



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**Variación en la Distribución de los Territorios
Cromosómicos 9 y 22 en linfocitos obtenidos a
partir de sangre periférica**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Licenciado en Investigación Biomédica
Básica**

P R E S E N T A:

DAVID GREGORIO VALLEJO ESCAMILLA

**Director de Tesis:
Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	5
INTRODUCCIÓN	6
CROMOSOMA	6
ORIGEN HISTÓRICO DEL CONCEPTO	6
UNIDAD DE HERENCIA: TEORÍAS DE HERENCIA	9
ORGANIZACIÓN DE LOS CROMOSOMAS EN INTERFASE: TERRITORIOS CROMOSÓMICOS (TCs)	10
HIPÓTESIS DE LOS TCs	10
EVIDENCIA EXPERIMENTAL DE LA EXISTENCIA DE LOS TCs.....	12
CONCEPTO DE TC	16
MODELOS DE ARQUITECTURA NUCLEAR BASADOS EN TCs	18
ORGANIZACIÓN DE LOS TCs.....	21
ESTRUCTURA DE LOS TCs.....	24
PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE LOS TCs EN DIFERENTES TIPOS CELULARES.....	25
CONSERVACIÓN EVOLUTIVO DE LOS PATRONES EN TCs.....	27
RELEVANCIA DEL ESTUDIO DE LOS TCs 9 Y 22	28
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS.....	31
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
METODOLOGÍA	33
OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE PERIFÉRICA	33

SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES POR GRADIENTE DE FICOLL	33
HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> CON FLUORESCENCIA TRIDIMENSIONAL (3D-FISH)	35
CÉLULAS, PROCESO DE FIJACIÓN Y PRE-TRATAMIENTO	35
SONDAS E HIBRIDACIÓN	36
LAVADOS POST-HIBRIDACIÓN	36
ADQUISICIÓN DE IMÁGENES.....	37
MICROSCOPIA DE ILUMINACIÓN ESTRUCTURADA (SIM)	37
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
<u>RESULTADOS</u>	<u>40</u>
OBTENCIÓN DE IMÁGENES	40
OBTENCIÓN DE IMÁGENES POR MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA.....	40
OBTENCIÓN DE IMÁGENES POR SIM.....	40
RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL DE LAS IMÁGENES	42
DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO NUCLEAR	43
CUANTIFICACIÓN DE DISTANCIAS ENTRE LOS TCS 9 Y 22.....	45
NORMALIZACIÓN DE LAS DISTANCIAS ENTRE LOS TCS 9 Y 22 RESPECTO AL TAMAÑO NUCLEAR.....	47
CUANTIFICACIÓN Y COMPARACIÓN DE LAS DISTANCIAS ENTRE TCS 9 Y 22 INTRA E INTER- INDIVIDUO.....	48
POSICIÓN RELATIVA DE LOS TCS DENTRO DEL NÚCLEO	53
<u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN</u>	<u>56</u>
<u>ANEXOS.....</u>	<u>65</u>
ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO	72
ABREVIATURAS DE MEDIDAS Y REACTIVOS.....	74
GLOSARIO	75
<u>REFERENCIAS</u>	<u>79</u>

Resumen

Los cromosomas, tanto en animales como en plantas, ocupan un territorio discreto dentro del núcleo, denominados territorios cromosómicos (TCs). Los TCs se distribuyen en orden distinto en cada tipo celular. Estas diferencias en la organización podrían influir en dos fenómenos celulares: la diferenciación celular y la frecuencia de re-arreglos cromosómicos de cada tipo celular. Este último es relevante para enfermedades derivadas de aberraciones cromosómicas, por ejemplo, la leucemia mieloide crónica (LMC). La LMC tiene una relación directa con la presencia de la translocación *BCR- ABL* entre los cromosomas 9 y 22 en linfocitos. Diversos estudios demostraron que, específicamente en este tipo celular, los cromosomas 9 y 22 se encuentran muy cercanos o, incluso, en aparente contacto(1–3). Aunque conocemos la distribución de los TCs en linfocitos, no conocemos si ésta puede variar de una persona a otra. Es posible que variaciones en la distancia entre TCs afecten, de forma negativa o positiva, la probabilidad de generar aberraciones cromosómicas. Estas variaciones podrían brindar una nueva perspectiva en lo que nos diferencia como individuos. El trabajo desarrollado a continuación tuvo los siguientes objetivos: comprobar la existencia de variaciones en la distancia entre TCs y cuantificar estas variaciones entre diferentes individuos como un primer acercamiento a estudios posteriores sobre los posibles efectos de estas variaciones. Las muestras de sangre periférica las obtuvimos de 4 individuos sanos. Posteriormente, la fase blanca de las muestras fue procesada mediante la técnica de 3D-Fish para la hibridación de las sondas específicas de los cromosomas 9 (verde) y 22 (naranja). Las imágenes del proyecto fueron capturadas en Z-stack para reconstruir el núcleo de las células. Nuestras imágenes muestran una posición más variable para el TC 9 y una posición más conservada para el TC 22, tanto entre las células de un mismo individuo como entre individuos. Además, nuestras mediciones muestran diferencias en la distancia entre los TCs 9 y 22 entre dos individuos del estudio. Como conclusión, nuestros resultados sugieren la existencia de heterogeneidad en la distribución de los TCs 9 y 22 entre sujetos de una misma especie.

Abstract

Chromosomes, in plants and animals, occupy a delimited territory inside the nucleus, denominated chromosome territories (CTs). TCs are organized in different patterns for each cellular type. These differences in the patterns could affect two cellular mechanisms: the cell differentiation and the frequency of chromosomal rearrangements in each cellular type. The last one may be relevant for diseases derived from chromosomal aberrations, like Chronic Myeloid Leukemia (CML). CML is directly related to the presence of the *BCR-ABL* translocation between chromosomes 9 and 22 in lymphocytes. Several studies have shown that, specifically in this cell type, chromosomes 9 and 22 are very close or even in apparent contact (1-3). Although we know the distribution of the TCs in lymphocytes, we do not know if this may vary from one person to another. It is possible that variations in the distance between TCs affect, negatively or positively, the probability of generating chromosomal aberrations. These variations could provide a new perspective on what differentiates us as individuals. Our project had the following objectives: to verify the existence of variations in the distance between TCs and to quantify these variations between different individuals as a first approach to subsequent studies. Peripheral blood samples were obtained from 4 healthy individuals. Subsequently, the white phase of the samples was processed using the 3D-Fish technique for the hybridization of the specific probes of chromosomes 9 (green) and 22 (orange). The images of the project were captured in Z-stack to reconstruct the nucleus of the cells. Our images show a more variable position for CT 9 and a more conserved position for TC 22, both between the cells of the same individual and between individuals. In addition, our measurements show differences in the distance between TCs 9 and 22 of two subjects of the study. In conclusion, our results suggest the existence of heterogeneity in the distribution of TCs 9 and 22 between subjects of the same species.

Índice de Tablas y Figuras

Figura/Tabla	Figura	Sección
Figura No. 1	Dibujos del proceso de mitosis de Walther Flemming	Antecedentes
Figura No. 2	Esquema de la Genealogía de la célula durante el desarrollo de <i>Ascaris nigrovenosa</i>	Antecedentes
Figura No. 3	Modelo de Boveri de un TC (1909). Embrión de <i>Ascaris megalocephala univales</i> (1909)	Antecedentes
Figura No. 4	Esquema del concepto experimental de los hermanos Cremer (1981)	Antecedentes
Figura No. 5	Primeras imágenes del FISH del cromosoma 7 en linfocitos humanos (1988)	Antecedentes
Figura No. 6	Modelo de TCs de Zirbel (1993)	Antecedentes
Figura No. 7	Modelo actualizado de la arquitectura nuclear de Cremer (2006)	Antecedentes
Figura No. 8	Esquema representativo de la posición radial y relativa	Antecedentes
Figura No. 9	Distribución Radial de los TCs 1 y 5 en 6 diferentes individuos	Antecedentes
Figura No. 10	Imagen representativa de FISH Multicolor (mFISH) y Matriz de Interacción	Antecedentes
Figura No. 11	Reconstrucción 3D de FISH Multicolor (mFISH) en MCF10A y Matriz de Interacción	Antecedentes

Figura No. 12	Reconstrucciones de TCs en humanos, grandes simios y el gibón de manos blancas	Antecedentes
Figura No. 13	Posiciones relativas de los TCs en células NHBE	Antecedentes
Figura No. 14	Principios de la Microscopía de Iluminación Estructurada	Metodología
Figura No. 15	Esquema de la Metodología	Metodología
Figura No. 16	Imágenes representativas del método de captura y procesamiento tridimensional del Individuo A (izquierda) y B (derecha)	Resultados
Figura No. 17	Imágenes representativas del método de cuantificación del tamaño nuclear y las distancias entre TCs	Resultados
Figura No. 18	Gráfica de la distribución de las medidas de diámetro nuclear por individuo	Resultados
Figura No. 19	Imagen y tabla de la cuantificación de las distancias entre los TCs 9 y 22	Resultados
Figura No. 20	Gráfica de la distribución de la distancia en μm y normalizada entre TCs 9:9 por individuo	Resultados
Figura No. 21	Gráfica de la distribución de la distancia en μm y normalizada entre TCs 22:22 por individuo	Resultados
Figura No. 22	Gráfica de la distribución de la distancia en μm y normalizada entre TCs 9:22 por individuo	Resultados
Figura No. 23	Gráfica de la distribución de la distancia más corta entre los TCs 9:22 en μm y normalizada	Resultados

Figura No. 24	Gráfica de la distribución de la distancia entre los TCs 9 y el Centro del Núcleo en μm y normalizada	Resultados
Figura No. 25	Gráfica de la distribución de la distancia entre los TCs 22 y el Centro del Núcleo en μm y normalizada	Resultados
Tabla No. 1	Comparación de estudios sobre la presencia del transcrito <i>bcr-abl</i> en muestras de individuos sanos	Antecedentes
Tabla No. 2	Variables Estadísticas de las células mononucleares de cada Individuo	Resultados
Tabla No. 3	Variables estadísticas de las distancias entre TCs por individuo	Resultados
Tabla No. 4	Normalización de las distancias con relación al tamaño nuclear de cada individuo	Resultados
Tabla No. 5	Variables de las distancias al Centro del Núcleo	Resultados

Introducción

Cromosoma

Origen Histórico del Concepto

El concepto de los cromosomas es previo al descubrimiento de los mismos. Fue común que los científicos propusieran su existencia a partir de la observación de fenómenos macroscópicos, sin evidencia directa (4). Fue hasta el año 1873, que los cromosomas son observados por primera vez y, junto con ello, ocurre una modificación en el paradigma científico de la época (5).

En 1873, Anton Schneider observó y describió el comportamiento de filamentos nucleares (cromosomas) durante la división celular del platelminto *Mesostoma*. Aunque sus estudios se enfocan a la descripción anatómica y desarrollo del organismo, sus observaciones representan el primer estudio formal del proceso de división celular. En su publicación Schneider describe que, previo a la división de la célula, la membrana nuclear desaparece y el sitio donde se ubicaba el núcleo es ahora sólo un espacio claro dentro de la célula; sin embargo, al tratar a la célula con ácido acético, se revela una masa de fibras curvas en este sitio aparentemente vacío. Estas fibras curvas (los cromosomas) se alinean en el centro de la célula y se vuelven más numerosas hasta, finalmente, la separación de la célula en dos células hijas (5). Esta secuencia más compleja de eventos se definió como división nuclear indirecta (5,6). La descripción de este mecanismo se oponía al modelo de la época en el cual el núcleo se dividía por la mitad en un proceso similar al del citoplasma.

A pesar del trabajo de Schneider, estas fibras nucleares fueron consideradas un artefacto del mismo procedimiento por el cual se volvían visibles. Otros científicos contemporáneos exigieron comprobar la existencia de estas fibras en un modelo *in vivo* para dar soporte a la división nuclear indirecta.

Entre los años 1874 y 1876, Flemming da el nombre de *mitosis* al proceso de división celular indirecta y lo estudia, con aún más detalle, en muestras teñidas de aletas y agallas de salamandra. Con base en estos resultados, en 1882 publica su

libro *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* (“Substancia Celular, Núcleo y División Celular”) el cual se convierte en el libro de referencia en el estudio de la mitosis. Su metodología le permitió reconocer fibras nucleares teñibles a las que definió como *Chromatin* (“cromatina”) y denominó a la mitosis como el proceso de organización y distribución de la cromatina. Posteriormente, en 1888, Heinrich Wilhelm Waldeyer acuña el término de *Chromosom* (“cromosoma”) para referirse a las fibras nucleares de Flemming. (5,7,8). Estudios posteriores aportaron la evidencia suficiente para validar a la mitosis como el proceso de división celular canónico (Fig. 1).

Tras la validación de la mitosis, resultó crucial entender por qué existe un proceso tan complejo, en lugar de una simple división de la masa nuclear como se hipotetizaba anteriormente. En 1884, Wilhelm Roux propone que este proceso es necesario por dos razones:

1. La mitosis refleja un mecanismo que permite la división del núcleo no sólo por su masa, sino por sus cualidades individuales (6)

Sin conocer de la existencia de los genes o atribuir a los cromosomas con la capacidad de herencia, él propone una idea nueva de la individualidad cromosómica.

2. Debe existir una inmensa variedad de cualidades entre las fibras nucleares y, la célula requiere de la segregación balanceada de éstas para mantener la viabilidad e identidad celular de las células hijas (6).

De acuerdo con Roux, la división nuclear contrasta con la división citoplasmática por estas mismas propiedades, ya que dentro del citoplasma sólo existen componentes repetitivos sin diferencias cualitativas. Esta es la primera ocasión, que se propone una diversidad funcional entre los cromosomas, una idea poco aceptada por la aparente homogeneidad física de la masa nuclear. Debido a que sus propuestas se basaron en especulaciones derivadas del mecanismo y no a la

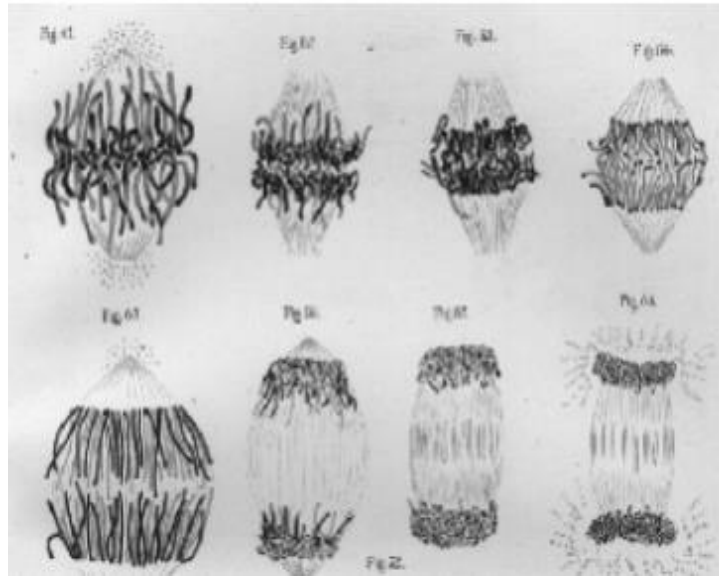


Figura 1. Dibujos del proceso de mitosis de Walther Flemming.
 Tomada de las capturas digitales del artículo de F. C. W. Vogel, Leipzig, de 1882.

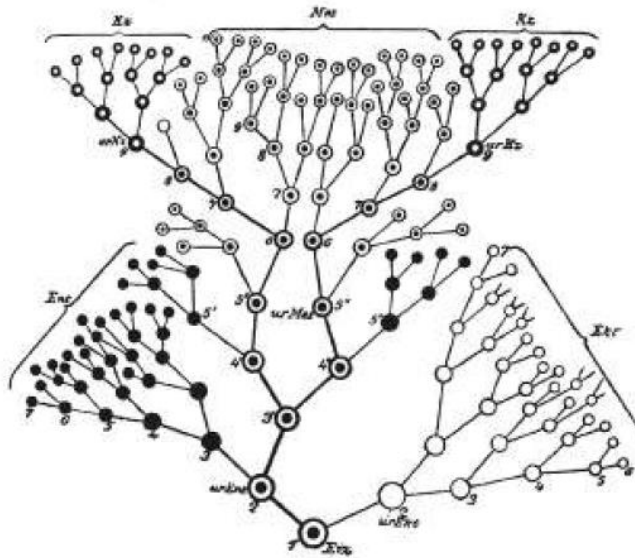


Figura 2. Esquema de la genealogía de la célula durante el desarrollo de *Ascaris nigrovenosa*.
 Tomada de las capturas digitales del artículo de Weismann de 1892.

existencia de evidencia de estas diferencias cualitativas, sus ideas fueron rechazadas.

Unidad de Herencia: Teorías de Herencia

La definición del material de herencia celular fue un tema en desarrollo y continua discusión durante los años 1890. August Weismann comenzó a analizar la evidencia en favor de los cromosomas como los portadores del material de herencia. Para 1893 propone a los cromosomas como los portadores del material de herencia y nombra a este material como *plasma germinal*. Según su teoría, el plasma germinal es el material base sobre el cual se desarrollan nuevas células y es exclusivo de células germinales. Estas características permitían la continuidad inmutable de una generación a otra.

Dentro de su teoría, incluye una explicación para la diferenciación celular. De acuerdo con Weismann, los cromosomas estaban constituidos por pequeños bloques denominados *ids*. Los ids consisten en una fracción heredable proveniente de un solo ancestro. Estos ids contienen '*determinantes*' los cuales migran del núcleo al citoplasma y así, generan la diferenciación celular. Cada tipo celular sería dependiente de la acción de sus ids y determinantes. La diferenciación celular, siguiendo estas reglas, sería un reflejo de la reducción en la complejidad de los ids presentes en el núcleo de cada célula. Sólo las células germinales contienen todos los ids y determinantes, el resto de las células presentan una reducción del material a medida que se diferencian hasta llegar a los ids mínimos necesarios (Fig. 2). Si los cromosomas funcionaran de esta forma, bastaría con un id, que representa la fracción heredable de un solo ancestro, para dar forma y función a una célula, una célula ancestral. Cabe resaltar que, a partir de la teoría de Weismann, no incluye la transmisión de características adquiridas durante la vida de un individuo a sus descendientes (6).

