Facultad de Medicina
Escuela de Medicina

"Efecto de la fijación química en el reconocimiento de estructuras G-cuádruplex en el DNA"

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

HUGO HERRERA ZELAYA

Director de Tesis: Sebastián San Martín Henríquez
Codirector de Tesis: Mario Párraga San Román

Marzo / 2019

Facultad de Medicina
Escuela de Medicina

"Efecto de la fijación química en el reconocimiento de estructuras G-cuádruplex en el DNA"

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

HUGO HERRERA ZELAYA

Director de Tesis: Sebastián San Martín Henríquez
Codirector de Tesis: Mario Párraga San Román

FECHA: Marzo / 2019

Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

"Efecto de la fijación química en el reconocimiento de estructuras G-cuádruplex en el DNA"

HUGO HERRERA ZELAYA

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Dr. Sebastián San Martin y Mario Párraga en los laboratorios de Ciencias morfológicas y biología molecular de la espermatogénesis del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Valparaíso, y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. José Luis Bucarey Presidente Comisión	Dr. Patricio Orio Profesor Informante	Dr. Claudio Aguayo Profesor Informante

Dr. Sebastián San Martín
Director de Tesis

Viña del Mar, Chile
2019

I. AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mis profesores guía Sebastián San Martin y Mario Párraga, por la ayuda y apoyo que me brindaron para la realización de esta tesis. Como mención especial, también agradezco a Ivo Carrasco. Sus consejos, correcciones y discusiones en las distintas etapas de este proyecto se hicieron indispensables para seguir avanzando.
También agradezco a Joan Villena, Juan Varas y Claudio Córdova, por la disposición y ayuda en los diferentes laboratorios en los que realice mis experimentos.
Muchas gracias a todos.

II. ABREVIATURAS

G	Guanina
G4	G-cuádruplex
G4-DNA	Estructura G-cuádruplex en el DNA
G4-RNA	Estructura G-cuádruplex en el RNA
mRNA	RNA mensajero
hTERT	Subunidad catalítica de la telomerasa humana
PQS	Secuencias G-cuádruplex putativas
DMS	Dimetil Sulfato
FRET	Transferencia de energía entre fluorocromos
IHQ	Inmunohistoquímica
IF	Inmunofluorescencia
SFB	Suero fetal bovino
MeOH	Metanol
PFA	Paraformaldehído

III. ÍNDICE

1. Introducción 1
1.1. Antecedentes 1
1.2. Estructuras G-cuádruplex 2
1.2.1. Diversidad conformacional de las estructuras G-cuádruplex 4
1.3. Función biológica de las estructuras G-cuádruplex 6
1.3.1. Inhibición de la extensión de los telómeros 6
1.3.2. Regulación de la expresión de genes 7
1.3.3. Expresión de isoformas proteicas mediante procesamiento de mRNA 8
1.3.4. Detención de las horquillas de replicación 8
1.3.5. Contribución en la inestabilidad genética 9
1.4. Métodos de estudio de estructuras G-cuádruplex 9
1.4.1. Métodos de estudio *In Sílico* 9
1.4.1.1. Algoritmo Quadparser 9
1.4.2. Métodos de estudio *In Vitro* 10
1.4.2.1. DMS Footprinting 10
1.4.2.2. Transferencia de energía entre fluorocromos (FRET) 11
1.4.3. Métodos de estudio *In Vivo* 11
1.4.3.1. Sondas pequeñas (small-molecule probe) 11
1.4.3.2. Anticuerpos 12
1.5. Planteamiento del problema 13
1.6. Pregunta de investigación 14
2. Hipótesis 16
3. Objetivo general 16
4. Objetivos específicos 16
5. Metodología 17
5.1. Diseño experimental general 17
5.2. Cultivo celular 17
5.2.1. Tiempo de duplicación 17
5.3. Sincronización de ciclo celular en la línea celular humana MCF-7 18
5.3.1. Sincronización de cultivos en G0/G1 19
5.3.2. Sincronización de cultivos en G1/S 19

