotipo de bandas G? Además, y dado que la organización del genoma 3D afecta la regulación transcripcional, ¿qué procesos celulares y mecanismos reguladores se ven afectados en células con CT9 y 22 altamente alterados/disociados? ¿Cómo cambia el perfil epigenético y el transcriptoma en estas células?

Para responder estas y más preguntas, se requieren estudios exhaustivos que incluyan microscopía de súper-resolución, métodos de captura conformacional de cromosomas y secuenciación del genoma a gran escala en células individuales para resolver estas cuestiones y determinar su papel preciso en la resistencia a los inhibidores de la cinasa de tirosina en la LMC.

7. ANEXOS

7.1 Población de estudio

Grupo I.- Pacientes con probable diagnóstico de LMC que cumplan con los criterios de inclusión.

Grupo II.- Pacientes diagnosticados con LMC en remisión hematológica, citogenética y molecular completa de acuerdo con normas internacionales (103), que cumplan con los criterios de inclusión para este grupo.

Grupo III.- Pacientes diagnosticados con LMC que no presenten respuesta completa citogenética y/o molecular y que cumplan con los criterios de inclusión para este grupo.

Grupo IV.- Individuos sanos, sin presencia de alteraciones cromosómicas o enfermedades degenerativas.

7.1.1 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión Grupo I

- Pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) con probable diagnóstico de LMC.
- Firma del consentimiento informado para tomar la muestra de MO durante el aspirado de rutina como parte de su diagnóstico y seguimiento.

Criterios de exclusión Grupo I

- Pacientes que hayan recibido tratamiento previo con inhibidores de cinasa de tirosina (específicos para la fusión *BCR-ABL1*), tales como Imatinib, Dasatinib y Nilotinib previos a su ingreso al INCan.
- Pacientes en los que después de realizar el estudio citogenético no se encuentre el cromosoma Filadelfia (Ph-).
- Pacientes que posteriormente se diagnostiquen con un síndrome mieloproliferativo distinto a LMC.

Criterios de eliminación Grupo I

- Expedientes que no contengan información completa como: edad, sexo, biometría hemática, química sanguínea, tamaño del bazo, fecha de aspirado, informe citogenético (FISH y/o cariotipo), día, mes y año de diagnóstico.
- Retiro del consentimiento informado.

Criterios de inclusión Grupo II

- Pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) diagnosticados con LMC que presenten respuesta hematológica, citogenética y molecular completa de acuerdo con normas internacionales:

- Respuesta hematológica completa (CHR): células blancas $<10 \times 10^9/L$, plaquetas $<450 \times 10^9/L$, basófilos $<5\%$, sin presencia de células inmaduras como blastos, promielocitos, o mielocitos y sin esplenomegalia palpable
- Respuesta citogenética completa: 0% Ph+
- Respuesta molecular completa: niveles de transcritos *BCR-ABL1* no detectables por qRT-PCR.
- Pacientes que hayan recibido Imatinib como primera línea de tratamiento.
- Firma del consentimiento informado para la toma de MO durante el aspirado.

Criterios de exclusión Grupo II

- Pacientes que posteriormente se diagnostiquen con un síndrome mieloproliferativo distinto a LMC.
- Pacientes que hayan recibido tratamiento diferente a Imatinib como primera línea de tratamiento.

Criterios de eliminación Grupo II

- Expedientes que no contengan la información completa como: edad, sexo, biometría hemática, química sanguínea, tamaño del bazo, fecha de aspirado y biopsia de médula ósea, informe citogenético (FISH y /o cariotipo), día, mes y año de diagnóstico; día, mes y año de inicio de tratamiento, línea de tratamiento seguida, respuesta al tratamiento, monitoreo (6, 12 y 18 meses) lo que incluye fecha de cada uno de los aspirados y biopsias de médula ósea, así como el respectivo reporte de respuesta citogenética, hematológica y molecular (en este último caso, se toma en cuenta a partir de los 10 meses de iniciado el tratamiento). Si es el caso, fecha de recurrencia o eventos adversos.
- Retiro del consentimiento informado.

Criterios de inclusión Grupo III

- Pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) diagnosticados con LMC que no presenten respuesta citogenética, o una respuesta menor o mínima y sin respuesta molecular:
 - Respuesta citogenética menor (36-65% Ph+); mínima (66-95% Ph+); o nula ($>95\%$ Ph+)
 - Sin respuesta molecular niveles de transcritos *BCR-ABL1* detectables por qRT-PCR.
- Pacientes que hayan recibido Imatinib como primera línea de tratamiento.
- Firma del consentimiento informado para la toma de MO durante el aspirado.

Criterios de exclusión Grupo III

- Pacientes que posteriormente se diagnostiquen con un síndrome mieloproliferativo distinto a LMC.

- Pacientes que hayan recibido tratamiento diferente a Imatinib como primera línea de tratamiento.

Criterios de eliminación Grupo III

- Expedientes que no contengan la información completa como: edad, sexo, biometría hemática, química sanguínea, tamaño del bazo, fecha de aspirado y biopsia de médula ósea, informe citogenético (FISH y /o cariotipo), día, mes y año de diagnóstico; día, mes y año de inicio de tratamiento, línea de tratamiento seguida, respuesta al tratamiento, monitoreo (6, 12 y 18 meses) lo que incluye fecha de cada uno de los aspirados y biopsias de médula ósea, así como el respectivo reporte de respuesta citogenética, hematológica y molecular (en este último caso, se toma en cuenta a partir de los 10 meses de iniciado el tratamiento). Si es el caso, fecha de recurrencia o eventos adversos.
- Retiro del consentimiento informado.

Criterios de inclusión Grupo IV

- Individuos donadores de sangre periférica movilizada (SPM) sometidos al proceso de aféresis para trasplante alogénico de pacientes del INCan que como parte de su tratamiento sea indicado este procedimiento.
- Firma del consentimiento informado para tomar la muestra proveniente del proceso de aféresis destinada para conteo celular que como procedimiento normal es desechada después de dicho conteo.

Criterios de exclusión Grupo IV

- Individuos diagnosticados con algún síndrome o enfermedad crónica y/o degenerativa.

Criterios de eliminación Grupo IV

- Información incompleta del donante: edad, sexo, biometría hemática, serología, química sanguínea, fecha de procedimiento de aféresis.
- Las muestras de individuos que después de haber sido sometidos a análisis citogenético presenten alguna alteración numérica o estructural.
- Retiro del consentimiento informado.

7.2 Determinación de la respuesta de los pacientes con LMC tratados con inhibidores de cinasa de tirosina en el INCan.

Como parte del monitoreo y evaluación de la respuesta al tratamiento de los pacientes con LMC, es necesario dar seguimiento clínico, hematológico, citogenético y molecular.

Una respuesta hematológica (RH) indica una mejoría en el conteo de células en sangre periférica (SP) y se considera completa al encontrarse un número de glóbulos blancos por

debajo de $10 \times 10^9/L$, plaquetas por debajo de $450 \times 10^9/L$, células inmaduras ausentes, y no se presentan signos o síntomas de la enfermedad. Una respuesta hematológica parcial se define por una persistencia de células inmaduras, plaquetas por debajo del 50% de los niveles previos al tratamiento, pero por encima de $450 \times 10^9/L$ (163,164).

Por otra parte, la respuesta citogenética es evaluada mediante citogenética convencional (células de MO en metafase) o empleando la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en células metafásicas o interfásicas de MO o SP (164). Se deben evaluar un mínimo de 200 células empleando una sonda doble que detecta el gen *BCR* con fluorescencia verde y el gen *ABL1* con fluorescencia roja. Una señal amarilla indica la presencia de la secuencia de fusión *BCR-ABL1*. Esta técnica no sólo permite la detección de la presencia, si no también, el número de copias del gen fusionado (165).

Los pacientes diagnosticados con LMC muestran del 85-99% de núcleos positivos en MO antes del tratamiento, lo cual disminuye a menos del 1% cuando la terapia tiene éxito (165). La respuesta citogenética se define dependiendo de la disminución que se logre de las células Ph positivas (Ph+): se considera parcial (RCP) cuando se encuentra del 1 al 35% de células Ph+, se considera respuesta completa (RCC) cuando no se observan células Ph+; así mismo, la respuesta puede ser menor (RCM) cuando se obtiene un porcentaje de células Ph+ entre 36 y 65%, y mínima cuando se obtiene entre 88 y 95% de células Ph+. Finalmente, se considera que no hay respuesta citogenética cuando hay 95% o más de células Ph positivas (**Tabla 2**) (163).

En cuanto a la respuesta molecular, esta se determina empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR) a partir de RNA obtenido de sangre periférica (SP). Esta técnica se basa en la medición de los niveles de transcrito *BCR-ABL*, comparándolo con los niveles de transcrito de un gen de referencia o gen control, que en este caso es el mismo gen *ABL1* (166). Los resultados se expresan como una proporción de copias del transcrito *BCR-ABL1* respecto a las copias del gen control, este resultado es convertido a estándares internacionales usando un factor de conversión.

La respuesta molecular define el nivel de transcrito *BCR-ABL* en relación con un valor de referencia establecido, determinado mediante la medición de los niveles de transcrito *BCR-ABL1* en SP de los pacientes con LMC en fase crónica antes de comenzar el tratamiento. Los niveles de transcrito son entonces, normalizados de acuerdo con escalas internacionales (103). Una ausencia completa de los transcritos se considera una respuesta molecular completa (RMC). Mientras que una respuesta molecular mayor (RMM) se define como una reducción de 3-log o una reducción de 0.1% comparada con el nivel del valor de referencia, lo que representa una carga de la enfermedad de aproximadamente 10 veces menos que una RCC (**Tabla 2**) (166).