Dentro del estudio de los cromosomas, un aspecto que interesó a muchos fue el mantenimiento del número de cromosomas de una generación a otra. En 1885, Carl Rabl estudió el número y la organización de los cromosomas en células mitóticas

de *Salamandra maculata*. Él contó el número de cromosomas que observaba en cada división en la búsqueda de un número constante de cromosomas o una regla de la división. Aunque no siempre fue capaz de distinguir entre un cromosoma y otro en la mayoría de sus células, nunca contó más de 24 cromosomas en células epiteliales y células del tejido conectivo. Con base en este resultado, propuso una ley para un número constante de cromosomas para cada tipo celular. En contraste con Rabl, Flemming aseguró que no existía tal ley, ya que él mismo había contado el número de cromosomas en células epiteliales y, desde un principio, *notó que no existía un número constante de cromosomas de una célula a otra* (6). A partir de los mismos experimentos, Rabl llegó a una segunda conclusión, en el comienzo y al final de la mitosis existe un patrón polarizado de los cromosomas. Las regiones que forman el centrómero se agrupan en un polo del núcleo, mientras que las extensiones de los cromosomas se agrupan en el polo opuesto. Por lo que, concluye que parte de la estructura de los cromosomas durante la mitosis se conserva durante la interfase y forma distintos dominios con el mismo patrón polarizado que se observa durante el inicio y el final de la mitosis. Las hipótesis de Rabl, el número constante de cromosomas y la continuidad de los cromosomas durante la interfase, representan un primer acercamiento en el estudio de la organización del núcleo durante la interfase. Además, en una propuesta menos conocida, describe un posible modelo para explicar la composición del núcleo en el cual los cromosomas eran las fibras primarias a partir de las cuales se generan fibras secundarias y terciarias que lleva a la formación de una red de cromatina que, al expandirse, ocupa el espacio nuclear (6,9).

Organización de los Cromosomas: Territorios Cromosómicos (TCs)

Hipótesis de los TCs

La teoría de los TCs fue propuesta por primera vez en 1909 por Carl Rabl y Theodor Boveri. A partir de sus experimentos, ellos concluyeron que cada cromosoma en interfase ocupa un territorio nuclear distinto.

Los estudios de Boveri profundizaron en las propiedades individuales de los cromosomas y proporcionaron la primera teoría formal de los TCs. A partir de sus

estudios en nemátodos, obtuvo evidencia sobre su teoría de la individualidad de los cromosomas. En 1909, sintetizó sus conclusiones en un artículo llamado '*The blastomere nuclei of A. m. and the theory of chromosome individuality*' (*Los núcleos blastómeros de Ascaris megalocephala y la teoría de la individualidad cromosómica*). Es en esta publicación donde usó por primera vez el término *territorio cromosómico* (TC). Su hipótesis se basaba en que, al seguir los movimientos de un cromosoma durante la mitosis, se puede observar que se mantiene una organización similar y una posición mutua específica entre los cromosomas. Boveri afirmó que el cromosoma se transformaba en un TC en exactamente el mismo sitio donde se veía por última vez su contraparte mitótica (6,7). Incluso no se limita a proponer el concepto, sino que sugiere un posible aspecto funcional/patológico de los TCs. Si los TCs de dos cromosomas distintos se entrelazan durante la interfase y quedan interconectados, esto afectaría la segregación de los mismos durante la mitosis (Fig. 3 A). Otro de sus argumentos fue la similitud en las protuberancias nucleares que observó en células embrionarias del nemátodo *Ascaris megalocephala* (Fig. 3 B). Estas protuberancias le permitieron especular respecto a la existencia de una organización específica de los cromosomas durante la interfase. Si existía tal organización en la estructura del núcleo, debería atribuirse a un arreglo nuclear idéntico, ya que no existe comunicación entre estas células. Sin embargo, todas sus conclusiones se basaron en evidencia indirecta de la organización nuclear, evidencia poco aceptada por sus pares, sin embargo, una visualización directa de TCs en ese tiempo resultó imposible. Las ideas de Boveri son rechazadas, en su lugar, se apoya un modelo en el cual los cromosomas se disgregan en el núcleo durante la interfase y se agregaban de nuevo en forma de cromosomas al comenzar la mitosis.

El desarrollo de la teoría de herencia de Boveri junto con Walter Sutton marcó otro cambio en el pensamiento científico. Dicha teoría propone una explicación a la variación en el número de cromosomas y la diferencia en el tamaño y forma de estos. En ella se exponen dos postulados:

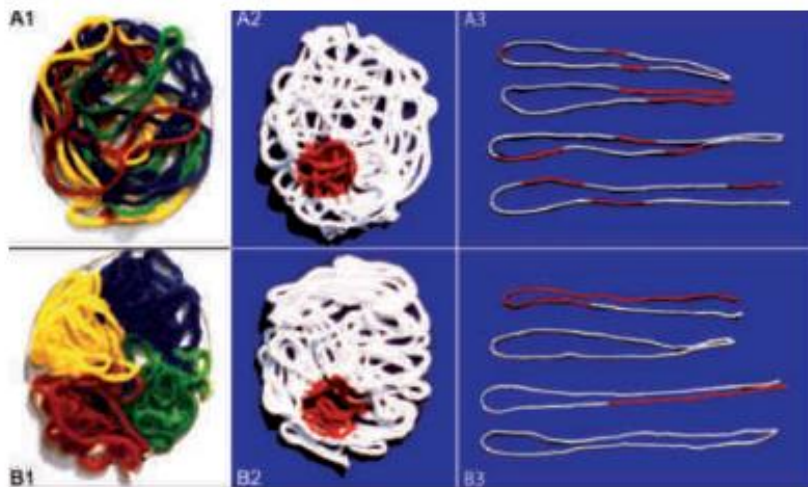
1. Cada cromosoma presenta una combinación única de genes. Esta combinación sólo puede repetirse en el cromosoma homólogo, pero difiere de cualquier otra combinación encontrada en cromosomas no homólogos.
2. La mitosis asegura que cada célula hija reciba el mismo número y la misma combinación de genes.

Aunque estos postulados no tienen una relación directa con la existencia de los TCs, ambos presentan complicaciones para el modelo en el cual los cromosomas se disuelven en una sola masa homogénea. La disgregación del material genético que conforma los TCs durante la interfase y, la condensación aleatoria de los mismos en cromosomas durante la mitosis resultaría en cambios en la distribución genética en cada nueva división. Es más simple, mantener una estructura y separación de los cromosomas durante la interfase, en lugar de, formarlos de nuevo en cada división celular (6,7). Aunque la teoría de Boveri-Sutton fue bien recibida en la comunidad científica, su concepto de TCs aún carecía de la evidencia necesaria para su validación.

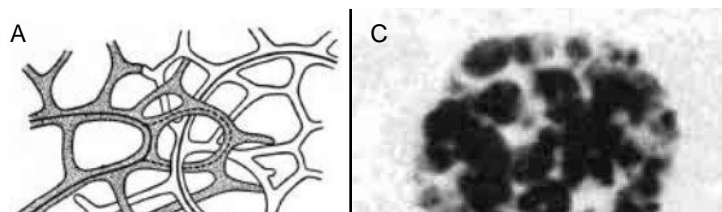
De este modo, el concepto de TCs fue abandonado. Se retomó hasta años después, cuando se presentó por primera vez evidencia directa de su existencia.

Evidencia exp

La teoría de
retomó el ava
David B. Bro
evidencia de l
las células se
dentro del nú



a 1977 se
M. Stack,
muestran
do acético,
cromatina



La huella dejada por la cromatina sugiere que los cromosomas no se encuentran disgregados en una masa uniforme, en cambio, se aprecia una distinción de conjuntos. 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 TCs, esta es evidencia importante en su validación. Un año después, Stack sugiere una explicación para la imposibilidad de visualizar los TCs por microscopía electrónica. De acuerdo con Stack, si se asume que el núcleo está compuesto por cromosomas “hinchados” con espacio suficiente sólo para el nucléolo, es probable que el espacio entre cromosomas está ocupado por espacios de entrecruzamiento. Esto impediría que la microscopía tanto fotónica como electrónica fuera capaz de diferenciar entre un TC y otro.

Cuatro años más tarde, los hermanos Cremer comenzaron una serie de experimentos que llevaron a la validación experimental de los TCs. Sus experimentos se basaron en el uso de un micro-rayo de luz UV sobre zonas discretas del núcleo de células de hámster chino. La secuencia de su experimento fue:

1. Irradiar una zona concreta y pequeña del núcleo utilizando un micro-rayo
2. Generar daño en la zona irradiada
3. Detectar el daño mediante una marca
4. Dar seguimiento a la célula hasta la mitosis con el fin de detectar la marca en los cromosomas durante la metafase.

A partir de este procedimiento podrían obtenerse dos resultados: (i) Si los cromosomas se encuentran disueltos en el núcleo, el efecto de la radiación estaría presente en la mayor parte de los cromosomas; (ii) Si los cromosomas se organizan en espacios discretos, la radiación sólo se vería en un grupo de los cromosomas con la mayor parte de ellos intactos (Fig. 4). Para visualizar el daño, Cremer y Cremer utilizaron dos métodos distintos.

1. El daño provocado por la radiación se marca con ^3H timidina por la reparación del ADN.
2. Detección del ADN radiado por anticuerpos específicos contra la $\gamma\text{-H2AX}$ (H2AX es una variante de histona presente en eventos de rompimientos de ADN de doble cadena)

Sus observaciones se clasificaron en tres categorías:

Categoría I: Metafases con cromosomas intactos.

Categoría II: Metafases con sólo algunos cromosomas afectados, la mayoría de los cromosomas intactos.

Categoría III: Metafases con todos los cromosomas afectados e, incluso, todos los cromosomas pulverizados.

Sin embargo, sus resultados no fueron determinantes como se esperaba, ya que, aunque la mayoría de las metafases fueron categoría II, también obtuvieron metafases categoría III. La categoría II apunta a la existencia de territorios; la categoría III sugiere que los cromosomas se encuentran dispersos en una masa homogénea. Una de las primeras hipótesis para explicar la existencia de ambos resultados fue que los núcleos de las células de categoría II se encontraban organizados en TCs, probablemente en las fases G1 y G2. En cambio, los núcleos de las células de categoría III no se encontraban organizados en territorios, sino en un estado transitorio, probablemente en la fase S. Sin embargo, el uso de anticuerpos sugirió una perspectiva diferente. El anticuerpo se unió específicamente a los cromosomas afectados en las metafases de categoría II, en cambio, el anticuerpo sólo se unió a una pequeña fracción de los cromosomas afectados en las metafases de categoría III, por lo tanto, el daño sólo se había generado en una pequeña fracción de los cromosomas en ambos casos y lo observado en la categoría III se debía a un efecto indirecto a la radiación. Este resultado presentó fuerte evidencia, aunque aún indirecta, de la existencia de los TCs.

Los experimentos basados en el uso de micro-rayo de UV presentan dos desventajas importantes:

1. Difíciles de replicar debido al uso de equipo específico, del cual carecían la mayor parte de otros laboratorios.
2. Sólo podían ser realizados en estudios *in vitro*.

Era necesaria una técnica que permitiera visualizar uno o más cromosomas directamente dentro del núcleo (8).

La visualización de los cromosomas se produjo con el inicio de técnicas de hibridación *in situ* (ISH, por *in situ hybridization*) al comienzo de 1980 (10,11). Con el desarrollo de las técnicas es posible, hoy en día, ver cromosomas, completos y por segmentos, dentro del núcleo en tiempo real o muestras fijadas. Este conjunto de técnicas se conoce como *interphase fluorescence in situ hybridization*, de forma abreviada como *interphase FISH*. El método de FISH confirmó la existencia de los TCs, por medio del uso de sondas fluorescentes complementarias específicas a cada cromosoma. Aunque en el inicio presentó complicaciones debido a la presencia de fragmentos repetidos en casi todos los cromosomas, actualmente, permite visualizar el cromosoma o cromosomas intactos dentro del núcleo. Con esta evidencia, la existencia de los TCs fue evidente, ya que, cada cromosoma parecía encontrarse confinado a un espacio o fracción pequeña del núcleo (Fig. 5) (12).

Con la comprobación de los TCs, comienzan nuevos esfuerzos con el fin de comprender los mecanismos de la arquitectura nuclear y los componentes físicos y biológicos que rigen su origen y mantenimiento.

Concepto de TCs

Los TCs se constituyen como uno de los componentes principales de la arquitectura nuclear (13). Un TC se define como el espacio tridimensional que ocupa un cromosoma durante la interfase. Las características de cada TC varían de un cromosoma a otro, e incluso, existen

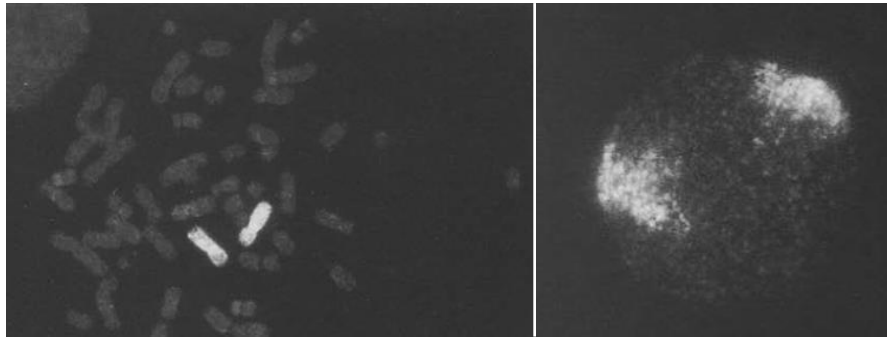


Figura 5. Primeras imágenes de FISH del cromosoma 7 en linfocitos humanos (1988). A. Foto de una célula en metafase obtenida mediante hibridación de una sonda fluorescente (FITC) específica para el cromosoma 7. B. Foto de una célula en interfase obtenida mediante la hibridación de sonda fluorescente (FITC) específica para el cromosoma 7

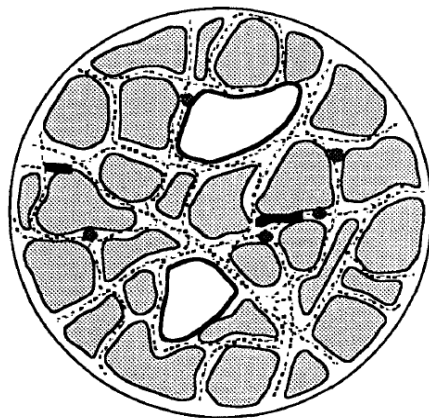


Figura 6. Modelo de TCs de Zirbel (1993) El modelo de Zirbel se basa en dos componentes principales: los TCs, que ocupan la mayor parte del núcleo, y los Dominios Intercromosómicos, que separan los territorios y estructuras nucleares como la lámina y el nucléolo.

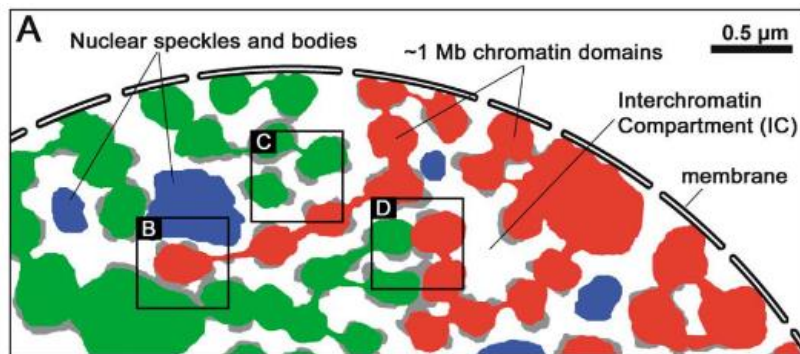


Figura 7. Modelo actualizado de la arquitectura nuclear de Cremer (2006). El modelo de Cremer incluye evidencia reciente de la organización nuclear. Los TCs (verde y rojo) presentan segmentos con diferentes niveles de compactación. Los cuerpos nucleares (azul) se localizan a lo largo del Compartimiento Intercromatiniano.

diferencias entre los territorios de cromosomas homólogos como son el par sexual X. Los mecanismos moleculares que determinan la estructura de un TC aún se desconocen, sin embargo, se sugiere que las combinaciones de cambios estructurales derivados de marcas epigenéticas a nivel de la cromatina determinan en gran medida la estructura del TC (14).

El concepto de TCs permite imaginarse un núcleo dividido en segmentos correspondientes a los diferentes cromosomas. Incluso, puede complicarse al imaginarse los 23 pares de cromosomas dentro de un espacio tan “reducido”. Sin embargo, una evaluación cuantitativa del volumen nuclear ocupado por el ADN deja una gran cantidad de espacio libre. Sorpresivamente, el ADN ocupa aproximadamente un 50% del volumen nuclear. Aún es necesario determinar qué otro componente, o componentes, ocupan este espacio para comprender los mecanismos de organización nuclear.

Modelos de Arquitectura Nuclear Basados en TCs

Existen muchas limitaciones en la comprensión de la organización y funcionalidad de los TCs en la diferenciación celular y regulación genética. A pesar de estas limitaciones, se han sugerido modelos que buscan predecir la estructura y organización del genoma en un núcleo interfásico. Uno de los primeros modelos fue propuesto por Zirbel (Fig. 6) (15). En su modelo sugiere dos componentes principales para su organización: los TCs y los Dominios Intercromosómicos (DI). Estos últimos, como su nombre lo dice, se refieren al espacio libre bordeado por el ADN donde finaliza un TC y comienza otro. En un principio se hipotetizó que estos DI se encontraban sólo en contacto con las fibras de ADN más expuestas en cada TC. Esto facilitaría el acceso de la maquinaria de transcripción a los genes que se encuentran en estas fibras, es decir que, sólo las regiones activas del genoma se encontrarían en contacto con los DI. Zirbel et al (1993) comprueban que la mayor parte de la señal de transcritos de ARN (72%) y componentes de la maquinaria de splicing (93–98%) se localizan en la superficie de los TC. A partir de esta evidencia, se postula que los DI son un compartimento estructural y funcional del núcleo. La existencia de estos compartimentos reduciría significativamente el volumen por el

que se movilizarían los componentes enzimáticos encargados de la transcripción, replicación y reparación del ADN (15).