5.3.3. Sincronización de cultivos en S 20
5.3.4. Ensayo de ciclo celular 22
5.3.5. Procesamiento de datos para sincronización de ciclo celular 22
5.3.6. Análisis Estadístico para sincronización de ciclo celular 23
5.4. Estandarización de inmunofluorescencia 24
5.4.1. Prueba RNasa y permeabilización 24
5.4.2. Titulación BG4 e HIS 25
5.4.3. Ensayos de métodos de fijación 25
5.5. Cuantificación de los sitios marcados con un anticuerpo anti-G-cuádruplex en células MCF-7 fijadas con paraformaldehído o fijadas con metanol, mediante inmunofluorescencia in situ 25
5.5.1. Experimento control de estrés celular 26
5.5.2. Procesamiento de imágenes 27
5.5.3. Cuantificación de focos fluorescentes 27
5.5.4. Análisis estadístico de la cuantificación de focos fluorescentes 27
6. Resultados 29
6.1. Sincronización de cultivos celulares 29
6.1.1. Tiempo de duplicación de la línea celular MCF-7 29
6.1.2. Sincronización de cultivos en G0/G1 30
6.1.3. Sincronización de cultivos en G1/S 31
6.1.4. Sincronización de cultivos en S 33
6.2. Estandarización de inmunofluorescencia 36
6.2.1. Prueba RNasa y permeabilización 36
6.2.2. Titulación de anticuerpos BG4 e HIS 38
6.2.3. Ensayos de fijación 38
6.3. Cuantificación de los sitios marcados con un anticuerpo anti-G-cuádruplex en células de la línea celular MCF-7 fijadas con paraformaldehído o fijadas en metanol, mediante inmunofluorescencia *in situ* 41
6.3.1. Experimento control de inmunomarcación del anticuerpo BG4 en estrés celular 42
6.3.2. Análisis estadístico y comparación de la inmunomarcación del anticuerpo BG4 en células MCF-7 fijadas con paraformaldehído o metanol 43
7. Discusión 45
7.1. Aproximaciones metodológicas para la inmunodetección de estructuras G-cuádruplex 45

7.2. Gránulos de estrés celular 48
8. Conclusión 50
9. Bibliografía 51
10.Anexos 59
10.1. Anexo 1. Protocolo tinción con yoduro de propidio para análisis de ciclo celular 59
10.2. Anexo 2. Protocolo de inmunofluorescencia para células cultivadas en cubreobjetos utilizando el anticuerpo BG4. 61
10.3. Anexo 3. Procesamiento de imágenes 63
10.4. Anexo 4. Cuantificación de señal inmunofluorescente mediante ITCN 64
10.5. Anexo 5. Histogramas de ciclo celular 66
10.5.1. Sincronización de cultivos en G0/G1 66
10.5.2. Sincronización de cultivos en G1/S 68
10.5.3. Sincronización de cultivos en S 69
10.6. Anexo 6. Test estadísticos ciclo celular 73
10.6.1. Sincronización de cultivos en G0/G1 73
10.6.1.1. %G1 73
10.6.1.2. %S 74
10.6.1.3. %G2 74
10.6.2. Sincronización de cultivos en G1/S 75
10.6.2.1. %G1 75
10.6.2.2. %S 76
10.6.2.3. %G2 77
10.6.3. Sincronización de cultivos en S 78
10.6.3.1. %G1 78
10.6.3.2. %S 78
10.6.3.3. %G2 79
10.7. Anexo 7: Ensayo piloto y test estadísticos en el conteo de focos inmunofluorescentes 80
10.7.1. Experimento piloto 80
10.7.2. Test estadísticos 80

IV. RESUMEN

En el DNA, la unión de 4 guaninas mediante enlaces de hidrógeno diferentes a los propuestos por Watson y Crick, da lugar a la formación de una estructura cuadrada y plana llamada tétrada-G, y el apilamiento de 3 o más de estas estructuras se conoce como G-cuádruplex.

A comienzos del siglo XXI y con el avance de técnicas biofísicas y de biología molecular, se descubrió la presencia de G-cuádruplex en el macronúcleo del protozoo *Stylonchia lemnae*. En el año 2013 se demostró mediante un anticuerpo específico llamado BG4 la presencia de estas estructuras en células humanas fijadas con formaldehído. Este anticuerpo se une a (interacciona) su antígeno (estructura G-cuádruplex) mediante el censado de una estructura tridimensional más que el de una secuencia nucleotídica. Esto supone un desafío al momento de ser ocupado en estudios inmunohistoquímicos e inmunofluorescentes, ya que fijadores de tipo aditivos como el formaldehido actúan creando enlaces proteína/proteína y proteína/DNA que podrían interferir con el reconocimiento de las estructuras G-cuádruplex mediante anticuerpos. En esta investigación se utilizó el anticuerpo BG4 para comparar la capacidad de inmunodetectar estructuras G-cuádruplex en células MCF-7 fijadas con paraformaldehído o metanol. Mediante microscopia de fluorescencia se evidenció en células fijadas con metanol un 73% más de focos fluorescentes en comparación con células fijadas con paraformaldehído ($p<0.0001$). Esto indica que el método de fijación que se utilice al estudiar estructuras G-cuádruplex mediante anticuerpos, influye en la cantidad relativa de focos fluorescentes detectados.