Tipo de respuesta	Definición
RHC (Respuesta hematológica completa)	Células blancas $<10 \times 10^9/L$ Plaquetas $<450 \times 10^9/L$ Basófilos $<5\%$ Sin presencia de células inmaduras como blastos, promielocitos, o mielocitos Sin esplenomegalia palpable
Respuesta citogenética (médula ósea)	Completa (RCC): 0% de células con Ph+ Parcial (RCP): 1-35% de células con Ph+ Menor (RCM): 36-65% de células con Ph+ Ninguna (NoRC): $>95\%$ de células con Ph+
Respuesta molecular (qRT-PCR en SP)	Completa (RMC): Transcritos indetectables de BCR-ABL por RT-PCR Mayor (RMM): Radio de BCR-ABL a ABL $<0.1\%$ de la escala internacional

Tabla 2. Definición de respuesta hematológica, citogenética y molecular (163).

Como parte fundamental del tratamiento, la evaluación de la respuesta se seguirá al inicio, y durante los primeros 3 meses, se hará el monitoreo clínico, hematológico y bioquímico cada 2 semanas, o más frecuente en caso de que sea necesario, posteriormente se dará seguimiento dependiendo de las condiciones y respuesta obtenida.

La respuesta hematológica debe ser monitoreada por SP cada dos semanas hasta que se logre y confirme una respuesta hematológica completa, y cada 3 meses a partir de entonces. La respuesta citogenética completa (RCC) es el estándar más importante para evaluar la respuesta óptima y el resultado a largo plazo. En consecuencia, la médula ósea debe ser reevaluada cada 6 meses después del tercer mes hasta que se alcance y confirme la RCC, y al menos cada 12 meses, si no se puede garantizar un monitoreo molecular regular. Así mismo, es importante considerar que las etapas citogenéticas importantes a evaluar son a los 12 y a los 18 meses, y que también la respuesta temprana a los 3 y 6 meses es importante (167). En caso de ser posible, se recomienda realizar la qRT-PCR cada 3 meses hasta lograr una respuesta molecular mayor. Una vez lograda la RCC o RMM, la citogenética se podrá realizar cada 12 meses y RT-PCR cada 6 meses; en caso de tener riesgo alto se podrá realizar el monitoreo más frecuente (Tabla 3). (163,168)

Método de evaluación	Monitoreo inicial (al menos hasta que se logre la RCC)	Monitoreo subsecuente (para pacientes con RCC estable)
Hematológico	Cada 2 semanas	Cada 3 meses una vez que se logre la RCC
Citogenético (MO)	Cada 3-6 meses	Cada 12-24 meses una vez que se logre la RCC
Molecular (SP)	Cada 3 meses	Cada 3-6 meses, que puede incrementar hasta cada mes si se detecta un incremento en los niveles de transcrito

Tabla 3. Frecuencias recomendadas para la evaluación de respuesta en pacientes con LMC (105).

7.3 Manejo de muestras de médula ósea (MO)

Las muestras se obtuvieron durante el aspirado habitual de médula ósea que se realiza para el diagnóstico de LMC (Grupo I) y el posterior seguimiento para monitorear remisión (Grupo II y III). Siguiendo los protocolos estándar de aspirado y asepsia, se colectaron aproximadamente 5ml de MO en tubos Vacutainer con heparina sódica (BD Diagnosis, Cat. Núm.367886), para evitar la coagulación de la muestra

Una vez obtenida la muestra, los tubos fueron rotulados inmediatamente con el nombre del paciente y la fecha de toma de la muestra para finalmente transportarla al donde fue procesada. En todo momento, la muestra se conservó a temperatura ambiente hasta su procesamiento, el cual fue de inmediato (el mismo día en el que se recibe la muestra) para evitar que la muestra sea afectada.

7.4 Manejo de sangre periférica movilizada de individuos sanos

La obtención de sangre periférica movilizada (MPB) se realizó a partir de muestras de donantes sanos seleccionados para trasplante alogénico en el INCan (Ver Anexo 6.4.1). Estas muestras son colectadas mediante el procedimiento de aféresis. Al final de este, las células son procesadas para su congelamiento hasta que se transfunden al receptor (169). Como parte del procedimiento, se toman 2ml del producto final de la aféresis para contabilizar el total de células colectadas y el número de células progenitoras y troncales hematopoyéticas CD34+. Este conteo se lleva a cabo en el área de Citometría y Criopreservación del departamento de Banco de Sangre del INCan, para ello, se requiere solo un mililitro y el volumen restante

normalmente es desechado. Esta muestra que usualmente se desecha es la que fue utilizada en el presente estudio.

Una vez recuperada la muestra, el tubo fue rotulado inmediatamente con el nombre del paciente, código y la fecha de toma de la muestra para finalmente ser transportada al laboratorio para su procesamiento inmediato. Las condiciones de la muestra incluyeron su conservación a temperatura ambiente hasta su procesamiento, el cual fue el mismo día en el que se recibió la muestra, para evitar que la muestra fuese afectada.

7.4.1 Trasplante alogénico de células troncales hematopoyéticas

El trasplante de células hematopoyéticas (TCH) es un procedimiento que consiste en la infusión de células progenitoras y troncales hematopoyéticas (PyTH) para reconstituir el sistema hematopoyético del paciente que ha sido previamente acondicionado para recibir el injerto. Este proceder se ha convertido en una modalidad terapéutica para una gran variedad de enfermedades, como hemopatías malignas, anemia aplásica, inmunodeficiencias y gran número de tumores sólidos (cáncer de mama, cáncer de ovario, sarcomas y tumores cerebrales) (170).



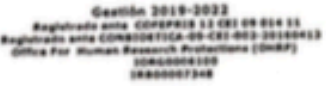
En un trasplante alogénico, el paciente recibe células PyTH de médula ósea o de sangre periférica movilizada de otra persona (usualmente de familiares de primer grado, pero también puede ser de un donante sin parentesco familiar). La selección de donadores está basada en el tipo de antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés) el cual debe ser compatible entre donador y receptor, lo cual es un elemento crítico para asegurar el éxito del trasplante (170).

Las células PyTH movilizadas de sangre periférica han llegado a convertirse en la opción más recurrente para el trasplante de células troncales hematopoyéticas debido a la relativa facilidad de acceso a la muestra. Un procedimiento llamado aféresis o leucocitaféresis se realiza para obtener las células troncales de sangre periférica para el trasplante. Este procedimiento consiste en separar los componentes celulares que contengan células PyTH y devueltos al torrente sanguíneo el resto de los componentes. Durante cuatro o cinco días antes de la aféresis, se administra al donante un medicamento que contiene un factor de crecimiento denominado Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF por sus siglas en inglés). Este medicamento estimula la MO del donador para producir un exceso en la cantidad de células PyTH, las cuales se liberan al torrente sanguíneo (169).

Durante la aféresis, se extrae la sangre por una vena principal del brazo o por un catéter venoso central. La sangre pasa por una máquina que separa las células PyTH. La sangre que queda se regresa al donante y se guardan las células blancas y PyTH que se hayan obtenido (169). La aféresis es un procedimiento que dura por lo general entre 4 y 6 horas. Como parte

importante de este proceso, la muestra debe ser analizada y contabilizada para conocer el número total de células recuperadas, para ello, se toman 2 ml de la muestra y el conteo se lleva a cabo por citometría de flujo. El resto de las células (aproximadamente 500ml) son procesadas y criopreservadas para el futuro trasplante a la MO en pacientes que así lo requieran (169). Parte de las células PyTH colectadas (2ml) son analizadas y contabilizadas, mientras que el resto (500ml) de las células se congelan hasta que se transfunden al receptor.

7.5 Aprobación del protocolo de investigación por parte de los Comités de Ética e Investigación del INCan

No protocolo: CEI/856/13
No. Ref. INCAN/CEI/895/21
DÉCIMA TERCERA SESIÓN ORDINARIA
09 de septiembre, 2021.

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo.
Investigador Principal


Presente.

En relación al protocolo: "Caracterización de los territorios cromosómicos en los que se encuentran los genes BCR y ABL1 y su asociación con la generación de la t(9;22) en pacientes con leucemia mieloide crónica" (013/030/ICI)(CEI/856/13). El Comité de Ética en Investigación revisamos y aprobamos la siguiente documentación:


- Formato único de Protocolo (013/030/ICI)(CEI/856/13) Versión 3.0 Fecha: 08 de mayo de 2019 en Español
- Consentimiento Informado para pacientes Versión 1 en español de fecha 07 de febrero de 2016
- Consentimiento Informado para Población Sana Versión 1 en español de fecha 23 de marzo de 2017

La información presentada cumple con todos los requisitos por lo que el Comité de Ética en Investigación puede proceder con la aprobación de la renovación anual. Esta aprobación tiene una vigencia hasta el 09 de septiembre del 2022. Por lo que en caso necesario le solicitamos atentamente someter su renovación anual antes de esta fecha, junto con un informe de los resultados obtenidos. También será necesario informar al comité cualquier información derivada del estudio que deba ser informada a los participantes. De acuerdo con los lineamientos de regulación interno, buenas prácticas clínicas y políticas de operación del Comité de Ética en Investigación del INCan, es indispensable hacer de su conocimiento que cualquier miembro de los comités que participa en un proyecto de investigación NO tiene VOZ ni Voto en las resoluciones acerca del estudio. (Se requiere informe de los avances "status" de eventos adversos y enmiendas de manera semestral).