Inclusive si se asume que cada TC posee una carga neta negativa derivada de la carga del ADN bajo condiciones fisiológicas, esto resultaría en la repulsión de las fuerzas eléctricas entre las superficies de TCs opuestos, delimitando así un espacio entre los mismos (16). El modelo sugerido de TC-DI presenta un límite importante en el acceso a la información, limitando el genoma a sólo una fracción, a sólo aquella información que se encuentre en la superficie de cada TC -un posible mecanismo de diferenciación-.

Sin embargo, la evidencia documentada por el grupo de Visser demuestran la necesidad de realizar un cambio en el modelo (17). Visser comprueba que la replicación del ADN no se limita a la periferia de los TC, sino que, tanto la transcripción como la replicación, pueden ocurrir a lo largo de todo el territorio, tanto en su exterior como en su interior. Se propone entonces, que los DI no bordean el TC, sino que también penetran al interior del TC. Derivado de esto, el concepto se modifica, los DI pasan a ser Compartimentos Intercromatinianos (CI) los cuales se refieren a los compartimientos tanto al interior como al exterior de los TC (16).

De acuerdo al modelo TC-CI, los CI consisten en una red tridimensional continua de canales y lagunas que comienzan en los poros nucleares y penetran al interior de núcleo (18). Actualmente, existe aún más evidencia que valida este modelo.

En un experimento desarrollado por el grupo de Cremer en el 2006, se comprobó la existencia de lagunas y canales dentro y fuera de los TCs mediante la hipercondensación de la cromatina. Este método permitió observar con mayor facilidad la existencia de canales y espacios entre y dentro de los TCs, los cuales, además, se mantenían incluso tras la descondensación de la cromatina. La reproducibilidad de los resultados tras varios ciclos de Condensación Normal - Hipercondensación – Descondensación (Condensación Normal) favorecen la hipótesis de que los patrones estructurales observados durante la

hipercondensación son un reflejo de la topología nuclear que existía previamente en el núcleo normal (Fig. 7) (9).

Un CI, bien definido estructural y funcionalmente, es una pieza clave en el modelo TC-CI. Este modelo puede ser comparado a una esponja, donde los TCs consisten en una red de cromatina interconectada integrada por una red de canales internos, los CI. La zona que bordea los TCs, la periferia de los territorios, separa el interior de las lagunas y canales del CI de los dominios más compactos de la cromatina. Estos experimentos muestran por primera vez, evidencia directa del cambio en el tamaño de los canales y lagunas del CI tras la inducción de una hipercondensación de la cromatina (9). Finalmente, proponen un modelo que une todo lo que se conocía hasta el momento.

Con la finalidad de brindar mayor evidencia a la existencia del CI, Rouquette et al. diseñaron un experimento basado en microscopía electrónica para demostrar con detalle la organización nuclear (19). Mediante la realización de cortes secuenciales ultrafinos de hígado de ratón y su reconstrucción tridimensional demostraron que el espacio ocupado por el ADN dentro del núcleo representaba sólo el $33.8 \pm 1.5\%$ para los núcleos de hepatocitos y el $58.3\% \pm 3.7\%$ de células endoteliales. Ellos determinan que su reconstrucción demuestra claramente 3 características de la organización nuclear:

1. Existen regiones con una alta superposición de la cromatina.
2. Existe el entrecruzamiento de cromosomas en el CI.
3. El CI ocupa una gran parte del volumen nuclear.

Sus aportaciones concuerdan con la evidencia presentada en años anteriores, fortaleciendo el establecimiento del modelo TC-CI.

Organización de los TCs

La comprobación de la existencia de los TCs y la búsqueda de un modelo de organización nuclear trae consigo nuevas preguntas: ¿Los cromosomas se encuentran distribuidos de forma aleatoria dentro del núcleo? O ¿Existen mecanismos dentro de la célula que definan el patrón de organización?

La organización de los cromosomas en interfase debe ser una característica básica de todo núcleo. Sin embargo, esta organización puede establecerse de distintas formas; puede ser aleatoria, es decir, sólo limitada por sus componentes físicos o determinada por un proceso celular. Para diferenciar entre una organización aleatoria de una no aleatoria, es necesario definir la posición de cada cromosoma dentro del núcleo. Las dos características más estudiadas al definir la posición de un cromosoma son: la *posición radial* y la *posición proximal* (20)

Para definir la posición radial de un cromosoma, el núcleo se segmenta en varios círculos concéntricos con un mismo volumen. La posición del cromosoma será el segmento sobre el cual se encuentre señal del mismo, lo que puede incluir más de un segmento en distintas proporciones (Fig. 8). También, es posible usar el centro de intensidad de fluorescencia del cromosoma y medir la distancia a la que se encuentra de otros componentes nucleares: el centro del núcleo y la membrana nuclear. Este método ubica al cromosoma dentro del contexto nuclear.

La posición proximal se refiere a la ubicación del cromosoma con respecto a otros cromosomas u otros elementos dentro del núcleo. Es importante definir cuál es la estructura de interés y elegir los puntos de referencia necesarios. Por lo que, se requieren diversos puntos de referencia para ubicar espacialmente a un cromosoma. El método permite definir la posición de TCs en contexto con otros elementos nucleares, especialmente otros cromosomas(20).

Los resultados de estos métodos implican aspectos funcionales distintos (Fig. 8). Se sugiere que la posición radial de un cromosoma se define por su carga génica como un gradiente de expresión, mientras más céntrico sea un cromosoma más activo, así en un continuo hasta llegar a un estado de represión en la periferia. Las

primeras evidencias de una organización no aleatoria radial se basan en experimentos de FISH en linfocitos en los cuales se marcaron los cromosomas 18 y 19. El cromosoma 19, con una alta densidad de genes, se ubica en el interior del núcleo, en cambio, el cromosoma 18, con una baja densidad de genes, se ubica en la periferia del núcleo (21). Estos resultados se completaron y comprobaron con la inclusión del resto de los cromosomas en linfocitos. Además, existe evidencia de la conservación de este tipo de organización radial en primates, donde los segmentos ortólogos al cromosoma 19 se encuentran en el interior del núcleo y el cromosoma 18 se encuentra en la periferia del núcleo. Sin embargo, ésta se ha comprobado en sólo algunos tipos celulares e, inclusive, existe fuerte evidencia de un segundo tipo de organización radial. Existen otros tipos celulares donde la posición radial de cada cromosoma se asocia a su tamaño o contenido de ADN, en contraste con su densidad génica como se observa en linfocitos (20). En los fibroblastos humanos, células planas y elipsoides, se determinó que los cromosomas se encontraban organizados con relación a su peso; los cromosomas más pequeños hacia el centro del núcleo; los más grandes hacia la periferia. La investigación más reciente ha dividido a los cromosomas en segmentos y estudia la organización de cada segmento de forma independiente, llevando a un mayor detalle la definición de la posición (22). Otros parámetros se han empezado a estudiar en la definición de la posición radial como tiempo de replicación, contenido en GC y factores particulares de cada segmento, sin embargo, estas relaciones han resultado difíciles de aislar y aún no se obtiene un resultado concluyente.

La posición proximal sugiere la posible interacción entre cromosomas, una mayor cercanía entre cromosomas facilita la interacción entre éstos. Este método establece la posición en contexto con otros elementos nucleares. Esta organización sugiere que mientras más cercano se encuentren los elementos, más probable es su interacción. Eventos de intercambio de material entre cromosomas se facilitan entre elementos cercanos. No obstante, no existe evidencia de una organización proximal bien definida para todos los cromosomas en algún tipo celular. El grupo de Misteli ha logrado definir la posición proximal de un grupo



pequeño de cromosomas no homólogos en linfocitos humanos (23). Aún con esta evidencia, la posición es una probabilidad y no coordenadas definitivas. Es una posición determinada por una alta frecuencia en esta localización, no un hecho observado en cada núcleo estudiado. En estos experimentos observaron que existe una alta variación de célula a célula en la organización de los TCs en todos los tipos celulares estudiados hasta el momento.

Estructura de los TCs

Existe un amplio nivel de complejidad en la estructura de un TC, debido a que un solo cromosoma contiene la mayoría de los estados posibles de la cromatina. Aunque hay casos en los que se puede generalizar la estructura de un TC (como el cuerpo de Barr), todos los cromosomas cuentan con segmentos amplios de eucromatina y heterocromatina con diferentes niveles de compactación. Debido a esto, es necesario considerar a cada TC como un conjunto de elementos de ~1 MB con un nivel de compactación variable(24). Estos elementos muestran alta variabilidad a lo largo del ciclo celular, aún es necesario comprender si estos elementos están formados por segmentos continuos o no continuos y si estos elementos se preservan a constantes en cada tipo celular. Esta diversidad topológica se establece por medio de las histonas que dan soporte al DNA dentro del núcleo y participan en la regulación de los procesos celulares. Además de las histonas, las láminas nucleares pueden interactuar directamente o indirectamente con la cromatina a través de las histonas y otras proteínas asociadas a la lámina. Las interacciones lamina-cromatina son importantes para organizar la distribución de los TCs en el núcleo y fallas en el proceso pueden derivar en enfermedades como el síndrome de envejecimiento prematuro(21).

El avance de la investigación en organización nuclear sugiere que la definición de los elementos de ~1MB por las proteínas estructurales afectan los procesos de regulación de la síntesis de ADN, la respuesta al daño del ADN, la progresión del ciclo celular y la diferenciación celular(25,26).

Patrón de distribución de los TCs en diferentes tipos celulares

Como se ha mencionado anteriormente, el estudio de los TCs sugiere que existen patrones específicos de distribución para cada tipo celular. La posición de un TC dentro del núcleo se define mediante su posición relativa y radial. Estudios de la posición radial en linfocitos revelan un patrón para la distribución de algunos TCs con referencia al centro y los límites del núcleo. En la Fig. 9, se gráfica la posición de diferentes TCs en linfocitos donde el color de cada línea identifica a un individuo distinto. Las imágenes de fluorescencia revelan que la mayor parte del TC 1 se ubica en la periferia del núcleo, a diferencia del TC 5 que se ubica en los anillos centrales del núcleo. Las posiciones de los TCs 1 y 5 se mantienen constantes entre los diferentes individuos del estudio, lo que sugiere que existe un proceso que determina la posición de los TCs(2). Estos estudios de posición radial sugieren un patrón específico para la distribución de los TCs en linfocitos, sin embargo, se requiere de la comparación entre diferentes tipos celulares para definir las posibles diferencias en sus patrones de distribución.

En 2018, el grupo del Dr. Dainiak realizó un estudio de interacción entre los TCs en linfocitos T humano (27). Los resultados del estudio se graficaron en una matriz de interacción que se presenta en la Fig. 10. En la matriz se listan todos los cromosomas en ambos ejes y se indica con un recuadro a color la presencia de interacción o contacto entre los TCs. Las interacciones o contactos en la matriz debían presentarse en al menos el 80% de las células estudiadas para ser agregadas. De nuevo, esta matriz sugiere un patrón de distribución específico para linfocitos con referencia a la posición relativa de los TCs. En un estudio independiente, se determinó la posición de los cromosomas 1, 4, 11, 12, 16 y 18 en núcleos de la línea celular MCF10A. En la Fig. 11 A, se muestra una de las imágenes representativas del estudio. En la reconstrucción del núcleo del MCF10A se muestran las interacciones entre los TCs. Al igual que en las células mononucleares, en MCF10A se sugiere que existe un patrón específico para la distribución de sus TCs. Al comparar las interacciones que existen en MCF10A y las células mononucleares podemos encontrar diferencias en su patrón de

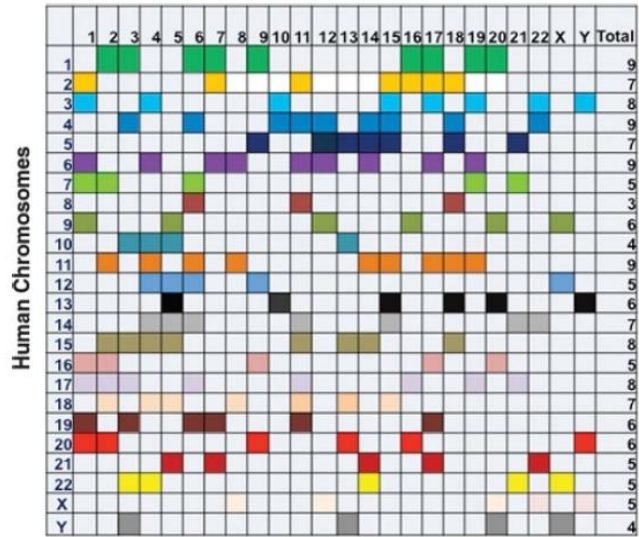
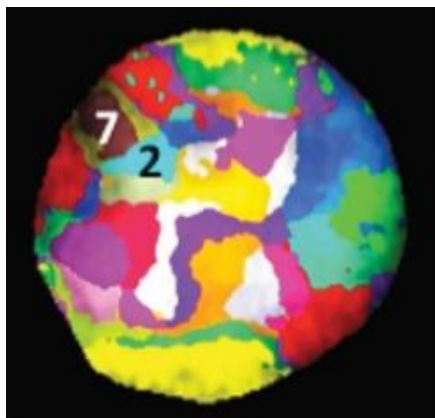


Figura 10. Imagen representativa de FISH Multicolor (mFISH) y Matriz de Interacción. A. Análisis de la organización de los TCs en linfocitos humano con mFISH en imágenes 2D de un núcleo interfásico, el cual muestra cada TC y los TC adyacentes. B. Matriz de Interacción entre los TCs detectados por mFISH en núcleos interfásicos. Los espacios a color indican interacción entre los TCs del eje x con los TCs del eje y. *Imagen tomada de Balajee (2018.)*

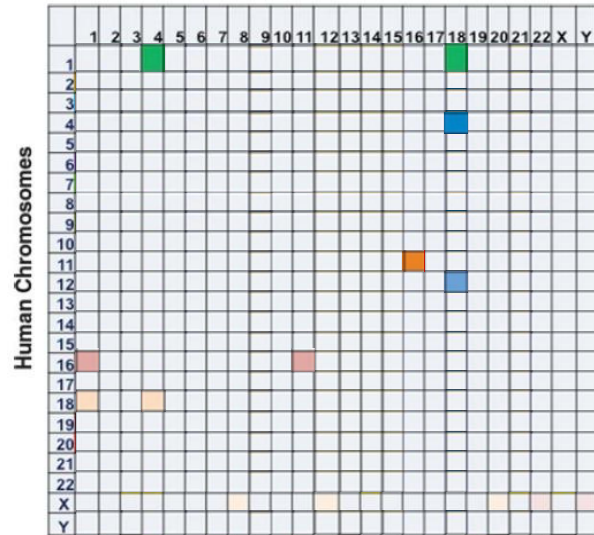
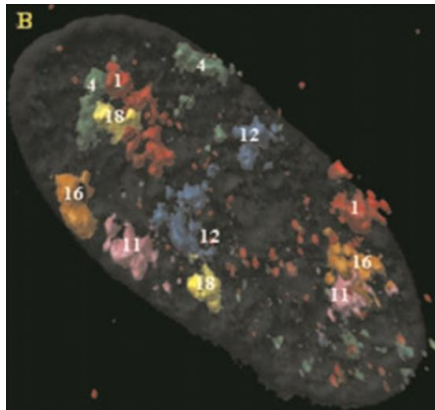


Figura 11. Reconstrucción 3D de FISH Multicolor (mFISH) en MCF10A y Matriz de Interacción con Anotaciones. A. Análisis de la organización de los TCs en la línea celular MCF10A con mFISH en imágenes de un núcleo interfásico, el cual muestra los TCs 1, 4, 11, 12, 16 y 18. B. Matriz de Interacción entre los TCs detectados por mFISH en núcleos interfásicos. Los espacios a color indican interacción entre los TCs del eje x con los TCs del eje y. *Imagen tomada de Balajee (2018.)*

distribución. En la Fig. 11 B, indico las diferencias entre los patrones encuadrando en rojo las diferencias y en verde las similitudes entre los dos tipos celulares.

La evidencia que encontramos en este tipo de estudios demuestra la existencia de patrones específicos para cada tipo celular. Aún es necesario evaluar la dinámica de estos patrones en el ciclo celular y la diferenciación (27), además de mejorar los métodos de adquisición de imágenes para definir con mayor precisión el tipo de interacción entre los TCs y evitar posibles falsos positivos en la determinación del contacto entre los mismos.

Conservación evolutiva de los patrones en TCs

Las diferencias en los patrones de distribución de los TCs por cada tipo celular sugieren implicaciones funcionales; la conservación de estos patrones entre especies sugiere relevancia en la perpetuación y evolución de las especies. La conservación en la posición de los segmentos ortólogos de los TCs 18 y 19 fue demostrada por imágenes de 3D-FISH en diversas especies de simios y monos (28). En la Fig. 12, el TC 18 (rojo) presenta una posición más periférica en comparación con el TC 19 (verde) en linfocitos humanos. Esta misma relación, TC 18 periférico: TC 19 interno, está presente en linfocitos de chimpancés, gorilas, orangutanes e, incluso, gibón de manos blancas una especie más alejada de nuestro origen filogenético. La posición interna del TC 19 se asocia a una mayor densidad de genes tanto en humanos como en las especies de simios y monos en el estudio.

Como sus autores lo señalan “Este patrón de distribución radial se ha mantenido por un período de, por lo menos, 30 millones de años, a pesar de los amplios arreglos cromosómicos que ocurrieron durante la evolución de los simios”. La conservación de la posición de cromosomas y segmentos homólogos en especies de simios y monos evidencian la relevancia funcional de la organización de los TCs(28).