Palabras clave: Tétrada-G, G-cuádruplex, BG4, Formaldehido, Inmunofluorescencia.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

De acuerdo con el modelo propuesto por Watson y Crick en 1953, la estructura de la molécula de DNA consiste en dos cadenas de polinucleótidos unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno entre las bases complementarias, formando una doble hélice de rotación hacia la derecha con 10 pares de bases por giro (1). Esta conformación es conocida como la forma B del DNA (B-DNA) la cual predomina en condiciones fisiológicas (2). El DNA de doble hebra también se puede encontrar en otras formas, como la A (A-DNA) donde la doble hélice está conformada por 11 pares de bases por giro, lo que la hace más gruesa y compacta que la forma B; y la forma Z, con una hélice que contiene 12 pares de base por giro y posee una rotación hacia la izquierda que la hace más larga y delgada (2). Los ácidos nucleicos además pueden adoptar estructuras secundarias no canónicas, como las estructuras cruciformes o de Holliday, hebras triples, Motivos I, u otros (**Fig.1**). Dentro de estas, una estructura secundaria no canónica poco conocida que ha adquirido importancia son las estructuras G-cuádruplex (3).

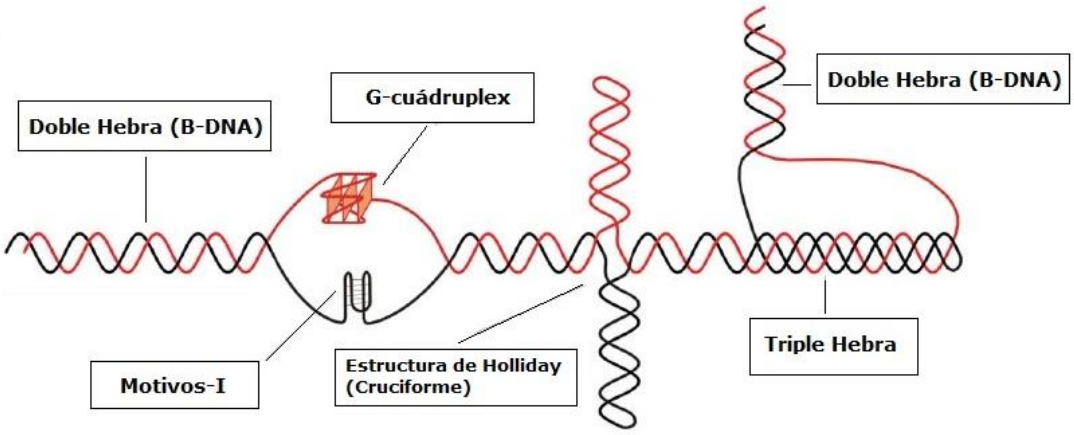


Figura 1. Esquema con las estructuras secundarias no canónicas más relevantes y la forma B del DNA. Figura adaptada de *Armas et al* (3).

En 1910, aproximadamente 50 años antes del descubrimiento de la doble hélice del DNA, se había reportado que soluciones concentradas de ácido poliguanílico (guanosina monofosfato) eran capaces de formar geles en presencia de cationes

monovalentes (4). Posteriormente en 1962, y haciendo uso de cristalografía de rayos X, *Gellert et al.* (5) propusieron un modelo para explicar este fenómeno: los geles compuestos por guanosina 5' monofosfato estaban formados a nivel molecular por el ensamblaje de 4 bases de guanina de manera ordenada formando una estructura cuadrada y plana llamada tétrada-G (**Fig. 2A**). Posteriormente *Zimmerman et al*. (6) corroboraron esta información y propusieron que las tétradas se apilaban una encima de otra, para formar estructuras helicoidales de 4 hebras llamadas G-cuádruplex (**Fig. 2B**).