Atentamente


Dra. Myrna G. Candelaria Hernández
Presidente del Comité de Ética en Investigación.

Av. San Fernando No. 2 Puerta 1, Colonia Barrio del Niño Jesús, C.P. 14080,
Alcaldía de Tlalpan, CDMX Tel. (55) 56 28 04 00 Ext 37015 www.incan.salud.ano.mx



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA CDMX
COMBIOÉTICA-09-CEI-002-20160413 GESTIÓN 2019/2022
MOCHMCLLCIAOP ceincan@gmail.com



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



**INSTITUTO NACIONAL
DE CANCEROLOGÍA**
ANIVERSARIO 1946 2021

REF/INCAN/CI/0900/2021

CDMX, a 09 de septiembre de 2021

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo
Investigador Principal
Presente

En su oficio recibido el 17 de agosto de 2021, se presentó en la **Décima Tercera Sesión Ordinaria del Comité de Investigación**, renovación anual 2021-2022, con los siguientes documentos:

- ❖ Formato Único de Protocolo versión 3.0 fecha: 08 de mayo de 2019 en español.
- ❖ Consentimiento informado para pacientes versión 1 en español de fecha 07 de febrero de 2016.
- ❖ Consentimiento informado para población sana, versión 1 en español de fecha 23 de marzo de 2017.

Correspondientes al protocolo: **CARACTERIZACIÓN DE LOS TERRITORIOS CROMOSÓMICOS EN LOS QUE SE ENCUENTRAN LOS GENES BCR Y ABL1 Y SU ASOCIACIÓN CON LA GENERACIÓN DE LA T(9;22) EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA, (013/030/ICI) (CEI/856/13)**, la cual se revisó y se aprobó por los integrantes del Comité de Investigación.

Esta renovación tiene vigencia hasta el 09 de septiembre de 2022, por lo cual se solicita someter antes de esta fecha su renovación anual y así evitar la suspensión de su protocolo.

Atentamente

Dr. David F. Cantú de León
Presidente del Comité de Investigación

Dr. Diddier G. Prada Ortega
Secretario del Comité de Investigación

Av. San Fernando No. 2, Puerta 1, Col. Barrio del Niño Jesús, CP. 04080, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México.
Tel: (55) 5628 0400 www.incan.salud.gob.mx



7.6 Cartas de Consentimiento informado

6.6.1. Plantilla consentimiento informado pacientes LMC

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN INCa CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del Proyecto:

“Caracterización de los Territorios Cromosómicos en los que se encuentran los genes BCR y ABL1 y su asociación con la generación de la t(9;22) en pacientes con leucemia mieloide crónica”

A usted se le está solicitando que participe en un protocolo de investigación. Antes de tomar una decisión es importante que entienda por qué se hace la investigación, como se usará su información, lo que abarcará el estudio y como podría contribuir a este, así como los posibles beneficios.

¿Cuál es el propósito del estudio?

Usted padece Leucemia Mieloide Crónica (LMC) por lo que es necesario que siga un tratamiento acorde a lo que su médico considere necesario y el presente estudio no interferirá con el seguimiento de su tratamiento. La finalidad de este protocolo es analizar y evaluar ciertos factores biológicos que pueden ser importantes para que se origine la enfermedad que usted padece. El estudio se llevará a cabo en el instituto y pretende incluir 27 pacientes que como usted, padecen esta condición. Estamos tratando de hacer una aportación al entendimiento del porqué algunas personas como usted presentan alteraciones importantes para el desarrollo de LMC.

¿Tiene que participar?

Usted tiene la decisión si desea participar o no en el estudio. Incluso si se ~~refusa~~ a participar en el estudio clínico no tendrá ninguna desventaja, incluyendo tratamiento y atención médica que tiene derecho a recibir. Si usted decide participar en el estudio se le dará una forma de consentimiento informado para que la firme, y en cualquier momento que decida retirarse del estudio, puede hacerlo sin que esto afecte el tratamiento o seguimiento de su enfermedad.

¿Qué sucederá si participa?

Como parte del tratamiento y seguimiento de su enfermedad, se le tomará muestra de médula ósea. Este procedimiento lo llevará a cabo un médico especialista. Si usted elige participar en este estudio, tomaremos una parte de esta muestra y la usaremos para el presente protocolo de investigación. Así mismo y como parte de los procedimientos de rutina se le tomarán muestras de sangre periférica, si decide formar parte de este estudio también tomaremos parte de esta muestra (10ml).

Es importante aclarar que usted continuará todos los procedimientos médicos que sean necesarios para el adecuado tratamiento de su enfermedad y que ninguna de las muestras que tomaremos interferirá con su diagnóstico, tratamiento, ni con el seguimiento de su enfermedad.

Las muestras tomadas no se utilizarán para la generación de líneas celulares o con fines comerciales, ni para procesos de patentes, tampoco se utilizarán para estudios posteriores y solo serán conservadas por el periodo que se lleve a cabo el estudio al resguardo del investigador principal del proyecto, para posteriormente ser destruidas siguiendo los protocolos establecidos por nuestras autoridades sanitarias.

Al firmar este consentimiento informado no autoriza ningún otro procedimiento diagnóstico, terapéutico ni experimental y tampoco le será remunerado. Así mismo, es importante señalar que usted no tiene ninguna responsabilidad como parte de este estudio, pero tiene la libertad de solicitar información respecto a este.

Usted puede retirarse del estudio en el momento que desee por la razón que usted considere pertinente lo cual no afectará en el seguimiento de su enfermedad.

¿Cuáles son los posibles beneficios de participar?

Usted no tendrá un beneficio directo por su participación en este estudio, sin embargo, la muestra que acepte donar será un gran aporte para la investigación en el origen de la Leucemia Mieloide Crónica.

¿Cómo se usarán sus datos personales?

Es necesario recopilar ciertos datos personales para fines del estudio. Esta información se mantendrá en confidencialidad y solo será conocida por el investigador principal del protocolo. Para este fin, la muestra y sus datos serán codificados de forma independiente a su número de expediente.

Al firmar esta forma da su consentimiento al médico responsable del estudio y a su personal para recopilar y procesar sus datos personales ("datos del estudio"), incluyendo lo siguiente: Su fecha de nacimiento, sexo, origen étnico y datos personales sobre su salud física o mental o su padecimiento. Esta información se mantendrá en estricta confidencialidad y su identidad no será revelada en publicaciones ni en presentaciones de resultados. Su consentimiento para utilizar estos datos en el estudio no tiene una fecha específica de expiración, pero usted puede retirar su consentimiento en cualquier momento notificando a su doctor del estudio.

Tiene el derecho de solicitar la información sobre cualquier dato personal que el doctor del estudio pueda retener de usted. Si desea hacer alguna petición, sírvase contactar al doctor del estudio en primera instancia. También tiene el derecho de solicitar que se corrija cualquier equivocación en sus datos personales, y en caso de que usted retire su consentimiento, el responsable del estudio ya no utilizará sus datos.

Por lo que al firmar esta forma usted consienta al uso de los datos de Estudio como se describe en la misma.

Finalmente, es importante resaltar que la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios) estará enterado de su identidad por estar realizando el protocolo en México, así como el Comité de Ética en Investigación por realizarse en el INCan.

¿A quién puede contactar si necesita más información o ayuda?

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Investigador en Ciencias Médicas 'F'

Jefe del Laboratorio de Carcinogénesis

Av. San Fernando No.22 Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan. México D.F

Tel. 5536935200 ext. 231

Bjól. Eunice Fabián Morales

Laboratorio de Carcinogénesis. INCan

Av. San Fernando No.22 Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan. México D.F

Tel. 56-28-04-00 ext. 33015

Cel. 044-55-23-24-85-92

Si usted tiene alguna pregunta sobre sus derechos como sujeto de investigación, usted puede ponerse en contacto con el Comité de Ética en Investigación:

Psic. María del Carmen Lizeth León Castillo

Secretaria del Comité de Ética en Investigación. INCan

No. de teléfono: 56-28-04-00 extensión 37015

CONSENTIMIENTO INFORMADO

He recibido información verbal sobre el presente estudio y he leído la información por escrito anexa. Me dieron la oportunidad de discutir el estudio y hacer preguntas.

Estoy de acuerdo en participar en el estudio y estoy consciente que mi participación es por completo voluntaria.

Entiendo que me puedo retirar en cualquier momento sin que esto afecte mis cuidados en el futuro.

Al firmar esta información y forma de consentimiento acepto que mis datos personales, incluyendo los datos relacionados con mi estado físico o mental o padecimiento y raza u origen étnico, pueden ser utilizados como se describe en esta forma de consentimiento.

Entiendo que recibiré una copia firmada de esta información y forma de consentimiento.

Firma del sujeto

Fecha de la firma.

Nombre del Sujeto (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Firma de la persona que realiza la conducción
De la discusión del consentimiento informado

Fecha de la firma

Nombre de la persona que realiza la discusión del consentimiento informado. (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

La firma del representante legalmente aceptable debe agregarse si el sujeto es incapaz de firmar por él mismo. Debe mencionarse la relación entre el sujeto y el representante legalmente aceptable. La firma de 2 testigos imparciales debe agregarse.