Relevancia del Estudio de los TCs 9 y 22

Los cromosomas 9 y 22 están implicados en la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), ya que, tras un evento de translocación, generan una proteína fusionada con potencial carcinogénico. La translocación ocurre entre los genes *BCR* (TCs 22) y *ABL* (TCs 9) y es específica de linfocitos(1). Aunque conocemos los mecanismos de translocación, aún desconocemos la razón del origen o la especificidad por un tipo celular de cada translocación. Los estudios de la posición de los TCs y su distribución espacial dentro del núcleo sugieren que éstos juegan un papel principal en el origen y la frecuencia de las translocaciones. Estudios de posición relativa demuestran una mayor frecuencia de translocación cuando los TCs están próximos en su distribución tridimensional dentro del núcleo interfásico (29,30). En la Fig. 13. en la línea celular normal de epitelio bronquial de humano (NHBE), se muestra una tabla donde se resaltan los pares cromosómicos donde las translocaciones ocurrieron con mayor frecuencia de la esperada si suponemos que es un proceso aleatorio. Al complementar esta tabla con imágenes de la distribución espacial de los TCs, los autores demuestran que estos pares cromosómicos de mayor frecuencia de translocación están cercanos físicamente dentro del núcleo(30). De la misma forma, estudios de 3D-FISH han demostrado que los TCs 9 y 22 están cercanos en su distribución espacial específicamente en linfocitos humanos. Su posición relativa podría ser un factor determinante en su frecuencia de translocación. Comprender los factores de origen y frecuencia de translocaciones como la 9:22 podrá mejorar nuestras técnicas de diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades como LMC.

Aunque la translocación *bcr-abl* está directamente asociada en el padecimiento de LMC, diversos estudios han revelado la presencia de esta fusión en personas sanas en diferentes poblaciones humanas. Sin embargo, existe una amplia variación en los resultados reportados por cada estudio como se muestra en la **Tabla 1**. El rango de resultados positivos para la translocación va de un 10.3% a un 54% dependiendo del estudio(31). Estas diferencias se podrían deber a una multitud de factores. Como

se describió anteriormente, la posición relativa y la distancia entre los TCs son factores importantes en la frecuencia de translocaciones para diferentes pares cromosómicos. Es posible que la variación observada para resultados positivos de la translocación *bcr-abl* (10.3%-54%) se deba a diferencias poblacionales e individuales en la posición relativa y distancia de los TCs 9 y 22 dentro del núcleo. Hasta el día de hoy, no existen resultados enfocados a las diferencias individuales en la distribución de los TCs 9 y 22 en personas sanas. En nuestro laboratorio consideramos relevante el explorar esta posibilidad, con la visión de poder trasladar este posible hallazgo a nuevas herramientas de diagnóstico y pronóstico en un futuro cercano.

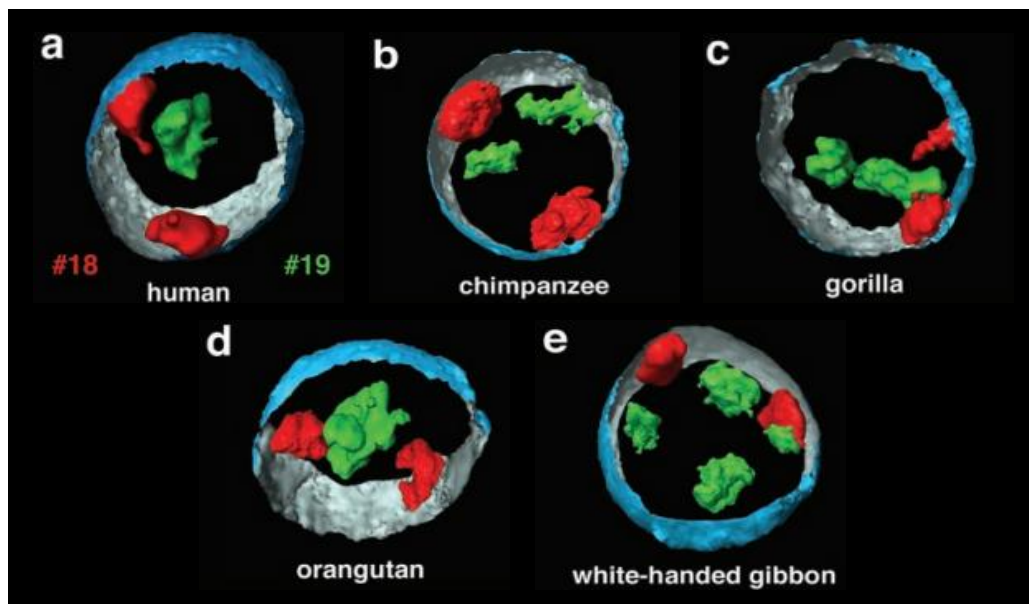
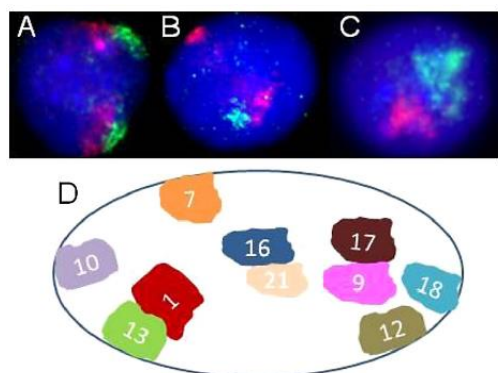


Figura 12. Reconstrucciones de TCs en humanos, grandes simios y el gibón de manos blancas. (a) Posición tridimensional de los TCs 18 (rojo) y 19 (verde) en células humanas linfoblastoides con el límite nuclear (azul). (b-d) Posición tridimensional de los homólogos de TCs 18 y 19 en células de grandes simios. (e) El núcleo de gibón representa la variabilidad de la organización de los CT. A pesar del cambio en las secuencias homólogas, aún se mantiene la relación en la posición. *Imagen tomada de Tanabe (2015.)*



SCHIP analysis of selected pair-wise chromosome exchanges.

Candidate cluster	p-Value	Candidate cluster	p-Value
(1:2)	0.451200	(9:11)	0.527100
(1:3)	0.177300	(9:17)	0.029300
(1:13)	0.019300	(9:18)	0.046500
(1:18)	1.000000	(12:18)	0.012200
(3:6)	0.212800	(15:16)	0.383900
(3:15)	0.088300	(16:21)	0.005000
(4:12)	0.070300	(18:19)	1.000000
(6:8)	0.059500	(20:22)	0.187000
(6:10)	0.401500	(21:22)	1.000000
(7:10)	0.094500		

Bold font denotes statistical significance at 95%.

Figura 13. Posiciones relativas de los TCs en células NHBE. (A) TCs 1 (rojo) y 13 (verde) (B) TCs 9 (verde) y 17 (rojo) (C) Cromosomas 16 (rojo) y 21 (verde). Tabla: Intercambio entre pares cromosómicos. Las negritas indican pares cromosómicos en los que ocurren más intercambios de los esperados en un evento aleatorio. *Imagen tomada de Foster (2013).*

Tabla 1. Comparación de estudios sobre la presencia del transcrito *bcr-abl* en muestras de individuos sanos. *Tomada de Ismail (2014)*

Study (year)	Sample type (no.)	Positive results (%)	Method	Ref no.
Biernaux <i>et al</i> (1995)	Adult PB (73)	30.0 (p210)	RT-PCR (N)	(21)
	Children PB (22)	4.5 (p210)		
	Cord blood (22)	0.0 (p210)		
Bose <i>et al</i> (1998)	Adult PB (16)	25.0 (p210)	RT-PCR (N)	(22)
	Non-CML cell lines ^a (7)	69.0 (p190)		
	NIH3T3 murine fibroblasts	43.0 (p210) 100.0 (p190) 0.0		
Song <i>et al</i> (2011)	Adult PB (46, p210)	54.0 (p210)	RT-PCR (N)	(15)
	(53, p190)	77.0 (p190)		
	Child PB (28, p210)	32.0 (p210)		
	(27, p190)	67.0 (p190)		
Current study	Cord blood (50)	16.0 (p210)	RT-PCR (N)	
	Adult PB (145)	42.0 (p190)		
	Child PB (44)	10.3 (p210)		
		0.0 (p190)		
		9.1 (p210)		
		0.0 (p190)		

^aCell lines used were hematopoietic in origin (HL60, KG1, U937, Kasumi, Jurkat, JVM13 and JVM25). PB, peripheral blood; CML, chronic myelogenous leukemia; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; N, nested PCR.

Planteamiento del Problema

Existe un patrón específico para la distribución de los TCs en linfocitos humanos. Este patrón determina la frecuencia de translocación con base en la distancia entre los TCs. Variaciones en la distancia entre estos elementos nucleares podrían afectar de forma negativa o positiva la probabilidad de generar aberraciones cromosómicas. Aún no entendemos las implicaciones que puede tener el conocer la distancia entre dos TCs, ni los mecanismos responsables de su establecimiento. Es necesario estudiar a detalle las variaciones entre sujetos y la posible importancia de las diferencias entre los mismos.

Pregunta de Investigación

¿Existe una diferencia en la distancia entre los TCs 9:22 en células mononucleares de sangre periférica en personas sanas?

Hipótesis

Existen diferencias en la distancia entre los TCs 9:22 en células mononucleares de diferentes personas sanas.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la distancia entre los TC de los cromosomas 9 y 22 en células mononucleares obtenidas de sangre periférica conservando la estructura del núcleo en muestras de personas sanas.

Objetivos Específicos

1. Obtener muestras de sangre periférica de personas sanas.
2. Separar las células mononucleares del resto de componentes sanguíneos.
3. Estandarizar la técnica de *Hibridación in situ* con *Fluorescencia Tridimensional* en células mononucleares para las sondas de cromosoma completo 9 y 22 (3D-FISH).

4. Preparar laminillas (3D-FISH) para cada individuo previo a la adquisición de imágenes.
5. Obtener imágenes con microscopía convencional de fluorescencia.
6. Obtener imágenes con microscopía de súper resolución por el método de microscopía de iluminación estructurada.
7. Elaborar modelos tridimensionales de las imágenes adquiridas.
8. Cuantificar las distancias entre los TCs 9 y 22 de células mononucleares a partir de los modelos tridimensionales.
9. Identificar por análisis estadístico las posibles diferencias entre las distancias de los TCs de cada individuo.

Metodología

Obtención de Muestras de Sangre Periférica

Las muestras de sangre periférica (SP) corresponden a 4 individuos sanos, 2 hombres y 2 mujeres en un rango de edad de 25-30 años. La extracción de SP se realizó mediante sistema Vacutainer con heparina sódica, de lo cual se tomaron 2 tubos de 6ml por individuo. Las muestras fueron trabajadas inmediatamente después de la extracción.

Separación de células mononucleares mediante gradiente de Ficoll

Las muestras de SP fueron procesadas con Ficoll *Histopaque* para el aislamiento de células mononucleares (MNC). Este método provee las siguientes ventajas (32):

- $60 \pm 20\%$ de recuperación de células mononucleares del total de la muestra
- $95 \pm 5\%$ de células mononucleares en la fase de separación
- $>80\%$ de viabilidad de las células separadas
- Baja proporción de granulocitos
- Baja proporción de eritrocitos

Separación de Células Mononucleares por Gradiente de Ficoll

El método de separación por gradiente de Ficoll ha sido ampliamente descrito y es común en los procedimientos con muestras de sangre. A continuación, detallamos el procedimiento:

1. Tras obtener la muestra, invertimos 8 veces consecutivas el tubo para mezclar la heparina con la sangre y evitar la coagulación de la misma.
2. En tubos Falcon de 15 ml, agregamos lentamente un volumen de Ficoll idéntico al de la sangre (6ml), quedando una proporción 1:1.

3. Agregamos, cuidadosa y lentamente, 6 ml de sangre sobre el volumen de Ficoll. Para evitar mezclar la sangre con el Ficoll, dejamos resbalar la sangre por la pared del tubo, en lugar de agregarla directamente sobre el Ficoll
4. Centrifugamos a 400 g por 30 min a temperatura ambiente (TA). Es muy importante que el freno de la centrifuga este desactivado.
5. Al retirar el tubo, es importante no agitar el tubo, pues esto rompería nuestras fases de separación
6. Con una pipeta, retiramos la fase superior la cual contiene plasma y plaquetas. Retiramos lo más posible sin tocar la fase blanca que se encuentra justo debajo.
7. Con una pipeta limpia, extraemos la fase blanca que contiene las células mononucleares y las pasamos a un tubo limpio.
8. Agregamos 3 volúmenes de PBS con respecto a la fase blanca obtenida, es decir, si obtuvimos 3 ml de células, es necesario agregar 9 ml de PBS. Este paso se lleva a cabo con la finalidad de limpiar las células de Ficoll.
9. Centrifugamos las células a 400 g por 10 minutos a TA.
10. Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos en 3 ml de PBS limpio.
11. Repetimos 3 veces los pasos 9 a 12 para cada muestra.

Hibridación *in situ* con Fluorescencia Tridimensional (3D – FISH)

Células, Proceso de Fijación y Pre-tratamiento

Se aislaron células mononucleares (MNC) aisladas a partir de SP humana mediante gradiente de Ficoll y se resuspendieron en 200 μ l de PBS a una concentración

mínima de 10^5 células/ml. La suspensión celular se colocó sobre un cubreobjetos tratado con Poly-L-Lisina (18x18 Zeiss) dentro de una caja petri p60 y se mantuvieron a TA por 15 min máximo (evitando que la gota de suspensión celular secará).

1. Las células se fijaron agregando primero 100 ul de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS 1x por 5 minutos.
2. Se continuó con la fijación agregando 1 ml de PFA al 4% en PBS 1x por 10 minutos.
3. Se lavaron con Tritón X-100/PBS 1x a TA 3 veces por 5 minutos.
4. Los cubreobjetos con células fijadas se incubaron en Tritón X-100/PBS 1x a TA por 20 minutos.
5. Se transfirieron a glicerol al 20% en PBS 1x a TA por 1 hora.
6. Se retiró la mayor parte del glicerol al 20% y se les vertió nitrógeno líquido hasta la congelación del cubreobjetos con las células, y su posterior descongelación a TA.
7. Una vez descongeladas, se agregaron 100 ml de glicerol al 20% y se congelaron de nuevo, para un total de 4 ciclos de congelación-descongelación.
8. Se lavaron en Tritón X-100/PBS 1x a TA 3 veces por 5 minutos.
9. Las células se incubaron en HCl 0.1 N por 5 minutos.
10. Se lavaron con buffer SSC 2x por 1 minuto.
11. Los cubreobjetos se incubaron en formamida al 50%/SSC 2x a temperatura ambiente por 24 horas hasta la hibridización.

Sondas e Hibridación

Las sondas que se emplearon para la hibridación fueron las que a continuación se describen:

- Sonda Methasystems de tinción completa del cromosoma 9 (whole chromosome painting, WCP por sus siglas en inglés) marcada con fluoróforo verde.
- Sonda Methasystems de tinción completa del cromosoma 22 (WCP22) marcada con fluoróforo naranja.

Estas sondas fueron mezcladas homogéneamente en una proporción 1:1 (2.5 ul de sonda WCP22 + 2.5 ul de la sonda WCP9 por cubreobjetos).

1. La formamida se retiró de los cubreobjetos (uno a la vez) y se agregó la mezcla de sondas directamente en el cubreobjetos.
2. Se enjuagaron las laminillas con PBS 1x.
3. Se montaron los cubreobjetos en una laminilla y se sellaron con cemento tipo silicon para evitar la evaporación de la sonda.
4. Las células y las sondas se desnaturalizaron a 78° C por 5 minutos en una platina de temperatura controlada (HYBrite, Vysis)
5. Se incubaron por 2 días a 37° C en cámara húmeda para favorecer una buena hibridación.

Lavados Post-hibridación

1. Se desmontaron los cubreobjetos de las laminillas en donde se quedaron hibridando para posteriormente ser lavados en IGEPAL 0.1%/SSC 2x por 2 min a TA
2. Posteriormente, se lavaron en IGEPAL 0.3%/SSC 0.4x por 2 min a TA.
3. Un lavado final en IGEPAL 0.1%/SSC 2x por 2 min a TA.

4. Finalmente, los cubreobjetos se montaron con DAPI/Vectashield sobre laminillas y sellados con cinta adhesiva.

Adquisición de imágenes

De las muestras procesadas por 3D-FISH se adquirieron imágenes tridimensionales de super-resolución mediante Microscopía de Iluminación Estructurada (3D-SIM). Las imágenes SIM se tomaron en un sistema Zeiss Elyra PS1 equipado con un objetivo de inmersión en aceite Zeiss Plan Achromat Inverted 100x/1.40, una cámara Andor EM-CCD iXo 885 y un lente de 1.63 a temperatura ambiente. Obtuvimos la señal de DAPI, FITC y Cy3, usando láseres de excitación de 405nm, 488nm y 561nm respectivamente. Capturamos *Z-Stacks* con un intervalo de 200nm entre cada plano, lo que consiste entre 60-70 planos secuenciales. Definimos manualmente los límites de cada *Z-Stack*, para asegurarnos de capturar completamente cada núcleo. Reconstruimos las imágenes con el software *Imaris* (V.8.0, Bitplane). Usamos la reconstrucción para el análisis, y la cuantificación de distancias y volúmenes. Definimos la distancia entre TCs como la distancia entre sus centros de masa. Analizamos un mínimo de 25 células por cada individuo.

Microscopía de Iluminación Estructurada (SIM)

La microscopía de iluminación estructurada es un tipo de microscopía de super resolución. En este procedimiento, la muestra se ilumina con una serie de patrones de rayas con una alta frecuencia espacial. Estos patrones son generados por el láser al pasar por una rejilla óptica móvil y dirigida a través del objetivo en la muestra (33). Este procedimiento evita iluminar por completo la muestra y disminuye ruido de la señal fluorescente. El movimiento de esta rejilla genera patrones en diferentes orientaciones los cuales son capturados por el microscopio. Todas las imágenes capturadas son procesadas con algoritmos informáticos. Estos algoritmos usan los datos para estimar los parámetros experimentales e identificar los componentes superpuestos en la muestra (33). Finalmente, genera una imagen de alta resolución de las estructuras en la muestra. En la figura siguiente se ejemplifica este proceso (Fig. 14).