Después de la publicación de *Gellert et al.* (5) y durante años, estas estructuras permanecieron como material de interés de investigación solo para los biofísicos, y no fue hasta la década de los 80 cuando estas se volvieron de interés para los investigadores en ciencias biológicas: en 1988 *Sen y Gilbert* (7) propusieron como hipótesis que ciertas zonas genómicas ricas en guanina, y de importancia biológica como los telómeros o las secuencias de recombinación de los genes de las inmunoglobulinas, podrían formar estas estructuras *in vivo* y tener un rol en procesos de importancia en la célula. Luego en los 90, se demostró que secuencias de oligonucleótidos ricos en Guanina podían plegarse y adoptar conformaciones de G-cuádruplex *in vitro* (8). En las décadas siguientes la evidencia recopilada reforzó la posibilidad de la existencia de G-cuádruplex *in vivo*, mediante la demostración que ellas podían formarse en regiones promotoras de diversos genes (9), en transcritos de RNA (10,11) y telómeros (12), así como también la identificación de proteínas encargadas de desenrollarlas (13). Cabe señalar que en los estudios citados la identificación de estructuras G-cuádruplex fue logrado utilizando técnicas biofísicas y bioquímicas realizadas *in vitro*. Finalmente, el conocimiento adquirido hasta la actualidad sobre estas estructuras en conjunto con el avance de nuevas tecnologías, han permitido visualizar G-cuádruplex en primer lugar, en el macronúcleo del protozoo *Stylonychia lemnae* (14), y posteriormente en células de mamíferos *in situ*, dando evidencias directas de la existencia de estas estructuras en el DNA y RNA de células de mamíferos (15,16).

1.2. Estructuras G-cuádruplex

La base a partir de la cual se constituye una estructura G-cuádruplex es la **tétrada-G**. Una tétrada-G está compuesta por la unión de 4 bases de guanina, de

manera ordenada en una estructura cuadrada y plana (17) que se encuentra estabilizada mediante enlaces de hidrógeno diferentes a los propuestos por Watson y Crick, llamados **enlaces de Hoogsteen** (18).(**Fig. 2A**). En una tétrada G, los átomos N1 y el N2 de una guanina forman enlaces de hidrógeno con los átomos O6 y N7 de la base adyacente, produciendo 8 enlaces por cada tétrada-G (19). Estas estructuras cíclicas pueden apilarse una encima de otra presumiblemente mediante interacciones pi-pi (∏-∏) formando estructuras helicoidales compuestas por 4 hebras de DNA que se denominaron **G-cuádruplex** (20)(**Fig. 2B**).

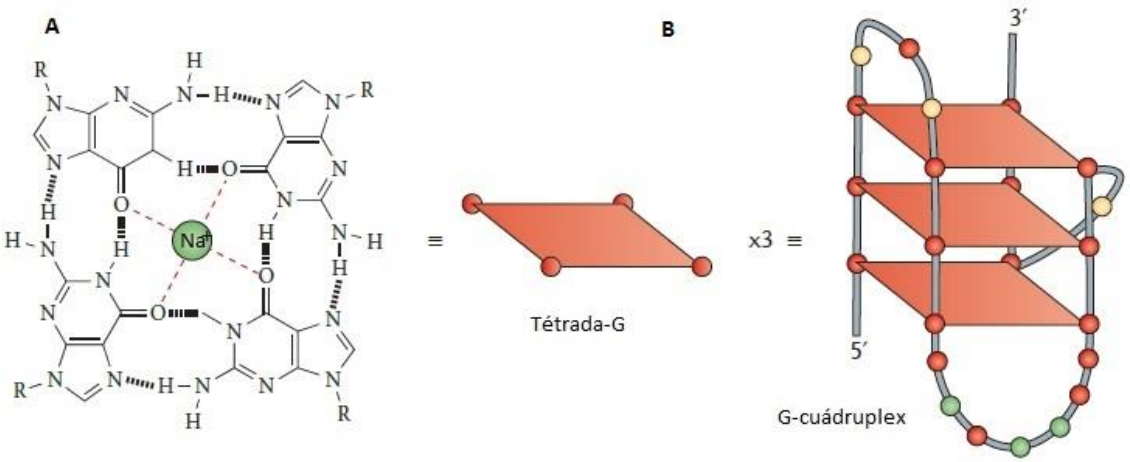


Figura 2. A: Una tétrada-G con Guaninas unidas mediante enlaces de Hoogsteen y estabilizada por un catión monovalente **B:** Estructura G-cuádruplex a partir del apilamiento de 3 tétradas-G. Esferas rojas representan Guaninas mientras que esferas de otros colores representan otras bases nitrogenadas. Figura adaptada de *Balasubramanian et al* (21).

Las tétradas-G se conectan entre si mediante bucles que contienen secuencias de nucleótidos que no participan en la formación de la estructura G-cuádruplex, pero que forman parte de la secuencia a partir de la cual se formó la estructura (**Fig. 2B**). Como consenso, la evidencia indica que estos bucles pueden contener de 1 a 7 nucleótidos de extensión (22).