Firma del representante legalmente aceptado

Fecha de la firma

Nombre del representante legalmente aceptado (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Relación del representante legalmente aceptado con el sujeto (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Domicilio del representante legalmente aceptado

Número de teléfono del representante legalmente aceptado

Firma del testigo imparcial 1

Fecha del testigo imparcial 1

Nombre del testigo imparcial 1 (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Versión 1 en español de fecha 07 de febrero de 2016

7.6.1. Plantilla consentimiento informado Población Sana

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO POBLACIÓN SANA

Título del Proyecto:

“Caracterización de los Territorios Cromosómicos en los que se encuentran los genes BCR y ABL1 y su asociación con la generación de la t(9;22) en pacientes con leucemia mieloide crónica”
Registro [INCan](#) CEI/856

A usted se le está invitando a que participe en un protocolo de investigación que busca analizar y evaluar ciertos factores biológicos que pueden ser importantes para que se origine la enfermedad de Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Usted está siendo considerado a participar en este estudio debido a que NO padece esta enfermedad ni ningún tipo de Cáncer.

Antes de tomar una decisión es importante que esté enterado como se usará su información, lo que abarcará el estudio y como podría contribuir a este, así como los posibles beneficios.

¿Cuál es el propósito del estudio?

Estamos tratando de hacer una aportación al entendimiento del porqué algunas personas presentan alteraciones importantes para el desarrollo de LMC. Por tanto, la finalidad de este protocolo es analizar y evaluar ciertos factores biológicos que pueden ser importantes para que se origine la enfermedad de Leucemia Mieloide Crónica (LMC). El estudio se llevará a cabo en el instituto y pretende incluir tanto pacientes que padecen la condición de LMC como individuos que NO presentan esta enfermedad ni ningún tipo de Cáncer.

¿Tiene que participar?

Usted tiene la decisión si desea participar o no en el estudio. Incluso si no desea participar en el estudio clínico no tendrá ninguna desventaja, incluyendo la atención médica que tiene derecho a recibir. Si usted decide participar en el estudio se le dará una forma de consentimiento informado para que la firme, y en cualquier momento que decida retirarse del estudio, puede hacerlo sin que esto afecte ningún procedimiento médico.

¿Qué sucederá si participa?

Como parte del proceso de donación para trasplante de médula ósea, usted será sometido a un procedimiento llamado aféresis. Este procedimiento lo llevará a cabo un médico especialista. Si usted elige participar en este estudio, tomaremos una parte de esta muestra y la usaremos para el presente protocolo de investigación.

Es importante aclarar que usted continuará todos los procedimientos médicos que sean necesarios para el adecuado proceso de donación y que la muestra que tomaremos no interferirá en este.

La muestra tomada no se utilizará para la generación de líneas celulares o con fines comerciales, ni para procesos de patentes, tampoco se utilizarán para estudios posteriores y solo serán conservadas por el periodo que se lleve a cabo el estudio al resguardo del investigador principal del proyecto, para posteriormente ser destruidas siguiendo los protocolos establecidos por nuestras autoridades sanitarias.

Al firmar este consentimiento informado no autoriza ningún otro procedimiento diagnóstico, terapéutico ni experimental y tampoco le será remunerado. Así mismo, es importante señalar que usted no tiene ninguna responsabilidad como parte de este estudio, pero tiene la libertad de solicitar información respecto a este.

Usted puede retirarse del estudio en el momento que desee por la razón que usted considere pertinente lo cual no afectará en el proceso de donación para trasplante de médula ósea.

¿Cuáles son los posibles beneficios de participar?

Usted no tendrá un beneficio directo por su participación en este estudio, sin embargo, la muestra que acepte donar será un gran aporte para la investigación en el origen de la Leucemia Mieloide Crónica.

¿Cómo se usarán sus datos personales?

Es necesario recopilar ciertos datos personales para fines del estudio. Esta información se mantendrá en confidencialidad y solo será conocida por el investigador principal del protocolo. Para este fin, la muestra y sus datos serán codificados de forma independiente a su número de expediente o ADT.

Al firmar esta forma da su consentimiento al médico responsable del estudio y a su personal para recopilar y procesar sus datos personales ("datos del estudio"), incluyendo lo siguiente: Su fecha de nacimiento, sexo, origen étnico y datos personales sobre su salud física o mental. Esta información se mantendrá en estricta confidencialidad y su identidad no será revelada en publicaciones ni en presentaciones de resultados. Su consentimiento para utilizar estos datos en el estudio no tiene una fecha específica de expiración, pero usted puede retirar su consentimiento en cualquier momento notificando al doctor encargado del estudio.

Tiene el derecho de solicitar la información sobre cualquier dato personal que el doctor del estudio pueda retener de usted. Si desea hacer alguna petición, sírvase contactar al doctor del estudio en primera instancia. También tiene el derecho de solicitar que se corrija cualquier equivocación en sus datos personales, y en caso de que usted retire su consentimiento, el responsable del estudio ya no utilizará sus datos.

Por lo que al firmar esta forma usted consienta al uso de los datos de Estudio como se describe en la misma.

Finalmente, es importante resaltar que la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios) estará enterado de su identidad por estar realizando el protocolo en México, así como el Comité de Ética en Investigación por realizarse en el [INCan](#).

¿A quién puede contactar si necesita más información o ayuda?

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Investigador en Ciencias Médicas 'F'

Jefe del Laboratorio de Carcinogénesis

Av. San Fernando No.22 Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan. México D.F

Tel. 5536935200 ext. 231

[Biól. Eunice Fabián Morales](#)

Laboratorio de Carcinogénesis. [INCan](#)

Av. San Fernando No.22 Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan. México D.F

Tel. 56-28-04-00 ext. 33015

Cel. 044-55-23-24-85-92

Si usted tiene alguna pregunta sobre sus derechos como sujeto de investigación, usted puede ponerse en contacto con el Comité de Ética en Investigación:

[Psic. María del Carmen Lizeth León Castillo](#)

Secretaria del Comité de Ética en Investigación. [INCan](#).

No. de teléfono: 56-28-04-00 extensión 37015

CONSENTIMIENTO INFORMADO

He recibido información verbal sobre el presente estudio y he leído la información por escrito anexa. Me dieron la oportunidad de discutir el estudio y hacer preguntas.

Estoy de acuerdo en participar en el estudio y estoy consciente que mi participación es por completo voluntaria.

Entiendo que me puedo retirar en cualquier momento sin que esto afecte mis cuidados en el futuro.

Al firmar esta información y forma de consentimiento acepto que mis datos personales, incluyendo los datos relacionados con mi estado físico o mental o padecimiento y raza u origen étnico, pueden ser utilizados como se describe en esta forma de consentimiento.

Entiendo que recibiré una copia firmada de esta información y forma de consentimiento.

Firma del sujeto

Fecha de la firma.

Nombre del Sujeto (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Firma de la persona que realiza la conducción
De la discusión del consentimiento informado

Fecha de la firma

Nombre de la persona que realiza la discusión del consentimiento informado. (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

La firma del representante legalmente aceptable debe agregarse si el sujeto es incapaz de firmar por él mismo. Debe mencionarse la relación entre el sujeto y el representante legalmente aceptable. La firma de 2 testigos imparciales debe agregarse.

Firma del representante legalmente aceptado

Fecha de la firma

Nombre del representante legalmente aceptado (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Relación del representante legalmente aceptado con el sujeto (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Domicilio del representante legalmente aceptado

Número de teléfono del representante legalmente aceptado

Firma del testigo imparcial 1

Fecha del testigo imparcial 1

Nombre del testigo imparcial 1 (CON LETRA DE MOLDE Y MAYÚSCULAS)

Versión 1 en español de fecha 23 de marzo de 2017

7.7 Abreviaturas

3C	Captura conformacional de cromosomas (Chromosome conformation capture)
3D-FISH	Hibridación Fluorescente <i>In Situ</i> Tridimensional (Three-Dimensional Fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
ABL1	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
ACA	Aberraciones cromosómicas adicionales
Allo-SCT	Alotrasplante de células madre (Allogeneic Stem Cell Transplantation)
AR	Alto rendimiento
ATP	Trifosfato de adenosina (Adenosine Triphosphate)
BCR	Breakpoint Cluster Region
CDF	Factor de descompactación de la cromatina
Chrs	Cromosomas (Chromosomes)
CND	Nanodominios de cromatina (Chromatin Nanodomains)
CT	Territorio Cromosómico (Chromosome Territory)
CTCF	Factor de unión a CCCTC – Proteína con 11 dedos de zinc
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAse	Deoxirribonucleasa
DSB	Rupturas de doble hebra (Double-strand break)
EUTOS	Estudio Europeo de Tratamiento y Resultados (European Treatment and Outcome Study)
FA	Fase Acelerada
FB	Fase Blástica
FC	Fase Crónica
FISH	Hibridación Fluorescente <i>In Situ</i> (Fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
HSC	Célula troncal hematopoyética (Hematopoietic Stem Cell)
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
IS	Escalas internacionales (International Scales)
kbs	kilobases
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crónica
LMC-FA	Leucemia Mieloide Crónica en Fase Acelerada
LMC-FB	Leucemia Mieloide Crónica en Fase Blástica
LMC-FC	Leucemia Mieloide Crónica en Fase Crónica
Mbs	Megabases
ME	Microscopía electrónica
MPB	Sangre periférica movilizada (Mobilized Peripheral Blood)