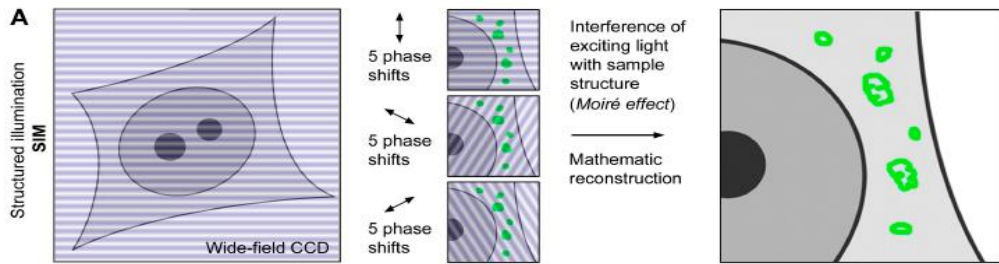


Figura 14. Principio de la Microscopía de Iluminación Estructurada. El láser pasa a través de una rejilla óptica, la interferencia de la rejilla genera un patrón de rayas. El microscopio adquiere una imagen con cada cambio en la orientación de la rejilla. La reconstrucción matemática produce una imagen de alta resolución. Imagen tomada de *Leonhardt et al (2010) A*

Con SIM es posible aumentar al doble la resolución lateral, superando el límite de difracción clásico. En una reconstrucción 3D es posible duplicar la resolución axial mediante el procesamiento de imágenes en secuencia o un “z-stack”.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad’s Prism 6. La *prueba de Tukey* fue utilizada para comparar las distancias y la ubicación nuclear de las señales de los TCs 9:22 y el núcleo marcado con DAPI. Para este análisis, el nivel de confianza se fijó en 0.05 y $p < 0.05$ fue considerado significativo. La *prueba de Tukey* fue preferida sobre múltiples pruebas de *t de Student*, ya que la varianza se estima a partir de todos los datos como una sola varianza y reduce el error por comparaciones múltiples.

Metodología

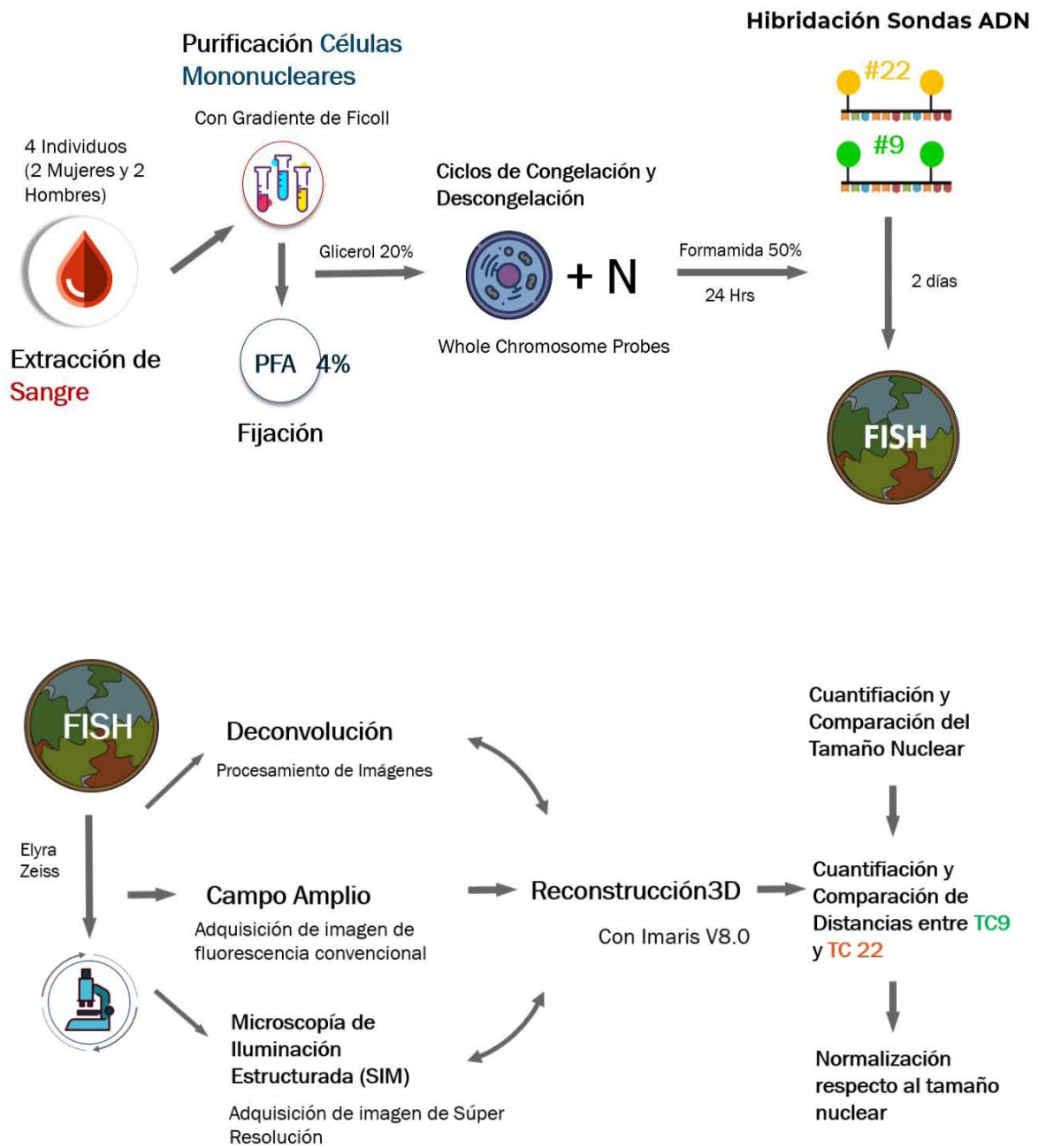


Figura 15. Esquema de la metodología. A. Esquema del proceso de 3D FISH a partir de la extracción de la muestra hasta la obtención de las laminillas. B. Esquema de la captura y procesamiento de las imágenes adquiridas a partir de las laminillas de 3D FISH.

Resultados

Obtención de imágenes

Por cada individuo se prepararon 3 laminillas con las mismas condiciones para 3D FISH, descritas en la sección anterior. A partir de estas laminillas se tomaron en promedio 25 imágenes de núcleos aislados, por individuo. Esto nos permitió delimitar fácilmente cada núcleo y evitar cualquier artefacto producido por la cercanía de dos o más núcleos. Cada imagen fue capturada con 3 diferentes canales: DAPI usando un láser de excitación de 405nm, FITC con 488nm y Cy3 con 561nm.

Obtención de Imágenes por Microscopía de Epifluorescencia

En esta primera fase, se tomaron fotografías mediante microscopía de epifluorescencia, obteniendo imágenes en formato de campo amplio o '*WideField*' (*WF*) para evaluar la efectividad de nuestra hibridación y poseer evidencia de la distribución de los TCs. Capturamos las imágenes en Z-stack, lo que nos permite tener un resultado tridimensional de nuestros núcleos. Este procedimiento consta en dividir cada núcleo en una serie secuencial de planos, de tal forma, que el resultado es una compilación de fotos de principio a fin del núcleo. Aunque es posible realizar una reconstrucción tridimensional del núcleo a partir de estas imágenes, la reconstrucción tendría una resolución limitada derivada del límite de difracción, además de una mayor proporción de señal falsa o "ruido" debido a un método de captura de menor resolución. (Fig. 16 A).

Obtención de Imágenes de Super-resolución por SIM

Empleando la Microscopía de Iluminación Estructurada (Structured Illumination Microscopy, SIM), fuimos capaces de superar el límite de difracción clásico y disminuir el ruido de las señales para afinar la información de nuestras reconstrucciones tridimensionales aumentando la capacidad de resolución, obteniendo así, imágenes de super-resolución. SIM. Como se detalló anteriormente,

es una técnica de captura de imágenes que se basa en la superposición de imágenes con el fin de disminuir el efecto de la difracción de la

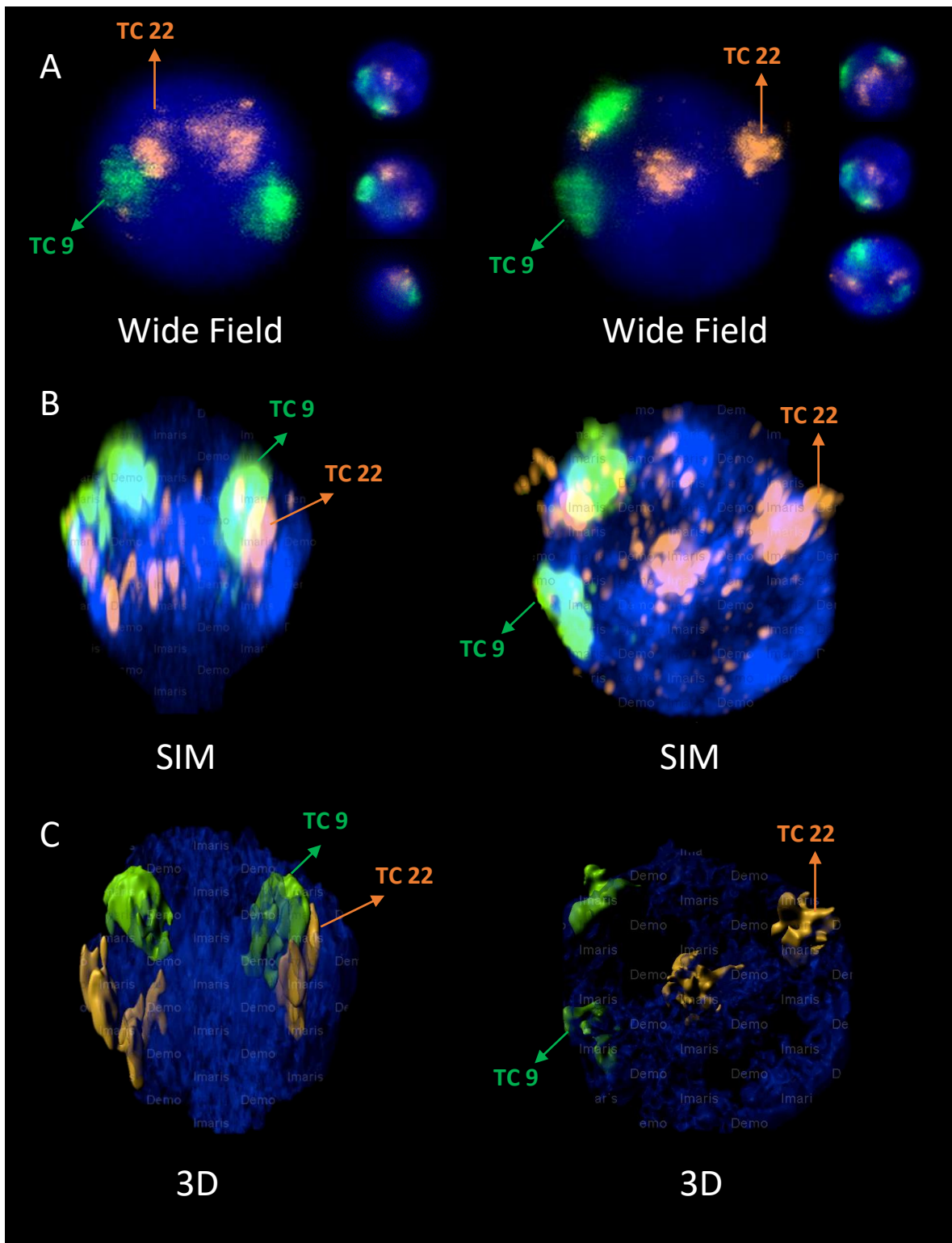


Figura 16. Imágenes representativas del método de captura y procesamiento tridimensional de Individuo A (izquierda) y B (derecha). A. Imágenes obtenidas con Wide Field. B. Imágenes obtenidas con método de SIM, método de súper resolución. C. Reconstrucción tridimensional a partir de un Z stack capturado por SIM.

luz. La técnica provee de una resolución volumétrica 8 veces mayor que las técnicas convencionales, derivado de un aumento en la resolución lateral y axial (34). Los siguientes artículos describen a profundidad las bases de la técnica (35,36). Tras la captura de imágenes, estas se procesan a través de un algoritmo lo que resulta en un conjunto de imágenes, que van de principio al fin del núcleo, con una resolución hasta 5 veces mayor.

En la Fig.16 se muestra una comparación entre los resultados obtenidos por *WF* y *SIM*. Es apreciable la diferencia en la resolución de cada uno de los procedimientos. Las imágenes en *SIM* muestran TCs más intrincados lo cual concuerda con el modelo TC-CI descrito en la introducción, donde los CI no sólo rodean los TCs, sino que también se adentran en los mismos.

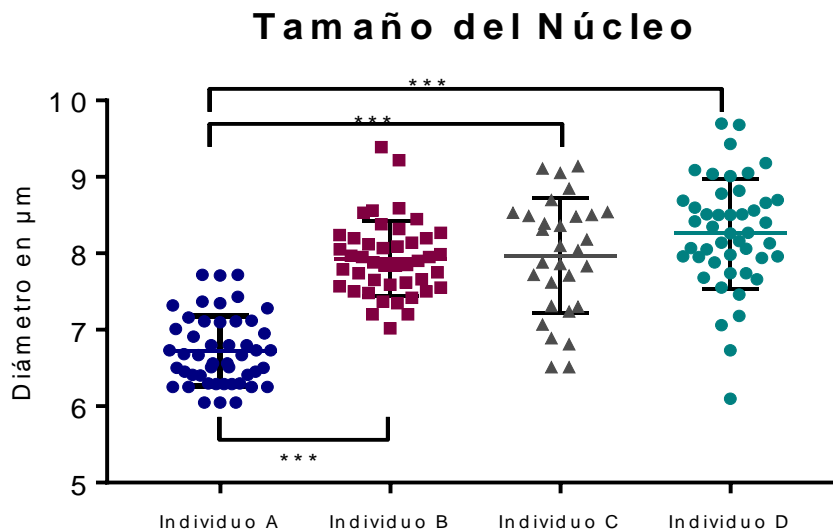
Reconstrucción Tridimensional de las imágenes

A partir de las imágenes que obtuvimos por *SIM*, realizamos una reconstrucción tridimensional de cada una de las señales (*DAPI*, *FITC* y *Cy3*) utilizando el programa para análisis de imagen *Imaris* Versión Demo 9.0.2, Bitplane. Este software nos permitió reconstruir cada una de las señales de forma independiente y sobreponerlas para formar una sola reconstrucción tridimensional de cada núcleo. Debido al procesamiento de las imágenes por *SIM*, contamos con una señal delimitada en comparación con las imágenes en *WF*. Este nivel de señal representa con mayor fidelidad la conformación y distribución de los TCs dentro del núcleo.

En el proceso de reconstrucción tomamos como base la señal fluorescente capturada en nuestras imágenes. Después de haber sido procesadas por el algoritmo de *SIM*, se generó una masa tridimensional rodeando la señal fluorescente. A partir de los modelos 3D, definimos el centro de masa (c. m.) de cada TC y el núcleo para usarlo como su punto de medición y referencia. El c. m. de una figura 3D es el punto geométrico en el que el peso relativo de la distribución de la masa es igual a cero (37). Este punto geométrico es único para cada figura regular e irregular. Dado que los TCs presentan formas irregulares, el c. m. nos permitió obtener un punto fijo de medición para cada cuerpo 3D en nuestro modelo.

La medición de las distancias consistió entonces en medir la distancia entre los centros de masas de cada TC y núcleo.

En la Fig. 17 se muestran diferentes vistas de los métodos de cuantificación en cada individuo elegidas al azar.



Determinación del tamaño nuclear

Figura 18. Gráfica de la distribución de las medidas de diámetro nuclear por individuo. El análisis estadístico lo realicé por *prueba de Tukey* para comparaciones múltiples entre cada par de individuos. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre el diámetro nuclear del individuo A y el resto de los individuos con una $p < 0.0001$.

A partir de las imágenes tomadas en *SIM*, realizamos una proyección máxima de la señal lo cual resulta en una imagen 2D que muestra una proyección máxima de todos los planos y la mayor intensidad de cada señal (DAPI, TCs 9 y TCs 22). Con esta imagen, realizamos mediciones para determinar el diámetro mayor y menor de cada uno de los núcleos, tomando la distancia entre los extremos de forma perpendicular (Fig. 17 A). Cuantificar el tamaño del núcleo fue crucial para evaluar posibles diferencias entre las distancias de los TCs encontradas en cada núcleo y entre individuos. Se consideró necesario contextualizar cada una de nuestras

A. Cuantificación del Tamaño Nuclear

Individuo A

Individuo B

mediciones en relación al tamaño de cada uno de los núcleos analizados y de esta forma normalizar nuestras variables.

Al comparar las diferencias entre el promedio del tamaño nuclear en cada individuo, encontramos que el individuo A presentó núcleos de un menor tamaño ($p < 0.0001$), lo cual resultaría en distancias más pequeñas entre los elementos dentro del núcleo (Fig.17). Por esta razón, el tamaño del núcleo fue tomado como un normalizador para el resto de las mediciones. Cabe resaltar que, aunque el tamaño de los núcleos del individuo A resultó ser más reducido en comparación con el resto de los individuos, estas medidas aún se encuentran dentro del rango normal esperado para células mononucleares (38). En la Figura 17, los asteriscos indican significancia estadística. En la Tabla 2, presentamos los valores de medición de cada individuo.