El arreglo plano y cuadrado que forman las 4 guaninas en una tétrada-G, da como consecuencia que los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de cada guanina apunten hacia el eje de la hélice en la parte central de la estructura (**Fig. 3A**). Las repeticiones de tétradas-G apiladas resultan en la formación de un canal central de carácter electronegativo (23)(**Fig. 3B**). Para evitar la repulsión electrostática las estructuras G-cuádruplex son estabilizadas mediante cationes monovalentes que

interactúan con los oxígenos de los grupos carbonilo de 1 o 2 tétradas-G cercanas, dependiendo si el catión corresponde a Na^+ o K^+ respectivamente (20)(**Fig. 3C**).

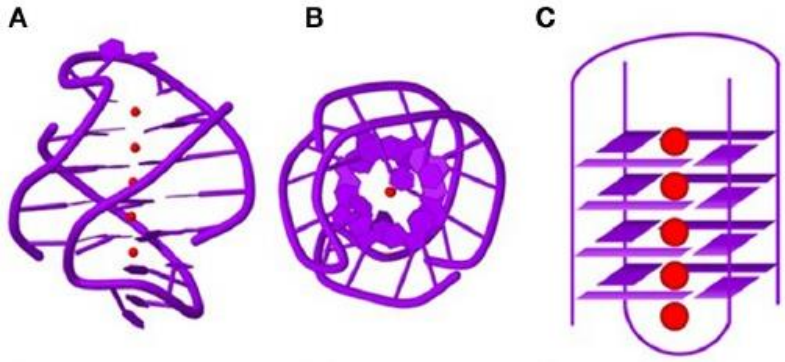


Figura 3. A: Modelo en 3D de Estructura G4 vista lateral. **B:** Modelo en 3D de Estructura G4 vista superior. **C:** Esquema de una estructura G-cuádruplex estabilizada por catión potasio representado por las esferas rojas. Figura adaptada de *Bhattacharyya et al* (24).

1.2.1. Diversidad conformacional de las estructuras G-cuádruplex

Algo que caracteriza a estas estructuras es su alta diversidad estructural (25). Ensayos *in vitro* mediante técnicas biofísicas han identificado una gran variedad de topologías, pero a modo general, las estructuras G4 son clasificadas en:

- Tetramoleculares paralelas o antiparalelas: formado por un solo tramo de repeticiones de guanina dentro de una secuencia de DNA en cuatro hebras de DNA individuales (**Fig. 4A**)
- Bimoleculares paralelas o antiparalelas: Una secuencia de DNA que contenga dos tramos de repeticiones de guanina puede formar horquillas que, junto a otra molécula de DNA con características similares, pueden dimerizar para formar G-cuádruplex. (**Fig. 4B**)
- Intramoleculares paralelos o antiparalelos: Finalmente, si una secuencia de DNA posee 4 tramos de guaninas separados por algunos nucleótidos, se puede doblar sobre sí misma para formar una estructura G-cuádruplex. (**Fig. 4C**)

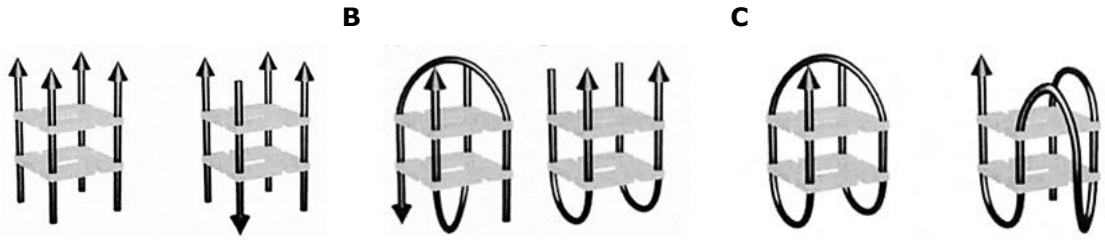


Figura 4. A: G4 tétramolecular paralelo y antiparalelo. **B:** G4 bímolecular antiparalelos. **C:** G4 intramolecular antiparalelos. Figura adaptada de *Simonsson et al* (25)

De esta clasificación general, las estructuras G-cuádruplex intramoleculares (**Fig. 4C**) han sido las mejor estudiadas y caracterizadas, debido principalmente a la posibilidad de encontrar estas estructuras *in vivo* (26).