MPTs	Marcas post-traduccionales
MO	Médula Ósea
NGS	Secuenciación de nueva generación
NoRC	No o nula Respuesta Citogenética
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PDGFR	factor de crecimiento derivado de plaquetas
Ph+	Cromosoma Filadelfia positivo (Philadelphia chromosome)
PyTH	Células progenitoras y troncales hematopoyéticas
RCC	Respuesta Citogenética Completa
RCP	Respuesta Citogenética Parcial
RCM	Respuesta Citogenética Menor
RHC	Respuesta Hematológica Completa
RMC	Respuesta Molecular Completa
RMM	Respuesta Molecular Mayor
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA PolIII	RNA Polimerasa 2
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (Reverse transcription polymerase chain reaction)
SG	Supervivencia global
SIM	Microscopía de Iluminación Estructurada (Structured Illumination Microscopy)
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
STED	Reducción de la Emisión Estimulada (Stimulated Emission Depletion)
SMLM	Microscopía de localización de una sola molécula (Single-molecule localization microscopy)
SLP	Supervivencia libre de progresión
SP	Sangre Periférica
TAD	Dominio asociado topológicamente (Topologically Associating Domain)
TCH	Trasplante de Células Hematopoyéticas
TIE2	tirosina cinasa con dominios 2 similares a inmunoglobulina y EGF
TK	Cinasa de tirosina (Tyrosine Kinase)
TKI	Inhibidor de cinasa de tirosina (Tyrosine Kinase Inhibitor)
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
WCP	Pintado de cromosoma completo (Whole Chromosome Painting)
Grupos de estudio	
Healthy BM	Médula ósea de individuos sanos
MPB	Sangre periférica movilizada (Mobilized peripheral blood)
Naïve-R	Pacientes con LMC sin tratamiento previo

Naïve Non-R	Pacientes con LMC sin tratamiento previo que no respondieron a su tratamiento posterior con TKI
TKI-R	Pacientes LMC que recibieron TKI y respondieron
TKI Non-R	Ppacientes LMC que recibieron TKI y no respondieron

7.8 Publicaciones generadas durante el Doctorado

- Diego A Oliva Rico, **Eunice Fabian-Morales**, Rodrigo E. Cáceres-Gutiérrez, Adriana Gudiño, Fernanda Cisneros-Soberanis, Julieta Domínguez Ortíz, Oscar Almaraz-Rojas, Cristian Arriaga-Canon, Clementina Castro Hernández, Carlos de la Rosa, José L. Reyes, and Luis A. Herrera. Methylation of subtelomeric chromatin modifies the expression of the lncTERRA, disturbing telomere homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Jan;23(6):3271.
- **Eunice Fabian-Morales**, David Vallejo-Escamilla, Adriana Gudiño, Alfredo Rodríguez, Rodrigo González-Barrios, Yameli L. Rodríguez Torres, Clementina Castro Hernández, Alfredo H. de la Torre-Luján, Diego Oliva Rico, Erandhi C. Ornelas Guzmán, Alejandro López Saavedra, Sara Frias, and Luis A. Herrera. Large-scale topological disruption of chromosome territories 9 and 22 is associated with nonresponse to treatment in CML. *Int J Cancer*. 2021 Dec 16.
- **Eunice Fabian-Morales**, Carmen Fernández-Cáceres, Adriana Gudiño Gómez, Marco Alonso Andonegui Elguera, Karla Torres Arciga, Marco Armando Escobar Arrazola, Laura Tolentino García, Yair E Alfaro Mora, Diego A Oliva Rico, Rodrigo E Cáceres Gutiérrez, Julieta Domínguez Ortíz, Clementina Castro Hernández, Luis A Herrera Montalvo, David Bruno Díaz-Negrete, Nancy Reynoso Noverón. Genotoxicity of Marijuana in mono-users. *Front Psychiatry*. 2021;12:753562.
- Rodrigo E. Cáceres-Gutiérrez, Marco A. Andonegui, Diego A. Oliva-Rico, Rodrigo González-Barrios, Fernando Luna, Cristian Arriaga-Canon, Alejandro López-Saavedra, Didier Prada, Clementina Castro, Laurent Parmentier, José Díaz-Chávez, Yair Alfaro-Mora, Erick I. Navarro-Delgado, **Eunice Fabian-Morales**, Bao Tran, Jyoti Shetty, Yongmei Zhao, Nicolas Alcaraz, Carlos De la Rosa, José L. Reyes, Sabine Hédoquin, Florent Hubé, Claire Francastel, Luis A. Herrera. Proteasome inhibition alters mitotic progression through the upregulation of centromeric α -Satellite RNAs. *The FEBS Journal*. First published: 05 November 2021. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/febs.16261>
- Adriana Palacios-Campos, Olga Gutiérrez, **Eunice Fabian-Morales**, Alejandro Áviles, and Myrna Candelaria. Transitory response of a myelodysplastic syndrome with deletion of chromosome 5q to thalidomide. *Report. Revista medica de Chile*. 2020; 148(9):1357-1361. DOI: 10.4067/S0034-98872020000901357
- Alejandro López-Saavedra, **Eunice Fabian-Morales**, and Luis A Herrera Montalvo. Técnicas de microscopía avanzada. *Mens Bioquim*. 2019; (43) 61-72

- González-Barrios R, Soto-Reyes E, Quiroz-Baez R, **Fabián-Morales E**, Díaz-Chávez J, del Castillo V, Mendoza J, López-Saavedra A, Castro C and Herrera LA. Differential distribution of HP1 proteins after trichostatin a treatment influences chromosomal stability in HCT116 and WI-38 cells. *Cell Division*. 2014; 9: 6. DOI 10.1186/s13008-014-0006-2
- Mendoza J, Martínez J, Hernández C, Pérez-Montiel D, Castro C, **Fabián-Morales E**, Santibáñez M, González-Barrios R, Díaz-Chávez J, Andonegui MA, Reynoso N, Oñate LF, Jiménez MA, Núñez M, Dyer R and Herrera LA. Association between ERCC1 and XPA expression and polymorphisms and the response to cisplatin in testicular germ cell tumours. *Br J Cancer*. 2013; 109(1):68-75. DOI: 10.1038/bjc.2013.303.

8. REFERENCIAS

1. Dekker J, Misteli T. Long-Range Chromatin Interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Oct 1;7(10):a019356.
2. Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*. 2012 May 17;485(7398):376–80.
3. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imaikaev M, Ragoczy T, Telling A, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 2009 Oct 9;326(5950):289–93.
4. Wang S, Su JH, Beliveau BJ, Bintu B, Moffitt JR, Wu C ting, et al. Spatial organization of chromatin domains and compartments in single chromosomes. *Science*. 2016 Aug 5;353(6299):598–602.
5. Cremer T, Cremer M. Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Mar;2(3):a003889.
6. Kumaran RI, Thakar R, Spector DL. Chromatin dynamics and gene positioning. *Cell*. 2008 Mar 21;132(6):929–34.
7. Parada LA, McQueen PG, Misteli T. Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol*. 2004;5(7):R44.
8. Misteli T. The Self-Organizing Genome: Principles of Genome Architecture and Function. *Cell*. 2020 Oct 1;183(1):28–45.
9. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature*. 2003 Jan 23;421(6921):448–53.
10. Ou HD, Phan S, Deerinck TJ, Thor A, Ellisman MH, O’Shea CC. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science*. 2017 Jul 28;357(6349):eaag0025.
11. Maeshima K, Ide S, Babokhov M. Dynamic chromatin organization without the 30-nm fiber. *Curr Opin Cell Biol*. 2019 Jun;58:95–104.
12. Vermunt MW, Zhang D, Blobel GA. The interdependence of gene-regulatory elements

- and the 3D genome. *J Cell Biol.* 2019 Jan 7;218(1):12–26.
13. Halfon MS. Silencers, Enhancers, and the Multifunctional Regulatory Genome. *Trends in Genetics.* 2020 Mar 1;36(3):149–51.
 14. Darbellay F, Duboule D. Chapter Sixteen - Topological Domains, Metagenes, and the Emergence of Pleiotropic Regulations at Hox Loci. In: Wassarman PM, editor. *Current Topics in Developmental Biology* [Internet]. Academic Press; 2016 [cited 2022 Jan 19]. p. 299–314. (Essays on Developmental Biology, Part A; vol. 116). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007021531500188X>
 15. Shopland LS, Lynch CR, Peterson KA, Thornton K, Kepper N, Hase J von, et al. Folding and organization of a contiguous chromosome region according to the gene distribution pattern in primary genomic sequence. *J Cell Biol.* 2006 Jul 3;174(1):27–38.
 16. Mirny LA, Imakaev M, Abdennur N. Two major mechanisms of chromosome organization. *Current Opinion in Cell Biology.* 2019 Jun 1;58:142–52.
 17. Dekker J, Mirny L. The 3D Genome as Moderator of Chromosomal Communication. *Cell.* 2016 Mar 10;164(6):1110–21.
 18. Beagrie RA, Scialdone A, Schueler M, Kraemer DCA, Chotalia M, Xie SQ, et al. Complex multi-enhancer contacts captured by genome architecture mapping. *Nature.* 2017 Mar;543(7646):519–24.
 19. Rowley MJ, Corces VG. Organizational principles of 3D genome architecture. *Nat Rev Genet.* 2018 Dec;19(12):789–800.
 20. Li G, Reinberg D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 2011 Apr;21(2):175–86.
 21. Fraser J, Ferrai C, Chiariello AM, Schueler M, Rito T, Laudanno G, et al. Hierarchical folding and reorganization of chromosomes are linked to transcriptional changes in cellular differentiation. *Mol Syst Biol* [Internet]. 2015 Dec 28 [cited 2016 Apr 20];11(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4704492/>
 22. Jerković I, Szabo Q, Bantignies F, Cavalli G. Higher-Order Chromosomal Structures Mediate Genome Function. *Journal of Molecular Biology.* 2020 Feb 7;432(3):676–81.
 23. Proudhon C, Hao B, Raviram R, Chaumeil J, Skok JA. Long-Range Regulation of V(D)J Recombination. *Adv Immunol.* 2015;128:123–82.
 24. Cremer M, Grasser F, Lanctôt C, Müller S, Neusser M, Zinner R, et al. Multicolor 3D fluorescence in situ hybridization for imaging interphase chromosomes. *Methods Mol Biol.* 2008;463:205–39.
 25. Branco MR, Pombo A. Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol.* 2006 May;4(5):e138.
 26. Fritz AJ, Sehgal N, Pliss A, Xu J, Berezney R. Chromosome territories and the global regulation of the genome. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019 Jan 21;
 27. Bolzer A, Kreth G, Solovei I, Koehler D, Saracoglu K, Fauth C, et al. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol.* 2005 May;3(5):e157.