Diámetro Núcleo Linfocitos A	
Valor Mínimo	6.05 μm
Valor Máximo	7.72 μm
Promedio	6.73 μm
Desv. Est.	0.46 μm

Diámetro Núcleo Linfocitos B	
Valor Mínimo	7.02 μm
Valor Máximo	9.39 μm
Promedio	7.93 μm
Desv. Est.	0.49 μm

Diámetro Núcleo Linfocitos C	
Valor Mínimo	6.51 μm
Valor Máximo	9.14 μm
Promedio	7.97 μm
Desv. Est.	0.75 μm

Diámetro Núcleo Linfocitos D	
Valor Mínimo	6.1 μm
Valor Máximo	9.7 μm
Promedio	8.26 μm
Desv. Est.	0.72 μm

Tabla 2. Variables Estadísticas de las células mononucleares de cada Individuo. El rango de las variables que obtuvimos se encuentra dentro del rango normal para células mononucleares.

Cuantificación de Distancias entre TCs 9 y 22

Debido a que los TCs presentan formas irregulares y diversas, decidimos usar el centro de masa de cada TC para realizar las mediciones. El c. m. representa el

promedio de las posiciones de todas las partes del objeto, el cual depende de la forma del cuerpo y la distribución de su masa. Para tomar las mediciones, extendimos una línea que fue del c. m. de uno de los TCs a otro. Realizamos las siguientes mediciones:

- Distancia entre TC 9 y TC 9': Corresponde a la distancia que existe entre los dos TCs del cromosoma 9 dentro del núcleo.
- Distancia entre TC 22 y TC 22': Corresponde a la distancia que existe entre los dos TCs del cromosoma 22 dentro del núcleo.
- Distancia entre TCs 9 y TCs 22: Corresponde a las distancias entre TC9-TC22, TC9'-TC22, TC9-TC22'y TC9''TC22' dentro del núcleo.

A continuación, mostramos la Tabla 3 con datos de los valores de medición en cada individuo.

Promedio de las Distancias Individuo A			
Distancia	Entre TCs 9	Entre TCs 22	Entre TCs 9 y 22
Promedio	3.90 μm	3.18 μm	2.90 μm
Desv. Est.	0.83 μm	0.80 μm	0.99 μm
Máxima	5.43 μm	4.30 μm	5.37 μm
Mínima	2.47 μm	1.86 μm	0.85 μm
Promedio de las Distancias Individuo B			
Distancia	Entre TCs 9	Entre TCs 22	Entre TCs 9 y 22
Promedio	4.93 μm	3.69 μm	3.70 μm
Desv. Est.	1.16 μm	0.76 μm	1.35 μm
Máxima	6.90 μm	5.14 μm	6.76 μm
Mínima	3.21 μm	2.29 μm	1.14 μm
Promedio de las Distancias Individuo C			
Distancia	Entre TCs 9	Entre TCs 22	Entre TCs 9 y 22
Promedio	5.72 μm	3.70 μm	3.60 μm
Desv. Est.	1.10 μm	0.86 μm	1.52 μm
Máxima	7.55 μm	5.18 μm	6.57 μm
Mínima	3.59 μm	2.31 μm	0.93 μm
Promedio de las Distancias Individuo D			
Distancia	Entre TCs 9	Entre TCs 22	Entre TCs 9 y 22
Promedio	5.10 μm	4.01 μm	3.69 μm
Desv. Est.	1.33 μm	0.96 μm	1.08 μm
Máxima	7.18 μm	5.29 μm	6.89 μm
Mínima	3.46 μm	2.65 μm	1.34 μm

Tabla 3. Variables estadísticas de las distancias entre TCs por individuo. La tabla muestra los promedios de las medidas de las distancias entre cada TC. La distribución de los TCs es variable, e incluso presentan una mayor variabilidad en la distancia entre los TCs 9 y 22.

Estos datos nos muestran una amplia variación en las distancias entre los TCs de un mismo individuo.

Normalización de las Distancias entre los TCs 9 y 22 respecto al Tamaño del Núcleo

Para realizar una comparación entre los individuos, fue necesario normalizar el conjunto de datos de cada individuo con respecto al tamaño de sus núcleos. Una menor distancia entre TCs, puede deberse a un menor tamaño del núcleo y viceversa. Por lo tanto, transformamos las distancias en un valor proporcional al tamaño del núcleo. Para la normalización, cada distancia dentro de un núcleo fue dividida entre el diámetro nuclear mayor del mismo. Así, podemos evaluar variaciones en la cercanía entre TCs interindividual.

En la Tabla 4, se muestra el tamaño de los núcleos analizados por individuo y la normalización de las distancias respecto al tamaño del núcleo.

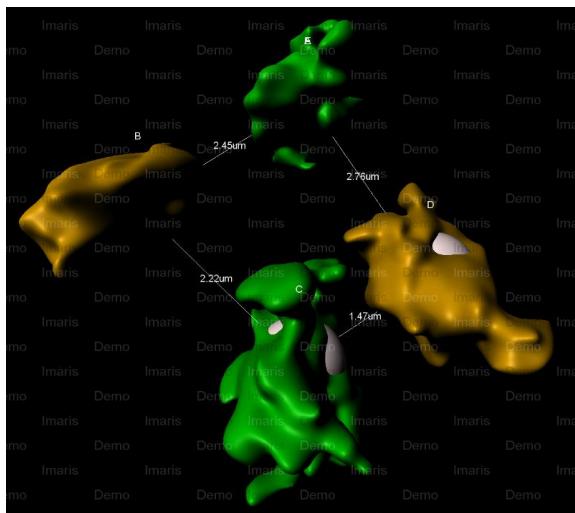
Promedio de las Distancias Normalizadas Individuo A			
Distancia	Entre TCs 9	Entre TCs 22	Entre TCs 9 y 22
Promedio	0.58	0.47	0.43
Desv. Est.	0.12	0.12	0.15
Promedio de las Distancias Normalizadas Individuo B			
Distancia	Entre TCs 9	Entre TCs 22	Entre TCs 9 y 22
Promedio	0.62	0.47	0.47
Desv. Est.	0.15	0.10	0.17
Promedio de las Distancias Normalizadas Individuo C			
Distancia	Entre TCs 9	Entre TCs 22	Entre TCs 9 y 22
Promedio	0.72	0.46	0.45
Desv. Est.	0.13	0.11	0.19
Promedio de las Distancias Normalizadas Individuo C			
Distancia	Entre TCs 9	Entre TCs 22	Entre TCs 9 y 22
Promedio	0.61	0.46	0.44
Desv. Est.	0.14	0.12	0.13

Tabla 4. Normalización de las distancias con relación al tamaño nuclear de cada individuo. En la tabla, se muestran los promedios de la medida de las distancias entre cada elemento nuclear estudiado. La distribución de los TCs es variable, e incluso se presenta una mayor variabilidad en la distancia entre los TCs 9 y 22.

En las figuras siguientes, se muestra la distribución de los datos obtenidos para cada una de las distancias evaluadas. El análisis y comparación de los datos la realizamos mediante *pruebas de Tukey* entre cada par de individuos debido a que nuestros datos tienen una distribución normal. En las figuras, los asteriscos indican significancia estadística.

Comparación de los valores mínimos de distancia entre los TCs 9:22

Tras comparar las distancias entre los TCs 9:22, notamos que la distribución posee un rango amplio por la alta variabilidad de las distancias. Debido a la relevancia funcional de la cercanía entre TCs, decidimos seleccionar sólo la distancia mínima entre TCs 9 y 22 para cada célula. Al realizar las mediciones entre TCs 9:22 obtenemos 4 distancias distintas para cada núcleo; de esas 4 distancias seleccionamos la distancia más corta para generar una tabla con los valores más pequeños por célula de cada individuo. En la Fig 19 mostramos un ejemplo de nuestro proceso de selección. A partir de esta selección, obtuvimos el rango de las distancias mínimas para cada individuo. En la Fig. 23 graficamos la distribución de estos valores mínimos. Asimismo, realizamos la *prueba de Tukey* para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los individuos.



Distancias entre TCs 9:22	
2.45 µm	2.76 µm
2.22 µm	1.47 µm

Imagen y tabla de la selección de las distancias entre los TCs 9 y 22. En la imagen se muestra la reconstrucción 3D de los TCs 9 y 22 y las distancias que existen entre ellos. En la tabla se muestran las distancias seleccionadas con fondo gris para esta distancia mínima entre

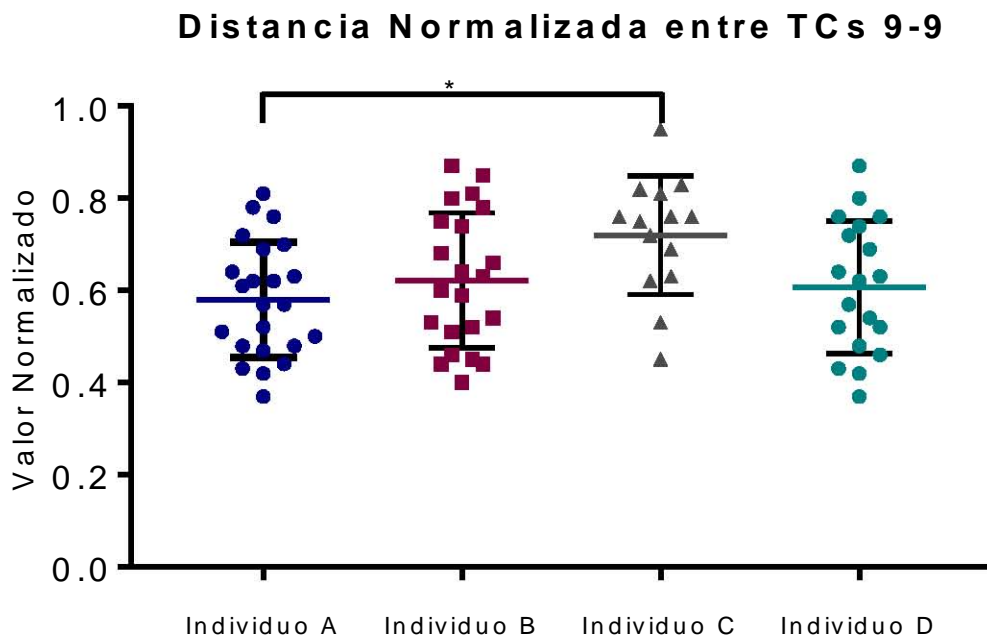
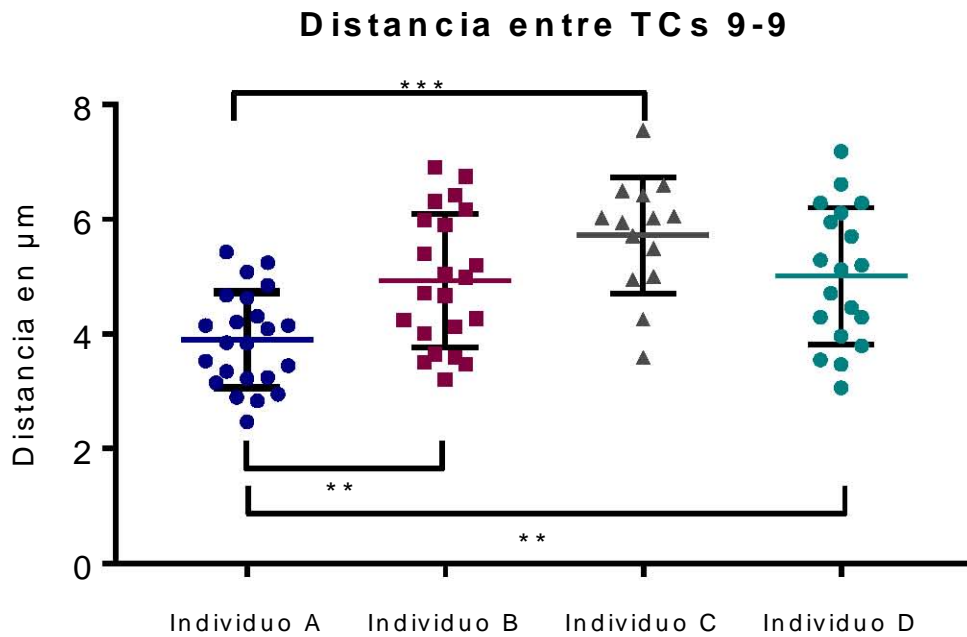
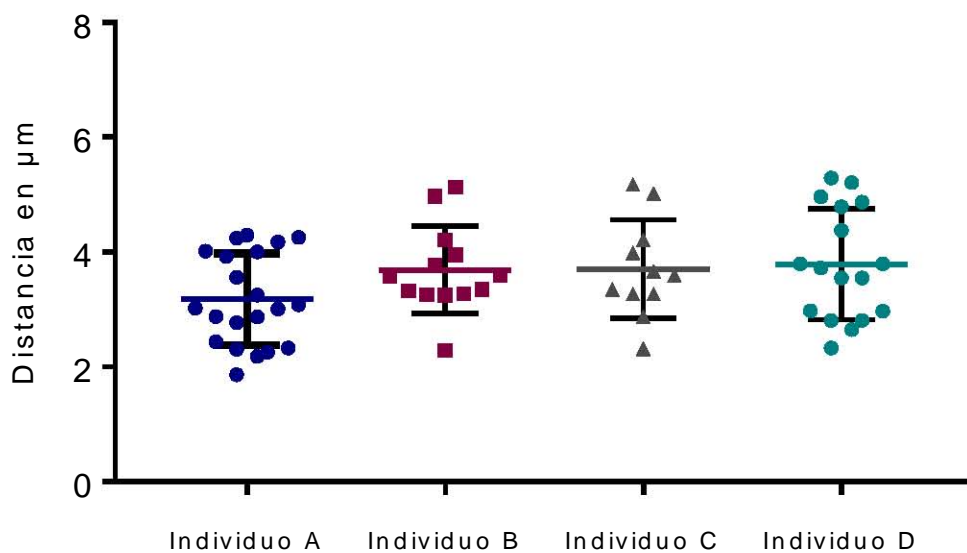


Figura 20. Gráfica de la distribución de la distancia en μm y normalizada entre TCs 9:9' por individuo. A. Existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) entre el Individuo A y el Individuo B y D con $p < 0.05$. La diferencia más significativa se presenta entre el Individuo A y C con $p < 0.001$. B. Existe una diferencia significativa entre el Individuo A y C con una $p < 0.05$. Las diferencias con los Individuos B y D se perdieron tras la normalización.

Distancia entre TCs 22:22



Distancia Normalizada entre TCs 22 - 22

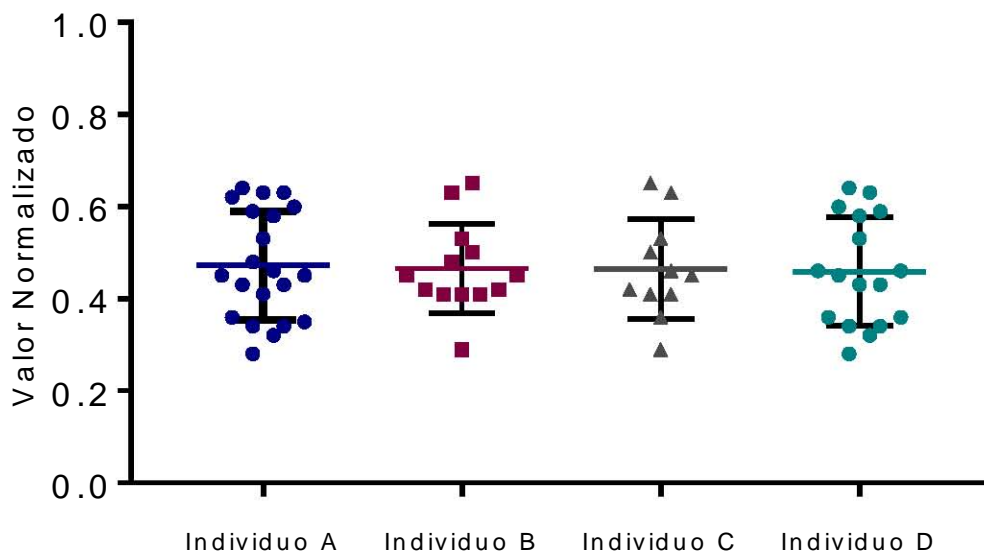


Figura 21. Gráfica de la distribución de la distancia en µm y normalizada entre TCs 22:22' por individuo. A. B. No existe ninguna diferencia estadísticamente significativa en la distancia entre los TCs 22:22 entre los diferentes Individuos. Existe un menor rango de variabilidad para los TCs 22.