En una situación *in vitro*, secuencias de ácidos nucleicos que contengan al menos 4 tramos de guanina y bajo condiciones fisiológicas de K^+ o Na^+ pueden formar fácilmente estructuras G-cuádruplex (27). Distinto es el caso de la situación *in vivo*: la formación de estructuras G-cuádruplex posiblemente estaría impedida debido a que la mayoría de las regiones del DNA con secuencias ricas en guanina se encuentran en forma de doble hebra mediante los clásicos puentes de hidrógeno, además el DNA genómico se encuentra unido a proteínas y otras enzimas reguladoras. Sumado a esto, en condiciones *in vitro* la formación de estructuras G-cuádruplex requiere altas concentraciones de DNA y cationes estabilizadores, pero dentro de la célula, las cantidades de DNA son menores que las obtenidas *in vitro* (26), lo que hace más difícil que se puedan formar estructuras G4 bimoleculares o tetramoleculares.

Lo anterior sugiere que, si estas estructuras se forman en secuencias de ácidos nucleicos dentro de la célula, las condiciones que favorecen su plegamiento deben ser más específicas. Por lo anterior, los procesos celulares que inducen la separación local y momentánea del DNA doble hebra, o las regiones donde se puedan encontrar mono-hebras de DNA, son modelos utilizados para evaluar la posible formación de estas estructuras *in vivo*.

Sumado a lo anterior, la identificación de diversas proteínas que interactúan de manera específica con las estructuras G-cuádruplex, reforzó la hipótesis de que estas podían formarse en un contexto *in vivo* en el DNA de las células.

Investigaciones han identificado proteínas que interactúan con estructuras G-cuádruplex presentes en los telómeros, como POT1 (28); helicasas específicas que reconocen y desenrollan las estructuras G4 como BLM (29), WRN, Pif1 (30), XPD y XPB (31), y también helicasas específicas para RNA como RHAU (32,33). De manera

reciente, se han detectado proteínas que interactúan con estructuras G-cuádruplex presentes en regiones promotoras como la Nucleolina en el promotor de c-*MYC* (34).

1.3. Función biológica de las estructuras G-cuádruplex

1.3.1. Inhibición de la extensión de los telómeros

Uno de los primeros lugares dentro del genoma en donde se postuló que podrían existir los G-cuádruplex fue en los telómeros (7). Los telómeros humanos consisten en secuencias cortas en tándem que se repiten aproximadamente unas mil veces y siguen la formula d(TTAGGG)n. Mientras que la mayor parte de las repeticiones se encuentran en forma de doble hebra con sus pares de bases complementarios, el extremo final 3' de ambas hebras contiene una región de DNA monohebra de 200 nucleótidos aproximadamente, el cual se curva hacia atrás y forma un lazo (llamado T-loop) el cual, en conjunto con un complejo proteico llamado shelterin (35) protege el extremo del cromosoma de enzimas degradativas (36). Cuando no se encuentra unida al complejo shelterin, esta secuencia telomérica 3' monohebra es capaz de plegarse en estructuras G-cuádruplex (12) de tipo paralelas o antiparalelas dependiendo si el catión estabilizador corresponde a K^+ o Na^+ respectivamente (37).

En células no neoplásicas, los telómeros se acortan con cada replicación a causa de la inhabilidad de la DNA polimerasa para replicar los extremos de los cromosomas (38). Este acortamiento es una de las principales características de la senescencia celular. En las células tumorales se expresa la enzima telomerasa, que es una transcriptasa reversa la cual extiende la longitud de los telómeros y es la que le proporciona a la célula tumoral la característica de inmortalidad replicativa (39). Se hipotetiza que una secuencia telomérica formando una estructura G-cuádruplex impediría que la telomerasa pueda extender los telómeros. Para probar esta hipótesis, se han empleado moléculas ligando como porfirinas y acridinas, compuestos que estabilizan estas estructuras en células tumorales e impiden su resolución por helicasas específicas de G4 como BLM y WRN (30), evitando de esta manera que la telomerasa pueda unirse al telómero para extenderlo (12).