28. López-Saavedra A, Fabian-Morales E, Herrera L. Técnicas de microscopía avanzada. 2019 Oct 1;XLI:61–72.
29. Johnstone CP, Wang NB, Sevier SA, Galloway KE. Understanding and Engineering Chromatin as a Dynamical System across Length and Timescales. *Cell Systems*. 2020 Nov 18;11(5):424–48.
30. Davies JOJ, Oudelaar AM, Higgs DR, Hughes JR. How best to identify chromosomal interactions: a comparison of approaches. *Nat Methods*. 2017 Jan 31;14(2):125–34.
31. Nagano T, Lubling Y, Stevens TJ, Schoenfelder S, Yaffe E, Dean W, et al. Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature*. 2013 Oct 3;502(7469):59–64.
32. Cremer T, Cremer C. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories. *Eur J Histochem*. 2006 Sep;50(3):161–76.
33. Cremer T, Cremer C. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present. *Eur J Histochem*. 2006 Dec;50(4):223–72.
34. Bauman JG, Wiegant J, Borst P, van Duijn P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res*. 1980 Aug;128(2):485–90.
35. Cremer T, Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*. 2001 Apr;2(4):292–301.
36. Smeets D, Markaki Y, Schmid VJ, Kraus F, Tattermusch A, Cerase A, et al. Three-dimensional super-resolution microscopy of the inactive X chromosome territory reveals a collapse of its active nuclear compartment harboring distinct Xist RNA foci. *Epigenetics Chromatin*. 2014;7:8.
37. Cremer M, von Hase J, Volm T, Brero A, Kreth G, Walter J, et al. Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells. *Chromosome Res*. 2001;9(7):541–67.
38. Bickmore WA. The spatial organization of the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2013;14:67–84.
39. Takizawa T, Meaburn KJ, Misteli T. The meaning of gene positioning. *Cell*. 2008 Oct 3;135(1):9–13.
40. Boyle S, Gilchrist S, Bridger JM, Mahy NL, Ellis JA, Bickmore WA. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet*. 2001 Feb 1;10(3):211–9.
41. Tanabe H, Müller S, Neusser M, von Hase J, Calcagno E, Cremer M, et al. Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Apr 2;99(7):4424–9.
42. Parada LA, McQueen PG, Munson PJ, Misteli T. Conservation of Relative Chromosome Positioning in Normal and Cancer Cells. *Current Biology*. 2002 Oct 1;12(19):1692–7.

43. Kreth G, Finsterle J, von Hase J, Cremer M, Cremer C. Radial arrangement of chromosome territories in human cell nuclei: a computer model approach based on gene density indicates a probabilistic global positioning code. *Biophys J*. 2004 May;86(5):2803–12.
44. Tanabe H, Habermann FA, Solovei I, Cremer M, Cremer T. Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat Res*. 2002 Jul 25;504(1–2):37–45.
45. Marella NV, Seifert B, Nagarajan P, Sinha S, Berezney R. Chromosomal rearrangements during human epidermal keratinocyte differentiation. *J Cell Physiol*. 2009 Oct;221(1):139–46.
46. Dietzel S, Zolghadr K, Hepperger C, Belmont AS. Differential large-scale chromatin compaction and intranuclear positioning of transcribed versus non-transcribed transgene arrays containing beta-globin regulatory sequences. *J Cell Sci*. 2004 Sep 1;117(Pt 19):4603–14.
47. Reddy KL, Zullo JM, Bertolino E, Singh H. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature*. 2008 Mar 13;452(7184):243–7.
48. Zink D, Amaral MD, Englmann A, Lang S, Clarke LA, Rudolph C, et al. Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J Cell Biol*. 2004 Sep 13;166(6):815–25.
49. Fraser P, Bickmore W. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature*. 2007 May 24;447(7143):413–7.
50. Finlan LE, Sproul D, Thomson I, Boyle S, Kerr E, Perry P, et al. Recruitment to the nuclear periphery can alter expression of genes in human cells. *PLoS Genet*. 2008 Mar 21;4(3):e1000039.
51. Fritz AJ, Stojkovic B, Ding H, Xu J, Bhattacharya S, Gaile D, et al. Wide-scale alterations in interchromosomal organization in breast cancer cells: defining a network of interacting chromosomes. *Hum Mol Genet*. 2014 May 15;23(10):2237–47.
52. Marella NV, Bhattacharya S, Mukherjee L, Xu J, Berezney R. Cell type specific chromosome territory organization in the interphase nucleus of normal and cancer cells. *J Cell Physiol*. 2009 Oct;221(1):130–8.
53. Zeitz MJ, Mukherjee L, Bhattacharya S, Xu J, Berezney R. A probabilistic model for the arrangement of a subset of human chromosome territories in WI38 human fibroblasts. *J Cell Physiol*. 2009 Oct;221(1):120–9.
54. Sehgal N, Seifert B, Ding H, Chen Z, Stojkovic B, Bhattacharya S, et al. Reorganization of the interchromosomal network during keratinocyte differentiation. *Chromosoma*. 2016 Jun;125(3):389–403.
55. Raska I, Shaw PJ, Cmarko D. Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Jun;18(3):325–34.
56. Mehta IS, Amira M, Harvey AJ, Bridger JM. Rapid chromosome territory relocation by nuclear motor activity in response to serum removal in primary human fibroblasts. *Genome Biol*. 2010 Jan 13;11(1):R5.
57. Mehta IS, Eskiw CH, Arican HD, Kill IR, Bridger JM. Farnesyltransferase inhibitor treatment restores chromosome territory positions and active chromosome dynamics in

- Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Genome Biol.* 2011 Aug 12;12(8):R74.
58. Maruyama EO, Hori T, Tanabe H, Kitamura H, Matsuda R, Tone S, et al. The actin family member Arp6 and the histone variant H2A.Z are required for spatial positioning of chromatin in chicken cell nuclei. *J Cell Sci.* 2012 Aug 15;125(Pt 16):3739–43.
59. Bridger JM, Boyle S, Kill IR, Bickmore WA. Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Curr Biol.* 2000 Feb 10;10(3):149–52.
60. Tanabe H, Küpper K, Ishida T, Neusser M, Mizusawa H. Inter- and intra-specific gene-density-correlated radial chromosome territory arrangements are conserved in Old World monkeys. *Cytogenet Genome Res.* 2005;108(1–3):255–61.
61. Khalil A, Grant JL, Caddle LB, Atzema E, Mills KD, Arneodo A. Chromosome territories have a highly nonspherical morphology and nonrandom positioning. *Chromosome Res.* 2007;15(7):899–916.
62. Szczurek A, Birk U, Knecht H, Dobrucki J, Mai S, Cremer C. Super-resolution binding activated localization microscopy through reversible change of DNA conformation. *Nucleus.* 2018 01;9(1):182–9.
63. Dean A. In the loop: long range chromatin interactions and gene regulation. *Brief Funct Genomics.* 2011 Jan;10(1):3–10.
64. Phillips JE, Corces VG. CTCF: master weaver of the genome. *Cell.* 2009 Jun 26;137(7):1194–211.
65. Pliss A, Fritz AJ, Stojkovic B, Ding H, Mukherjee L, Bhattacharya S, et al. Non-random Patterns in the Distribution of NOR-bearing Chromosome Territories in Human Fibroblasts: A Network Model of Interactions. *J Cell Physiol.* 2015 Feb;230(2):427–39.
66. McStay B. Nucleolar organizer regions: genomic ‘dark matter’ requiring illumination. *Genes Dev.* 2016 Jul 15;30(14):1598–610.
67. Lomvardas S, Barnea G, Pisapia DJ, Mendelsohn M, Kirkland J, Axel R. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell.* 2006 Jul 28;126(2):403–13.
68. Thévenin A, Ein-Dor L, Ozery-Flato M, Shamir R. Functional gene groups are concentrated within chromosomes, among chromosomes and in the nuclear space of the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2014 Sep;42(15):9854–61.
69. Iyer KV, Maharana S, Gupta S, Libchaber A, Tlusty T, Shivashankar GV. Modeling and experimental methods to probe the link between global transcription and spatial organization of chromosomes. *PLoS One.* 2012;7(10):e46628.
70. Maharana S, Iyer KV, Jain N, Nagarajan M, Wang Y, Shivashankar GV. Chromosome intermingling-the physical basis of chromosome organization in differentiated cells. *Nucleic Acids Res.* 2016 Mar 2;
71. Capurso D, Bengtsson H, Segal MR. Discovering hotspots in functional genomic data superposed on 3D chromatin configuration reconstructions. *Nucleic Acids Res.* 2016 Mar 18;44(5):2028–35.
72. Zhu Y, Chen Z, Zhang K, Wang M, Medovoy D, Whitaker JW, et al. Constructing 3D interaction maps from 1D epigenomes. *Nat Commun.* 2016 Mar 10;7(1):10812.
73. Belyaeva A, Venkatachalapathy S, Nagarajan M, Shivashankar GV, Uhler C. Network