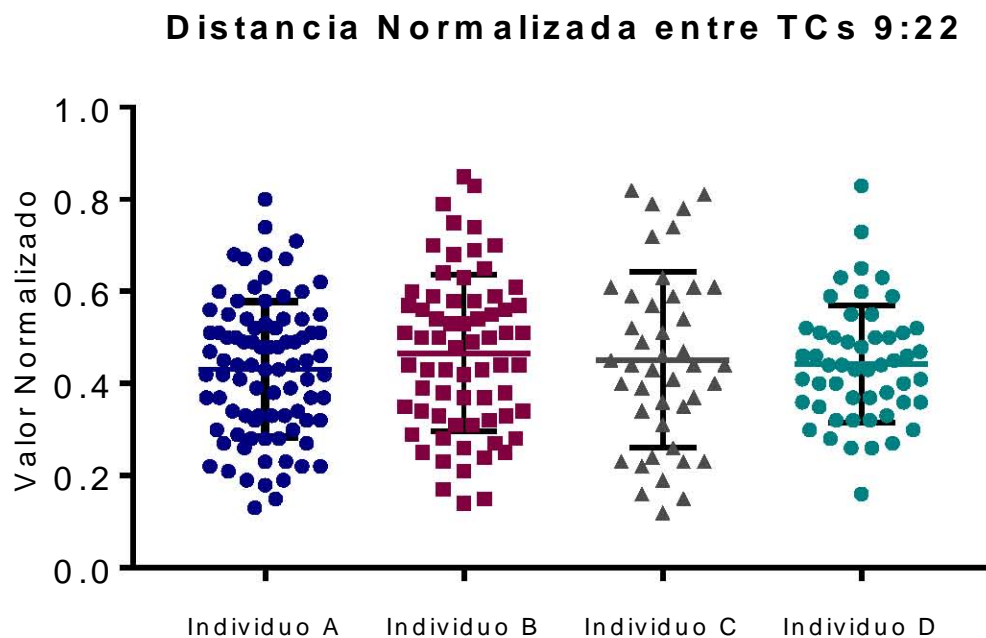
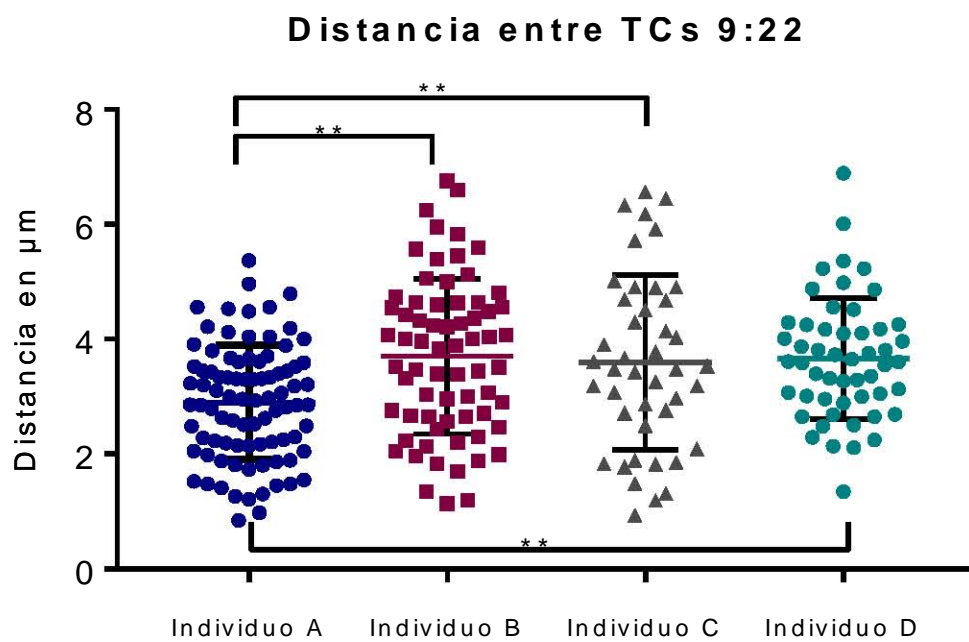
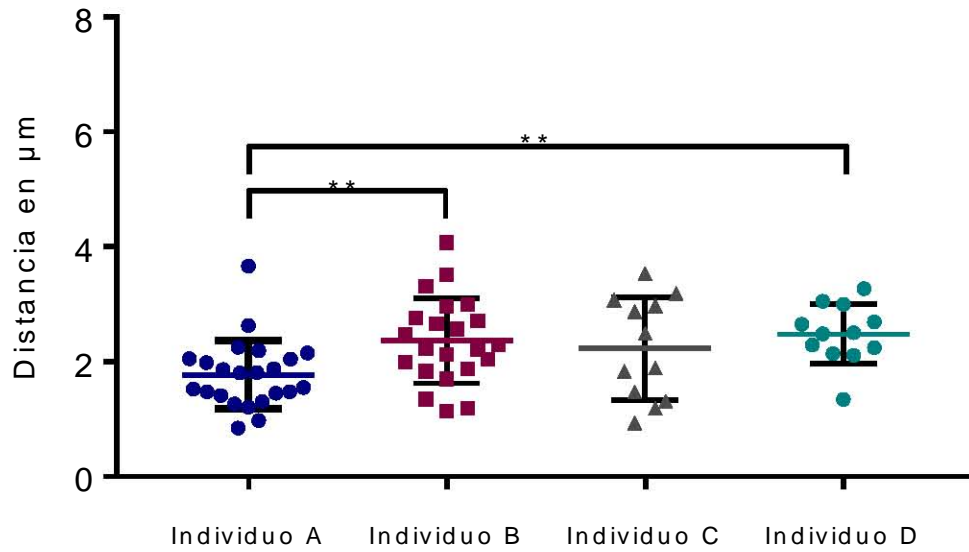


Figura 22. Gráfica de la distribución de la distancia en μm y normalizada entre TCs 9:22 por individuo. A. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre el Individuo A y los Individuos B, C y D con una $p < 0.05$. B. Tras la normalización, no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa en la distancia entre los TCs 9:22 entre los diferentes Individuos.

Distancia Mínima entre TCs 9:22



Distancia Mínima Normalizada entre TCs 9:22

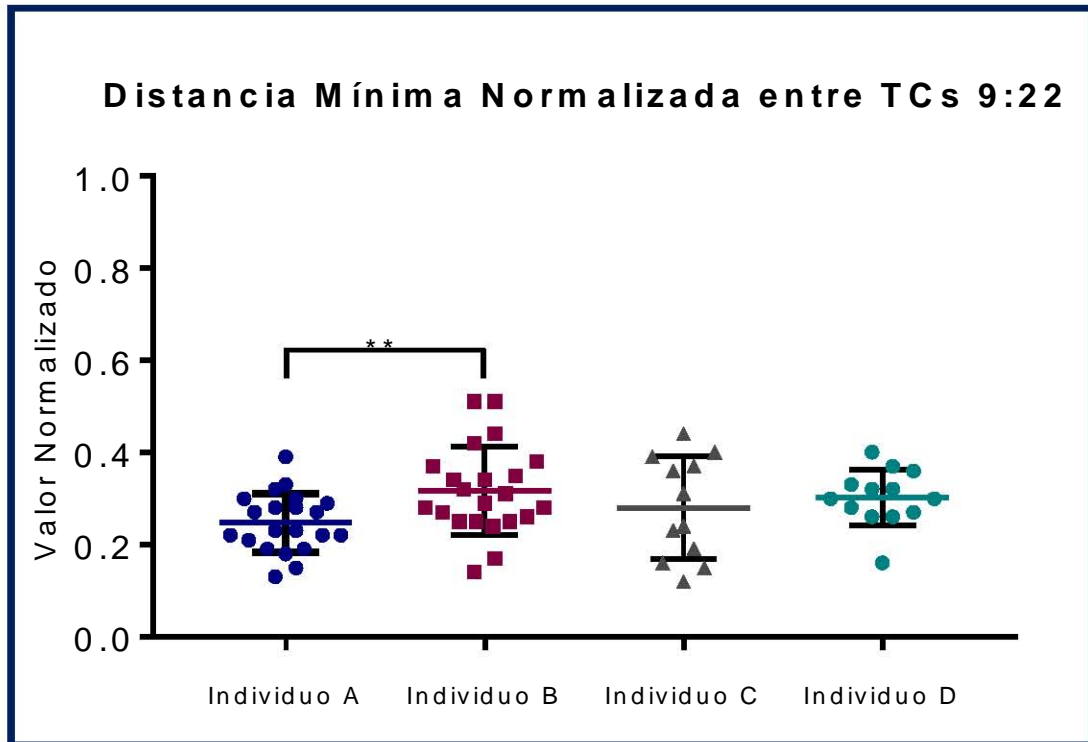


Figura 23. Gráficas de la distribución de la distancia más corta entre los TC 9:22 en μm y normalizada. A. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre el Individuo A y los Individuos B y D con una $p < 0.05$. B. Tras la normalización, sólo la diferencia estadísticamente significativa entre los Individuos A y B se mantiene con una $p < 0.05$.

Posición relativa de los TCs dentro del núcleo

Con la tinción de DAPI del núcleo reconstruimos modelos 3D del núcleo. A diferencia de los TCs, la forma de los núcleos de las células mononucleares son elipsoides regulares con deformaciones menores entre una y otra. Debido a su forma, el c. m. del núcleo se define en el centro del cuerpo elipsoide. A partir del c. m. del núcleo realizamos mediciones hasta los c. m. de cada uno de los TCs para obtener la posición radial de los TCs en relación al centro del núcleo para cada individuo. Además, realizamos la normalización de los valores de medición para determinar posibles diferencias entre los individuos. En las Fig. 24 y 25 graficamos la distribución de las mediciones con los valores originales y su distribución tras la normalización. Asimismo, realizamos la *prueba de Tukey* para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los individuos y se muestran en la Tabla 5.

Variables de las Distancias al Centro del Núcleo Individuo A				
Distancia	TCs 9:Núcleo	Norm. TCs 9:Núcleo	TCs 22:Núcleo	Norm. TCs 22:Núcleo
Promedio	2.45 μm	0.36	1.96 μm	0.29
Des. Est.	0.50 μm	0.07	0.49 μm	0.07
Máxima	3.19 μm		2.65 μm	
Mínima	0.96 μm		0.65 μm	
Variables de las Distancias al Centro del Núcleo Individuo B				
Distancia	TCs 9:Núcleo	Norm. TCs 9:Núcleo	TCs 22:Núcleo	Norm. TCs 22:Núcleo
Promedio	3.11 μm	0.39	2.17 μm	0.27
Des. Est.	0.79 μm	0.10	0.85 μm	0.11
Máxima	4.69 μm		3.47 μm	
Mínima	0.63 μm		0.43 μm	
Variables de las Distancias al Centro del Núcleo Individuo C				
Distancia	TCs 9:Núcleo	Norm. TCs 9:Núcleo	TCs 22:Núcleo	Norm. TCs 22:Núcleo
Promedio	3.64 μm	0.46	2.24 μm	0.28
Des. Est.	0.86 μm	0.11	0.48 μm	0.06
Máxima	6.02 μm		3.36 μm	
Mínima	2.10 μm		1.59 μm	
Variables de las Distancias al Centro del Núcleo Individuo D				
Distancia	TCs 9:Núcleo	Norm. TCs 9:Núcleo	TCs 22:Núcleo	Norm. TCs 22:Núcleo
Promedio	3.42 μm	0.42	2.10 μm	0.26
Des. Est.	0.57 μm	0.07	0.54 μm	0.06
Máxima	4.66 μm		3.16 μm	
Mínima	1.98 μm		1.17 μm	

Tabla 5. Variables de las distancias al Centro del Núcleo. En la tabla, se muestran los promedios de la medida de las distancias entre cada elemento nuclear estudiado. En fondo negro se muestran los valores normalizados de las distribuciones de cada individuo.

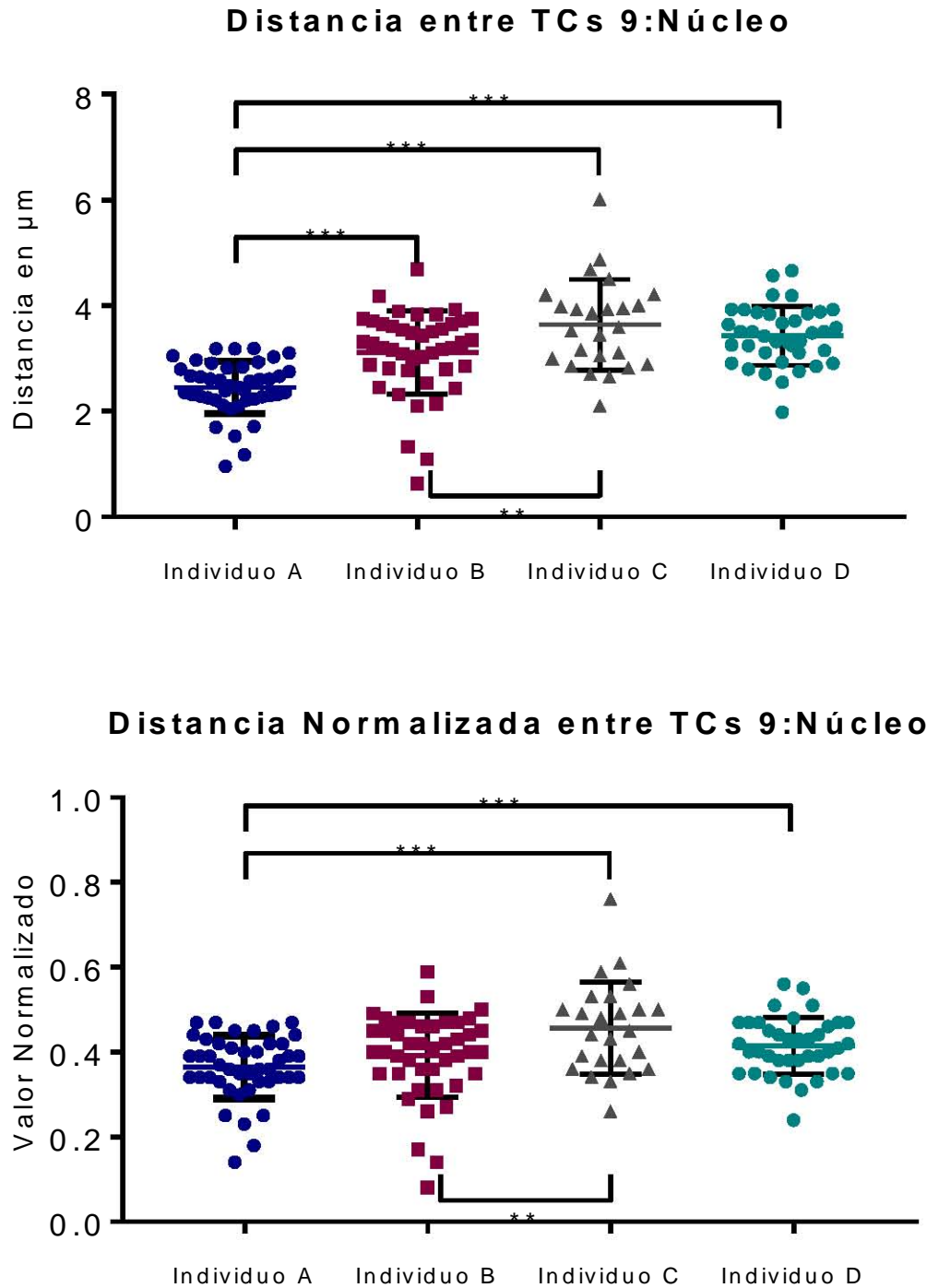
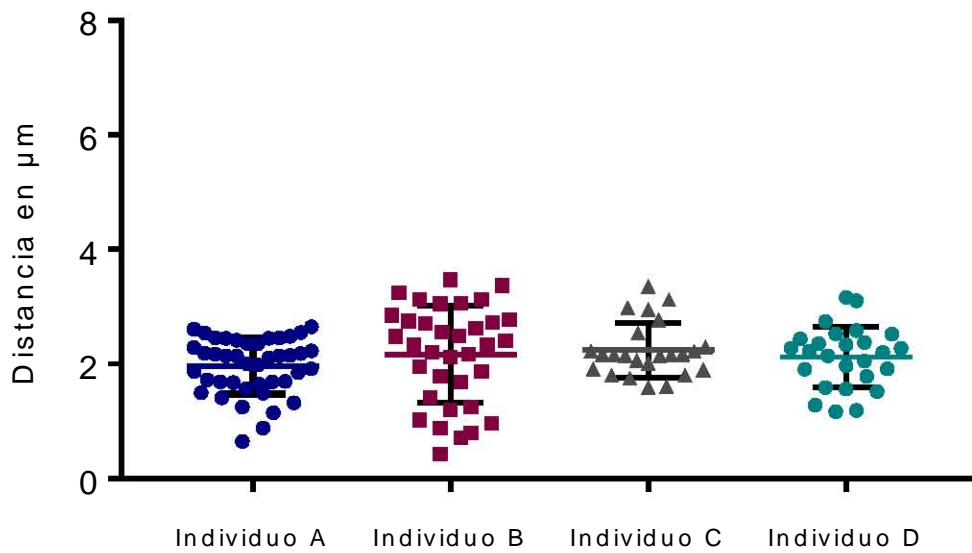


Figura 24. Gráficas de la distribución de la distancia entre los TCs 9 y el Centro del Núcleo en μm y normalizada. A. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre el Individuo A y los Individuos B, C y D con una $p < 0.001$. B. Tras la normalización, se pierde la diferencia estadísticamente significativa entre los Individuos A y B. El resto se mantienen.

Distancia entre TCs 22:Núcleo



Distancia Normalizada entre TCs 22:Núcleo

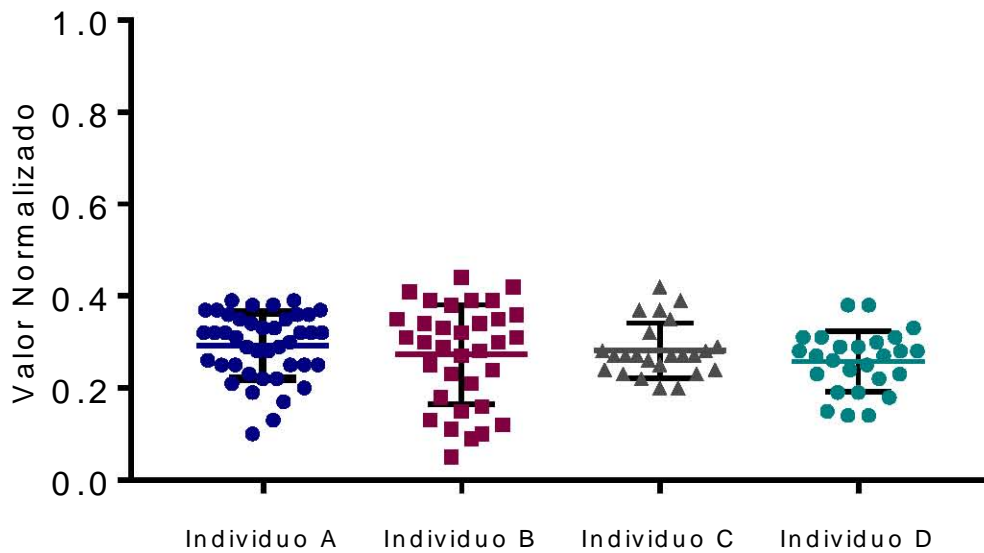


Figura 25. Gráficas de la distribución de la distancia entre los TCs 22 y el Centro del Núcleo en μm y normalizada. A. Previo a la normalización los datos no presentan diferencia significativa. B. No existen diferencias significativas en ninguno de los casos al realizar la prueba de Tukey.