1.3.2. Regulación de la expresión de genes.

La regulación de la expresión de genes mediada por estructuras G-cuádruplex sigue sin ser esclarecida completamente. Al respecto se han planteado dos hipótesis, cada una de las cuales variará dependiendo de la hebra del DNA donde se formaría el G4. La primera hipótesis indica que la formación de estructuras G4 en la región promotora del gen puede impedir el reclutamiento de factores de transcripción y la maquinaria transcripcional por la formación de estructuras G4 en la hebra molde (21,40). Esta hipótesis también plantea que la formación de una estructura G4 en la hebra codificante aumentaría la transcripción debido a que la hebra molde se mantendría accesible para la unión de factores que iniciarían nuevamente la transcripción (41)(**Fig. 5A**). La segunda hipótesis plantea la regulación de genes mediante la formación de G-cuádruplex en regiones codificantes del gen (41); al formarse un G4 en la hebra molde del gen, se impediría la acción de la RNA polimerasa II, finalizando la transcripción (41) Por otro lado, una estructura G4 en la hebra codificante facilitaría la transcripción de un nuevo mRNA (3)(**Fig. 5B**)

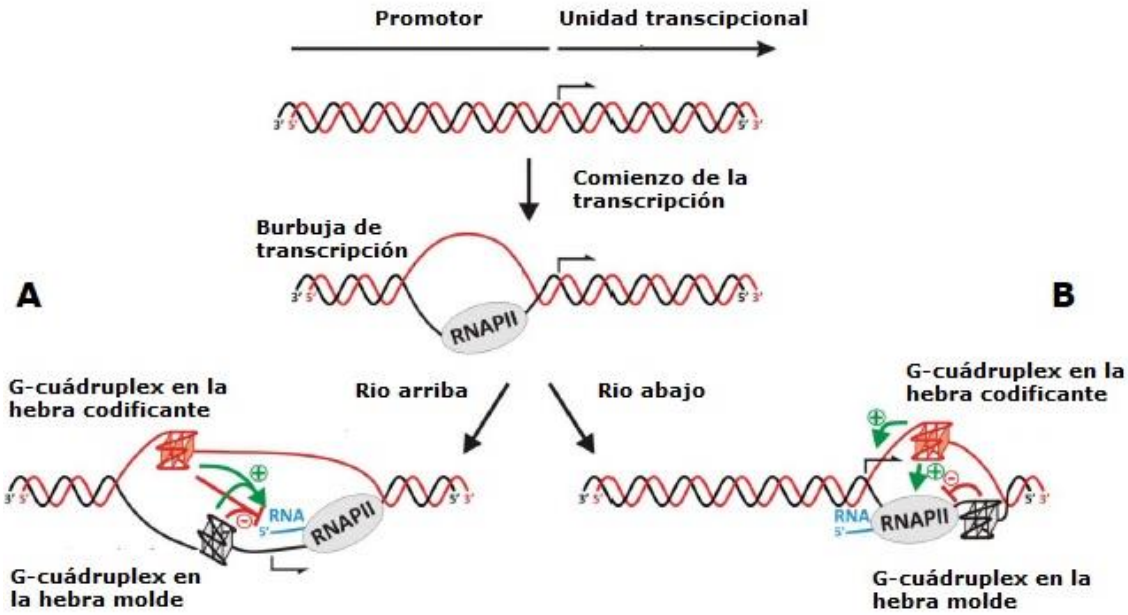


Figura 5. Regulación transcripcional mediante estructuras G-cuádruplex. En las situaciones **A** y **B** se presentan dos posibles escenarios para el rol de estas estructuras en la transcripción. Figura adaptada de *Armas et al* (3).

Uno de los primeros genes en donde se identificó una estructura G4 en su secuencia promotora fue c-*MYC*, un gen que codifica un factor transcripcional esencial

para el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis (42). En la secuencia promotora de este gen, mediante DMS footprinting, se identificaron 2 posibles estructuras G4 intramoleculares, de las cuales una de ellas tendría un efecto en la transcripción, ya que utilizando la molécula estabilizadora de G-cuádruplex llamada TMPyP4, se pudo disminuir los niveles transcripcionales de la proteína MYC en células HeLa (42,43).

1.3.3. Expresión de isoformas proteicas mediante procesamiento de mRNA

Existe evidencia que las estructuras G-cuádruplex también están implicadas en el procesamiento de mRNA mediante splicing alternativos. Un ejemplo es el caso de las variantes de mRNA de la subunidad catalítica de la enzima telomerasa humana (hTERT). En la línea celular cancerígena A549, utilizando un compuesto que interactúa con estructuras G4, llamado 12459, se pudo inducir la acumulación de una variante del transcrito canónico, que se traduce a una isoforma inactiva de la proteína a consecuencia de una alteración en el patrón de splicing del mRNA hTERT. De los intrones sometidos a splicing, el intrón 6 del gen de la hTERT contiene varias secuencias GGG repetidas capaces de formar una estructura G-cuádruplex, el compuesto 12459 es capaz de estabilizar esta estructura, lo que conlleva la sobre-expresión el transcrito alternativo de la telomerasa, el cual no posee la actividad catalítica de la enzima, y por lo tanto la telomerasa queda inactiva (44)