- analysis identifies chromosome intermingling regions as regulatory hotspots for transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Dec 26;114(52):13714–9.
74. Khrameeva EE, Mironov AA, Fedonin GG, Khaitovich P, Gelfand MS. Spatial Proximity and Similarity of the Epigenetic State of Genome Domains. *PLOS ONE*. 2012 Apr 4;7(4):e33947.
75. Feuerborn A, Cook PR. Why the activity of a gene depends on its neighbors. *Trends Genet*. 2015 Sep;31(9):483–90.
76. Wang Y, Jain N, Nagarajan M, Maharana S, Iyer KV, Talwar S, et al. Coupling between chromosome intermingling and gene regulation during cellular differentiation. *Methods*. 2017 Jul 1;123:66–75.
77. Bártová E, Krejčí J, Hájek R, Harnicarová A, Kozubek S. Chromatin structure and epigenetics of tumour cells: a review. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2009 Mar;9(1):51–61.
78. Meaburn KJ, Misteli T, Soutoglou E. Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol*. 2007 Feb;17(1):80–90.
79. Wijchers PJ, de Laat W. Genome organization influences partner selection for chromosomal rearrangements. *Trends Genet*. 2011 Feb;27(2):63–71.
80. Gollin SM. Mechanisms leading to nonrandom, nonhomologous chromosomal translocations in leukemia. *Semin Cancer Biol*. 2007 Feb;17(1):74–9.
81. Zhao R, Bodnar MS, Spector DL. Nuclear neighborhoods and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 2009 Apr;19(2):172–9.
82. Kuroda M, Tanabe H, Yoshida K, Oikawa K, Saito A, Kiyuna T, et al. Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation. *J Cell Sci*. 2004 Nov 15;117(Pt 24):5897–903.
83. Soutoglou E, Dorn JF, Sengupta K, Jasin M, Nussenzweig A, Ried T, et al. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Jun;9(6):675–82.
84. Neves H, Ramos C, da Silva MG, Parreira A, Parreira L. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood*. 1999 Feb 15;93(4):1197–207.
85. Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, Parada LA, Misteli T. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet*. 2003 Jul;34(3):287–91.
86. Osborne CS, Chakalova L, Mitchell JA, Horton A, Wood AL, Bolland DJ, et al. Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol*. 2007 Aug;5(8):e192.
87. Chiarle R, Zhang Y, Frock RL, Lewis SM, Molinie B, Ho YJ, et al. Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells. *Cell*. 2011 Sep 30;147(1):107–19.
88. Mani RS, Tomlins SA, Callahan K, Ghosh A, Nyati MK, Varambally S, et al. Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science*. 2009 Nov 27;326(5957):1230.

89. Mathas S, Kreher S, Meaburn KJ, Jöhrens K, Lamprecht B, Assaf C, et al. Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Apr 7;106(14):5831–6.
90. Lin C, Yang L, Tanasa B, Hutt K, Ju B gun, Ohgi K, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell*. 2009 Dec 11;139(6):1069–83.
91. Klein IA, Resch W, Jankovic M, Oliveira T, Yamane A, Nakahashi H, et al. Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell*. 2011 Sep 30;147(1):95–106.
92. Hakim O, Resch W, Yamane A, Klein I, Kieffer-Kwon KR, Jankovic M, et al. DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes. *Nature* [Internet]. 2012 Feb 7 [cited 2012 Mar 4]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22314321>
93. Zhang Y, McCord RP, Ho YJ, Lajoie BR, Hildebrand DG, Simon AC, et al. Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations. *Cell*. 2012 Mar 2;148(5):908–21.
94. Kozubek S, Lukášová E, Marecková A, Skalníková M, Kozubek M, Bártová E, et al. The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias. *Chromosoma*. 1999 Dec;108(7):426–35.
95. Lukášová E, Kozubek S, Kozubek M, Kjeronská J, Rýznar L, Horáková J, et al. Localisation and distance between ABL and BCR genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukaemia. *Hum Genet*. 1997 Oct;100(5–6):525–35.
96. DeVita Jr VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, DePinho RA, Weinberg RA, editors. DeVita, Hellman, and Rosenberg's *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (Cancer: Principles & Practice. Ninth, North American Edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 2800 p.
97. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000 Nov 15;96(10):3343–56.
98. Fundia AF, Acevedo SH, Larripa IB. Chromosomal instability in chronic myeloid leukemia: Philadelphia breakpoints are irrespective to spontaneous breakage and fragile sites. *Haematologica*. 2000 Oct;85(10):1104–6.
99. Maru Y. Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2001 Apr;73(3):308–22.
100. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1619–30.
101. Hurtado, R, Vargas, P, Cortes, J. Chronic Myeloid Leukemia Current Concepts in Physiopathology and Treatment. *Cancerología*. 2007 Jun;2(2):137–47.
102. Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. *Blood*. 2017 Mar 23;129(12):1595–606.
103. Deininger MW, Shah NP, Altman JK, Berman E, Bhatia R, Bhatnagar B, et al. Chronic Myeloid Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of*

the National Comprehensive Cancer Network. 2020 Oct 1;18(10):1385–415.

104. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020 Apr;34(4):966–84.

105. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology*. 2020;95(6):691–709.

106. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *American Journal of Hematology*. 2018;93(3):442–59.

107. Westerweel PE, te Boekhorst PAW, Levin MD, Cornelissen JJ. New Approaches and Treatment Combinations for the Management of Chronic Myeloid Leukemia. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2019 [cited 2022 Feb 2];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00665>

108. Cortes JE, Gambacorti-Passerini C, Deininger MW, Mauro MJ, Chuah C, Kim DW, et al. Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *J Clin Oncol*. 2018 Jan 20;36(3):231–7.

109. Hochhaus A, Saglio G, Hughes TP, Larson RA, Kim DW, Issaragrisil S, et al. Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia*. 2016 May;30(5):1044–54.

110. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boqué C, et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. *J Clin Oncol*. 2016 Jul 10;34(20):2333–40.

111. García-Gutiérrez V, Hernández-Boluda JCC. Current Treatment Options for Chronic Myeloid Leukemia Patients Failing Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors. *J Clin Med*. 2020 Jul 15;9(7).

112. Braun TP, Eide CA, Druker BJ. Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. *Cancer Cell*. 2020 Apr 13;37(4):530–42.

113. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2017 Mar 9;376(10):917–27.

114. Cortes J, Rousselot P, Kim DW, Ritchie E, Hamerschlak N, Coutre S, et al. Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood*. 2007 Apr 15;109(8):3207–13.

115. Guilhot F, Apperley J, Kim DW, Bullorsky EO, Baccarani M, Roboz GJ, et al. Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4143–50.

116. Hochhaus A, Kantarjian HM, Baccarani M, Lipton JH, Apperley JF, Druker BJ, et al. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2303–9.

117. Kantarjian H, Cortes J, Kim DW, Dorlhiac-Llacer P, Pasquini R, DiPersio J, et al. Phase 3 study of dasatinib 140 mg once daily versus 70 mg twice daily in patients with chronic myeloid

leukemia in accelerated phase resistant or intolerant to imatinib: 15-month median follow-up. *Blood*. 2009 Jun 18;113(25):6322–9.

118. Deininger MW, Kopecky KJ, Radich JP, Kamel-Reid S, Stock W, Paietta E, et al. Imatinib 800 mg daily induces deeper molecular responses than imatinib 400 mg daily: results of SWOG S0325, an intergroup randomized PHASE II trial in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2014;164(2):223–32.

119. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med*. 2006 Jun 15;354(24):2542–51.

120. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, Bhalla K, Alimena G, Palandri F, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3540–6.

121. Moslehi JJ, Deininger M. Tyrosine Kinase Inhibitor-Associated Cardiovascular Toxicity in Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2015 Dec 10;33(35):4210–8.

122. Khoury HJ, Cortes JE, Kantarjian HM, Gambacorti-Passerini C, Baccarani M, Kim DW, et al. Bosutinib is active in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib and dasatinib and/or nilotinib therapy failure. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3403–12.

123. Brümmendorf TH, Cortes JE, de Souza CA, Guilhot F, Duvillié L, Pavlov D, et al. Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukaemia: results from the 24-month follow-up of the BELA trial. *British Journal of Haematology*. 2015;168(1):69–81.

124. O'Hare T, Eide CA, Deininger MWN. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2242–9.

125. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, et al. AP24534, a Pan-BCR-ABL Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance. *Cancer Cell*. 2009 Nov 3;16(5):401–12.