Discusión y Conclusiones

Históricamente, se ha comprobado la existencia de patrones específicos en la distribución de los TCs en diferentes tipos celulares. Uno de los experimentos pioneros de Dainiak demostró la existencia de estos patrones en células mononucleadas (27). Sus resultados le permitieron generar una matriz de interacción de los TCs, indicando sólo las interacciones que se encontraran en al menos el 80% de las células estudiadas. Esta matriz es fundamental para verificar que la distribución de los TCs no ocurre aleatoriamente. Además, indirectamente, sugiere la existencia de variación en las interacciones de una célula a otra dado que sus interacciones representan sólo al 80% de las células estudiadas. El objetivo de nuestro estudio es evaluar posibles diferencias en la distribución de los TCs de un individuo a otro. Nuestro estudio muestra diferencias en la distribución espacial de los TCs 9 y 22 en diferentes individuos; y provee evidencia de una relación espacial constante entre los mismos TCs.

Uno de los conceptos clave es la conservación de la estructura nuclear. Un proceso de fijación es necesario para la hibridación de cualquier sonda para FISH y la captura de imágenes con microscopio. Los métodos tradicionales de fijación provocan, a diferentes niveles, la modificación de la estructura nuclear. Las células y todos sus componentes, entre ellos el núcleo, se deshidratan y reducen su volumen como consecuencia del proceso. Estas modificaciones podrían resultar en artefactos que dificultan la apreciación de la organización nuclear en un estado natural. Es por esto, que la conservación de la estructura nuclear fue una prioridad a lo largo del proyecto. Nuestro método, descrito en secciones anteriores, permite una buena eficiencia de hibridación con un proceso de fijación moderado.

En este proyecto reportamos por primera vez la cuantificación de las diferencias en las distancias entre los TCs de diferentes individuos sanos. En contraste con el reporte de Dimitrios donde se identificaron diferencias radiales en los 24 TCs por separado, nosotros cuantificamos y analizamos la relación espacial entre los TCs 9 y 22 en 4 individuos sanos (2).

Los resultados del proyecto corroboran los datos ya reportados sobre la variabilidad en el tamaño de los núcleos de células mononucleadas (39,40). Las imágenes en WideField muestran diferencias en el diámetro de los núcleos entre los individuos de estudio, (Fig. 17). Las diferencias en el tamaño nuclear pueden derivarse de una gran cantidad de factores, desde variaciones en el procesamiento de la muestra hasta propiedades intrínsecas de cada individuo, por lo que determinar el origen de estas diferencias se encuentra fuera del alcance del proyecto. Aunque los núcleos del individuo A son de menor tamaño en comparación con el resto de los individuos, estos aún se encuentran dentro del rango normal esperado (38). Decidimos normalizar las distancias cuantificadas con referencia al diámetro nuclear debido a las diferencias en el tamaño nuclear entre los individuos. Así, podemos encontrar las diferencias espaciales entre los TCs 9:22 entre los individuos independientes de los límites del tamaño nuclear.

Nuestras imágenes de 3D FISH soportan la hipótesis de la organización no aleatoria de los TCs en el contexto nuclear. El análisis de las imágenes caracteriza a los TCs 9 en una posición periférica y a los TCs 22 en una posición céntrica. La misma relación, 9 periférico y 22 céntrico, se presentó en todas las células analizadas en este proyecto, al igual que lo observaron el grupo de Cremer en su estudio sobre la conservación de la relación entre los TCs 19 y 18 en diferentes especies de simios (28). Esta evidencia sugiere que existen mecanismos dentro de la célula para asegurar la distribución apropiada de los TCs, además de una posible relevancia funcional en su posición. Debido a que sólo medimos 2 elementos dentro del núcleo, es imposible determinar otras relaciones espaciales. Sin embargo, la homogeneidad de esta distribución dentro de un individuo y entre individuos sustenta y fortalece nuestro estudio, ya que remarca relevancia a la organización de los diversos elementos dentro del núcleo.

El tamaño de cada TC se ha sugerido como un factor importante en la determinación de su posición en el núcleo. Según esta hipótesis, los TCs de menor tamaño poseen una posición próxima al centro y los TCs de mayor de tamaño poseen una posición próxima a la periferia nuclear. Esta distribución delimitada por el tamaño del TCs se

ha reportado en tipos celulares como fibroblastos (41). Nuestras observaciones soportan la hipótesis de una distribución espacial de los TCs determinada por el tamaño del cromosoma en células mononucleadas. Esta afirmación es sustentada por las imágenes capturadas y analizadas a lo largo del proyecto. Las Fig. 16 y 17 son una muestra de las imágenes capturadas de los núcleos de los distintos individuos, en cada imagen se aprecia una mayor cercanía al centro del TC 22, de menor tamaño que el TC 9. Esta misma relación se puede comprobar en los estudios de Dimitrios en linfocitos de diferentes sujetos de estudios.

El método SIM y las reconstrucciones tridimensionales nos permitieron medir con mayor certeza la distancia entre los elementos nucleares del proyecto. La cuantificación de las distancias con el centro de masa como punto de referencia se ha usado por especialistas en microscopía (22). Las gráficas de los datos sin normalizar presentan diferencias estadísticas derivadas del conjunto de diferencias en el tamaño del núcleo y las distancias entre los elementos nucleares.

Como era de esperarse, la normalización de los datos alteró los resultados basados en las medidas tomadas entre los TCs. Los resultados demuestran que no existe una variación significativa en el promedio de las distancias entre los TCs 9 y 22. Aunque este resultado desafía nuestra hipótesis, también sugiere una estricta organización del núcleo. Nuestras observaciones sugieren una libertad de movilidad limitada para cada TC, que incluso parece mantenerse de un individuo a otro. Dentro del ambiente 3D del núcleo, deben existir mecanismos que delimiten la posición y libertad de los diversos elementos nucleares, como los TCs. En este primer análisis, no observamos diferencias significativas en ninguna de las mediciones obtenidas.

Tras comparar las imágenes obtenidas, notamos que en un individuo era más frecuente un aparente contacto entre al menos un TC 9 y un TC 22. Con esta percepción, decidimos seleccionar sólo la distancia mínima normalizada entre TCs 9 y 22. En la Fig. 20, se muestra un ejemplo de nuestro proceso de selección. A partir de esta selección, obtuvimos el rango de las distancias mínimas para cada individuo. A pesar de la amplia variación en la distancia entre TCs 9 y TCs 22, nuestros datos sugieren que existe una diferencia significativa en las distancias

mínimas registradas por individuo. Una comparación entre las distancias mínimas entre los individuos A y B demostró la existencia de diferencias en la relación espacial de los TCs de cada individuo.

Es necesario expandir nuestros resultados preliminares a un estudio de mayor tamaño e incluir la evaluación de los posibles efectos fisiológicos de las diferencias. Evidencia reciente en linfocitos sugiere que la cromatina dentro del núcleo es una entidad dinámica y en constante movimiento (42). Esta evidencia marca la importancia de comprender los mecanismos involucrados en la distribución nuclear de los TCs y las implicaciones biológicas de los cambios en la misma. La información actual sobre estos mecanismos es correlativa, se requieren de experimentos que evalúen en tiempo real el efecto de los cambios en la distribución de los TCs.

Una de las limitaciones de nuestro proyecto fue la ausencia de una selección específica de un sólo tipo celular. La variabilidad en los resultados puede deberse a la mezcla de diferentes tipos y subtipos de células mononucleares de sangre periférica. Aunque se espera que el ~80% de las células seleccionadas sean linfocitos T (43), no podemos asegurar que cada célula analizada pertenezca a este tipo celular. Además, podrían existir variaciones en las proporciones de los tipos celulares en cada individuo derivadas de factores ambientales e intrínsecos (44). Aún seleccionando un sólo un tipo celular, como linfocitos T, nos enfrentamos a una diversidad de subtipos que podrían presentarse en diferentes proporciones en los individuos y de los que desconocemos posibles diferencias en la distribución de los TCs. La selección de un subtipo celular específico podría brindar resultados con un mayor nivel de confianza.

A pesar de las limitaciones, nuestras observaciones de variabilidad interindividual para las distancias entre los TCs 9 y 22 sugieren una heterogeneidad entre sujetos de una misma especie.

Las conclusiones de este proyecto se sintetizan en los siguientes puntos:

- 1. El tamaño del núcleo de células mononucleadas presenta diferencias estadísticamente significativas entre los individuos**
- 2. Los TCs 9 se presentan siempre en la periferia del núcleo y los TCs 22 hacia el centro del núcleo.**
- 3. La posición en relación al centro del núcleo de los TCs 9 y 22 puede asociarse al tamaño del TC.**
- 4. Los TCs 9 y 22 presentan una distribución delimitada dentro del ambiente 3D del núcleo.**
- 5. La diferencia en la distancia mínima sugiere una posible variación en las distancias entre TCs en diferentes individuos.**

Perspectivas

Para la consolidación del proyecto serán necesarias dos adiciones metodológicas al estudio: un incremento de los sujetos de estudios y la selección específica de un subtipo celular. El incremento de los sujetos de estudio proveerá de la fortaleza estadística que requiere el estudio, de tal forma, que podamos determinar con un alto grado de confianza el nivel de variabilidad interindividual para la distribución de los TCs o, incluso, confirmar o rechazar la existencia de la misma. Además, la selección específica de un subtipo celular eliminará la variabilidad intrínseca de la muestra, dada por los diferentes tipos y subtipos celulares que conforman el grupo de las MNC en sangre periférica. Esta variabilidad intrínseca es un factor que contribuye al rango de variabilidad presente en las mediciones del proyecto, ya que no sólo incluye las diferencias entre los distintos tipos celulares sino posibles diferencias en la composición de MNC entre los individuos. Nuestro proyecto sólo presenta conclusiones preliminares a un fenómeno que consideramos podría tener implicaciones clínicas. Esperamos en un futuro ser capaces de predecir el riesgo de los individuos sanos a desarrollar enfermedades como LMC.

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico	LF	Linfocitos
TC	Territorio Cromosómico	MNC	Células Mononucleares
TCs	Territorios Cromosómicos	SIM	Microscopía de Iluminación Estructurada
FISH	Hibridación Fluorescente In Situ	LMC	Leucemia Mieloide Crónica
3D FISH	Hibridación Fluorescente In Situ Tridimensional	DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
c. m.	Centro de Masa	NHBE	Línea Celular Normal de Epitelio Bronquial de Humano
BCR	Breakpoint Cluster Region	ABL	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1

Referencias

1. Collins SJ. Breakpoints on chromosomes 9 and 22 in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia (CML). Amplification of rearranged c-abl oncogenes in CML blast crisis. *J Clin Invest*. 1986 Nov 1;78(5):1392–6.
2. Ioannou D, Kandukuri L, Quadri A, Becerra V, Simpson JL, Tempest HG. Spatial Positioning of All 24 Chromosomes in the Lymphocytes of Six Subjects: Evidence of Reproducible Positioning and Spatial Repositioning following DNA Damage with Hydrogen Peroxide and Ultraviolet B. *PLoS ONE* [Internet]. 2015 Mar 10 [cited 2018 May 10];10(3). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4355486/>
3. Sathitruangsak C, Righolt CH, Klewes L, Tung Chang D, Kotb R, Mai S. Distinct and shared three-dimensional chromosome organization patterns in lymphocytes, monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Int J Cancer*. 2017 Jan 15;140(2):400–10.
4. Benson KR. T. H. Morgan's resistance to the chromosome theory. *Nat Rev Genet*. 2001 Jun;2(6):469–74.
5. Paweletz N. Walther Flemming: pioneer of mitosis research. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(1):72–76.
6. Cremer T, Cremer C. Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories. *Eur J Histochem EJH*. 2006;50(3):161.
7. O'Connor C, Miko I. Developing the chromosome theory. *Nat Educ*. 2008;1(1):44.
8. Cremer T, Cremer C. Centennial of Wilhelm Waldeyer's introduction of the term "chromosome" in 1888. *Cytogenet Genome Res*. 1988;48(2):66–7.
9. 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 m. *Eur J Histochem EJH*. 2006;50(4):223.
10. Bauman JGJ, Wiegant J, Borst P, van Duijn P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome-labelled RNA. *Exp Cell Res*. 1980 Aug 1;128(2):485–90.
11. van der Ploeg M. Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century. *Eur J Histochem EJH*. 2000;44(1):7–42.
12. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet*. 1988 Nov;80(3):224–34.

13. Cremer T, Cremer M. Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Mar;2(3):a003889.
14. Meaburn KJ, Misteli T. Cell biology: Chromosome territories. *Nature.* 2007 Jan;445(7126):379–81.
15. Zirbel RM, Mathieu UR, Kurz A, Cremer T, Lichter P. Evidence for a nuclear compartment of transcription and splicing located at chromosome domain boundaries. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol.* 1993 Jul;1(2):93–106.
16. Cremer T, Dietzel S, Eils R, Lichter R, Cremer C. Chromosome territories, nuclear matrix filaments and inter-chromatin channels: a topological view on nuclear architecture and function. :17.
17. Visser AE, Eils R, Jauch A, Little G, Bakker PJM, Cremer T, et al. Spatial Distributions of Early and Late Replicating Chromatin in Interphase Chromosome Territories. *Exp Cell Res.* 1998 Sep;243(2):398–407.
18. Visser AE. Ultrastructure of chromosomes in interphase. :9.
19. Rouquette J, Genoud C, Vazquez-Nin GH, Kraus B, Cremer T, Fakan S. Revealing the high-resolution three-dimensional network of chromatin and interchromatin space: A novel electron-microscopic approach to reconstructing nuclear architecture. *Chromosome Res.* 2009 Aug;17(6):801–10.
20. Parada LA, Misteli T. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol.* 2002 Sep;12(9):425–32.
21. Cremer T, Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet.* 2001 Apr;2(4):292–301.
22. Kozubek S, Lukášová E, Jirsová P, Koutná I, Kozubek M, Ganová A, et al. 3D Structure of the human genome: order in randomness. *Chromosoma.* 2002 Dec;111(5):321–31.
23. 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 Oct 16;15(7):899–916.
24. Bornfleth H, Edelmann P, Zink D, Cremer T, Cremer C. Quantitative Motion Analysis of Subchromosomal Foci in Living Cells Using Four-Dimensional Microscopy. *Biophys J.* 1999 Nov;77(5):2871–86.
25. Kurz A, Lampel S, Zirbel RM, Cremer T, Lichter P. Active and Inactive Genes Localize Preferentially in the Periphery of Chromosome Territories. *J Cell Biol.* 1996;135:11.
26. Dernburg AF, Broman KW, Fung JC, Marshall WF, Philips J, Agard DA, et al. Perturbation of Nuclear Architecture by Long-Distance Chromosome Interactions. *Cell.* 1996 May;85(5):745–59.

27. Balajee AS, Sanders JT, Gollosi R, Shuryak I, McCord RP, Dainiak N. Investigation of Spatial Organization of Chromosome Territories in Chromosome Exchange Aberrations After Ionizing Radiation Exposure: *Health Phys.* 2018 Jul;115(1):77–89.
28. Tanabe H, Muller 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.* 2002 Apr 2;99(7):4424–9.
29. Branco MR, Pombo A. Intermingling of Chromosome Territories in Interphase Suggests Role in Translocations and Transcription-Dependent Associations. Becker P, editor. *PLoS Biol.* 2006 Apr 25;4(5):e138.
30. Foster HA, Estrada-Girona G, Themis M, Garimberti E, Hill MA, Bridger JM, et al. Relative proximity of chromosome territories influences chromosome exchange partners in radiation-induced chromosome rearrangements in primary human bronchial epithelial cells. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2013 Aug;756(1–2):66–77.
31. Ismail SI, Naffa RG, Yousef A-MF, Ghanim MT. Incidence of bcr-abl fusion transcripts in healthy individuals. *Mol Med Rep.* 2014 Apr;9(4):1271–6.
32. Isolation of Mononuclear Cells Methodology and Applications. :20.
33. Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol.* 2010 Jul 26;190:165–75.
34. Kraus F, Miron E, Demmerle J, Chitiashvili T, Budco A, Alle Q, et al. Quantitative 3D structured illumination microscopy of nuclear structures. *Nat Protoc.* 2017 May;12(5):1011–28.
35. Heintzmann R, Huser T. Super-Resolution Structured Illumination Microscopy. *Chem Rev.* 2017 Dec 13;117(23):13890–908.
36. Wegel E, Göhler A, Lagerholm BC, Wainman A, Uphoff S, Kaufmann R, et al. Imaging cellular structures in super-resolution with SIM, STED and Localisation Microscopy: A practical comparison. *Sci Rep.* 2016 Jun 6;6:27290.
37. Giambattista A, Richardson BMC, Richardson RC. *College physics.* Boston: McGraw Hill; 2007.
38. Kuse R, Schuster S, Schöbbe H, Dix S, Hausmann K. Blood lymphocyte volumes and diameters in patients with chronic lymphocytic leukemia and normal controls. *Blut.* 1985 Apr;50(4):243–8.
39. Khvastunova AN, Kuznetsova SA, Al-Radi LS, Vylegzhanina AV, Zakirova AO, Fedyanina OS, et al. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Sci Rep.* 2015 Jul 27;5:12573.
40. Dardick I, Sinnott NM, Hall R, Bajenko-Carr TA, Setterfield G. Nuclear morphology and morphometry of B-lymphocyte transformation. Implications for follicular center cell lymphomas. *Am J Pathol.* 1983 Apr;111(1):35–49.

41. Sun HB, Shen J, Yokota H. Size-Dependent Positioning of Human Chromosomes in Interphase Nuclei. *Biophys J*. 2000 Jul 1;79(1):184–90.
42. Dion V, Gasser SM. Chromatin movement in the maintenance of genome stability. *Cell*. 2013 Mar 14;152(6):1355–64.
43. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cited 2019 Jan 17]. p. 161–7. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_15
44. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, Neuland CY, Pankiw-Trost LK, Blattner WA, et al. The influence of age, race, and gender on peripheral blood mononuclear-cell subsets in healthy nonsmokers. *J Clin Immunol*. 1989 May;9(3):214–22.