126. Cortes J, Talpaz M, Bixby D, Deininger M, Shah N, Flinn IW, et al. A Phase 1 Trial of Oral Ponatinib (AP24534) In Patients with Refractory Chronic Myelogenous Leukemia (CML) and Other Hematologic Malignancies: Emerging Safety and Clinical Response Findings. *Blood*. 2010 Nov 19;116(21):210.

127. Lipton JH, Chuah C, Guerzi-Bresler A, Rosti G, Simpson D, Assouline S, et al. Ponatinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukaemia: an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2016 May 1;17(5):612–21.

128. Kantarjian HM, Deininger MW, Abruzzese E, Apperley J, Cortes JE, Chuah C, et al. Efficacy and Safety of Ponatinib (PON) in Patients with Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia (CP-CML) Who Failed One or More Second-Generation (2G) Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs): Analyses Based on PACE and Optic. *Blood*. 2020 Nov 5;136:43–4.

129. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001 Aug 3;293(5531):876–80.

130. White DL, Dang P, Engler J, Frede A, Zrim S, Osborn M, et al. Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 1;28(16):2761–7.
131. Agrawal M, Hanfstein B, Erben P, Wolf D, Ernst T, Fabarius A, et al. MDR1 expression predicts outcome of Ph+ chronic phase CML patients on second-line nilotinib therapy after imatinib failure. *Leukemia*. 2014 Jul;28(7):1478–85.
132. Eiring AM, Deininger MW. Individualizing kinase-targeted cancer therapy: the paradigm of chronic myeloid leukemia. *Genome Biol*. 2014 Sep 17;15(9):461.
133. Kim T, Tyndel MS, Zhang Z, Ahn J, Choi S, Szardenings M, et al. Exome sequencing reveals DNMT3A and ASXL1 variants associate with progression of chronic myeloid leukemia after tyrosine kinase inhibitor therapy. *Leukemia Research*. 2017 Aug 1;59:142–8.
134. Branford S, Wang P, Yeung DT, Thomson D, Purins A, Wadham C, et al. Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease. *Blood*. 2018 Aug 30;132(9):948–61.
135. Giotopoulos G, van der Weyden L, Osaki H, Rust AG, Gallipoli P, Meduri E, et al. A novel mouse model identifies cooperating mutations and therapeutic targets critical for chronic myeloid leukemia progression. *J Exp Med*. 2015 Sep 21;212(10):1551–69.
136. Wang Y, Cai D, Brendel C, Barrett C, Erben P, Manley PW, et al. Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR/ABL+ progenitors via JAK-2/STAT-5 pathway activation. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):2147–55.
137. Schmidt T, Masouleh BK, Loges S, Cauwenberghs S, Fraisl P, Maes C, et al. Loss or Inhibition of Stromal-Derived PIGF Prolongs Survival of Mice with Imatinib-Resistant Bcr-Abl1+ Leukemia. *Cancer Cell*. 2011 Jun 14;19(6):740–53.
138. Traer E, Javidi-Sharifi N, Agarwal A, Dunlap J, English I, Martinez J, et al. Ponatinib overcomes FGF2-mediated resistance in CML patients without kinase domain mutations. *Blood*. 2014 Mar 6;123(10):1516–24.
139. Galinsky I, Buchanan S. Guide to interpreting disease responses in chronic myeloid leukemia. *J Adv Pract Oncol*. 2012 Jul;3(4):225–36.
140. Zhang WW, Cortes JE, Yao H, Zhang L, Reddy NG, Jabbour E, et al. Predictors of primary imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia are distinct from those in secondary imatinib resistance. *J Clin Oncol*. 2009 Aug 1;27(22):3642–9.
141. McGowan-Jordan, Jean, Hastings, Ros RJ, Moore, S. *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*. Karger; 2020. 145 p.
142. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):4793–807.
143. Fialkow PJ. Chronic Myelocytic Leukemia: Origin of some lymphocytes from leukemic stem cells. *J Clin Invest*. 1978 Oct 1;62(4):815–23.
144. Wang Y, Nagarajan M, Uhler C, Shivashankar GV. Orientation and repositioning of chromosomes correlate with cell geometry-dependent gene expression. *MBoC*. 2017 Jun 14;28(14):1997–2009.

145. Ye CJ, Stilgenbauer L, Moy A, Liu G, Heng HH. What Is Karyotype Coding and Why Is Genomic Topology Important for Cancer and Evolution? *Front Genet.* 2019;10:1082.
146. Taberlay PC, Achinger-Kawecka J, Lun ATL, Buske FA, Sabir K, Gould CM, et al. Three-dimensional disorganization of the cancer genome occurs coincident with long-range genetic and epigenetic alterations. *Genome Res.* 2016 Jun;26(6):719–31.
147. Akdemir KC, Le VT, Chandran S, Li Y, Verhaak RG, Beroukhim R, et al. Disruption of chromatin folding domains by somatic genomic rearrangements in human cancer. *Nature Genetics.* 2020 Mar;52(3):294–305.
148. Zhou Y, Gerrard DL, Wang J, Li T, Yang Y, Fritz AJ, et al. Temporal dynamic reorganization of 3D chromatin architecture in hormone-induced breast cancer and endocrine resistance. *Nature Communications.* 2019 Apr 3;10(1):1522.
149. Mora-Bermúdez F, Ellenberg J. Measuring structural dynamics of chromosomes in living cells by fluorescence microscopy. *Methods.* 2007 Feb;41(2):158–67.
150. Uhler C, Shivashankar GV. Chromosome Intermingling: Mechanical Hotspots for Genome Regulation. *Trends in Cell Biology.* 2017 Nov 1;27(11):810–9.
151. Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem.* 2008 Aug;56(8):711–21.
152. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011 Mar;21(3):381–95.
153. Wu R, Terry AV, Singh PB, Gilbert DM. Differential Subnuclear Localization and Replication Timing of Histone H3 Lysine 9 Methylation States. *MBoC.* 2005 Jun 1;16(6):2872–81.
154. Harewood L, Schütz F, Boyle S, Perry P, Delorenzi M, Bickmore WA, et al. The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression. *Genome Res.* 2010 May;20(5):554–64.
155. Snow KJ, Wright SM, Woo Y, Titus LC, Mills KD, Shopland LS. Nuclear positioning, higher-order folding, and gene expression of Mmu15 sequences are refractory to chromosomal translocation. *Chromosoma.* 2011 Feb;120(1):61–71.
156. van Steensel B, Belmont AS. Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell.* 2017 May 18;169(5):780–91.
157. Mangan H, Gailín MÓ, McStay B. Integrating the genomic architecture of human nucleolar organizer regions with the biophysical properties of nucleoli. *The FEBS Journal.* 2017;284(23):3977–85.
158. Meaburn KJ, Gudla PR, Khan S, Lockett SJ, Misteli T. Disease-specific gene repositioning in breast cancer. *J Cell Biol.* 2009 Dec 14;187(6):801–12.
159. Torabi K, Wangsa D, Ponsa I, Brown M, Bosch A, Vila-Casadesús M, et al. Transcription-dependent radial distribution of TCF7L2 regulated genes in chromosome territories. *Chromosoma.* 2017;126:655–67.
160. Paz N, Felipe-Blanco I, Royo F, Zabala A, Guerra-Merino I, García-Orad Á, et al. Expression of the DYRK1A gene correlates with its 3D positioning in the interphase nucleus of Down syndrome cells. *Chromosome Res.* 2015 Jun 1;23(2):285–98.

161. Agmon N, Liefshitz B, Zimmer C, Fabre E, Kupiec M. Effect of nuclear architecture on the efficiency of double-strand break repair. *Nature Cell Biology*. 2013 Jun;15(6):694–9.
162. Karakaidos P, Karagiannis D, Rampias T. Resolving DNA Damage: Epigenetic Regulation of DNA Repair. *Molecules*. 2020 Jan;25(11):2496.
163. Labardini Méndez JR, Cervera Ceballos E, Galván Salazar G, Corrales Alfaro C, Balbuena Martínez M. Leucemia Ganulocítica Crónica. *Cancerología*. 2011;6:107–10.
164. Assouline S, Lipton JH. Monitoring response and resistance to treatment in chronic myeloid leukemia. *Curr Oncol*. 2011 Apr;18(2):e71-83.
165. Falchi L, Appolloni V, Ferranti L, Marina A. The Value of Molecular Response in Chronic Myeloid Leukemia: The Present and the Future. In: Koschmieder S, editor. *Myeloid Leukemia - Clinical Diagnosis and Treatment* [Internet]. InTech; 2012 [cited 2013 Oct 6]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/myeloid-leukemia-clinical-diagnosis-and-treatment/the-value-of-molecular-response-in-chronic-myeloid-leukemia-the-present-and-the-future>
166. Irvine DA, Heaney NB, Holyoake TL. Optimising chronic myeloid leukaemia therapy in the face of resistance to tyrosine kinase inhibitors--a synthesis of clinical and laboratory data. *Blood Rev*. 2010 Jan;24(1):1–9.
167. Breccia M, Alimena G. The significance of early, major and stable molecular responses in chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011 Aug;79(2):135–43.
168. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol*. 2012 Nov;87(11):1037–45.
169. Cutler C, Antin JH. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review. *Stem Cells*. 2001;19(2):108–17.
170. Fagundo J, Carlos J, Dorticós Balea E, Pavón Morán V, Cortina Rosales L. Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas: tipos, fuentes e indicaciones. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2004 Aug;20(2):0–0.