1.3.4. Detención de las horquillas de replicación

En el año 2012 *Besnard et al.* (45) usaron un nuevo método basado en secuenciación masiva para identificar los orígenes de replicación en el DNA de distintas líneas celulares. Entre los resultados más relevantes de este estudio se encuentra en primer lugar la identificación de aprox. 250.000 orígenes de replicación en contraste con los 50.000 previamente estimados; y en segundo lugar que el 67% de estos orígenes se asocia a posibles secuencias G-cuádruplex. Esto indica que más de la mitad de los orígenes de replicación podrían estar regulados por estas estructuras. La evidencia acumulada indica que la formación de G4 en la hebra líder (hebra de replicación continua 5'→3') durante la replicación impediría el avance de la horquilla de replicación causando un impedimento a la DNA polimerasa para seguir sintetizando la nueva hebra de DNA (46). Otra hipótesis aun no probada es que las estructuras G4

serían reconocidas por proteínas y formarían parte integral de los complejos de replicación (47).

1.3.5. Contribución en la inestabilidad genética

Las estructuras G4 pueden formarse espontáneamente en situaciones en donde el DNA se encuentra como hebra simple. Una vez formadas, las estructuras G4 son termodinámicamente más estables que el DNA de doble hebra (24) y por lo tanto representan un desafío para la maquinaria encargada de la mantención de la estabilidad genética (47); ya que de no ser resueltas, las estructuras G4 se heredan y con el aumento en el número de replicaciones se convierten en sitios sensibles a roturas de doble hebra (46).

El conocimiento sobre del rol biológico que pueden desempeñar las estructuras G-cuádruplex ha sido adquirido mediante la utilización de diversas técnicas que van desde métodos bioinformáticos, pasando por técnicas bioquímicas y biofísicas, hasta la utilización de moléculas pequeñas y anticuerpos

1.4. Métodos de estudio de estructuras G-cuádruplex

1.4.1. Métodos de estudio *In Sílico*

Utilizando herramientas bioinformáticas, se puede buscar rápidamente a través de todo el genoma humano secuencias con posibilidad de plegarse en estructuras G-cuádruplex o PQS (PQS = secuencias cuádruplex putativas). Existen diferentes algoritmos que son utilizados en la predicción de PQS (48). Dentro de los más documentados se encuentra el algoritmo Quadparser.

1.4.1.1. **Algoritmo Quadparser** (49)**.**

Una secuencia nucleotídica que siga la siguiente regla: d($G_{3+}N_{1-7}G_{3+}N_{1-7}G_{3+}N_{1-7}G_{3+}$), se plegará en una estructura G-cuádruplex en condiciones fisiológicas. G_3 representa una corrida de a lo menos 3 guaninas, N_{1-7} representa un bucle de 1 hasta 7 nucleótidos de cualquier base nitrogenada (incluyendo guanina) y las condiciones fisiológicas son KCl 100 mM y pH 7,4. Este algoritmo identificó 376.000 PQS en el genoma humano, y fue

el primero que predijo que las PQS no se encuentran distribuidas en el genoma de manera aleatoria, sino que se concentran en regiones de importancia biológica como las descritas en la **sección 1.3**

Derivado de los análisis *in sílico*, se han desarrollado bases de datos como GRSDB (50), que contiene información sobre la localización y composición de PQS en regiones de splicing alternativos de pre-mRNA en células de mamíferos; *Greglist* (51), la cual enlista los genes de distintas especies que posiblemente son regulados por estructuras G-cuádruplex que se encuentran en sus regiones promotoras; y G4IPDB (52), una base de datos que contiene información detallada sobre las proteínas que interactúan con estructuras G4 en el DNA y RNA.

1.4.2. Métodos de estudio *In Vitro*

Dentro de los métodos de estudio *in vitro*, encontramos técnicas bioquímicas como DMS footprinting, FRET (Fluorescence resonance energy transfer) y EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) (53), que están diseñadas para determinar si las características de un oligonucleótido que contiene una secuencia cuádruplex putativa son consistentes con la formación *in vitro* de una estructura G-cuádruplex. Para la determinación de la estructura completa, la conformación de las hebras y bucles, se necesita del uso de técnicas biofísicas más avanzadas como cristalografía de rayos x, resonancia magnética nuclear y dicroísmo circular (54,55). Dentro de las técnicas *in vitro* más comúnmente ocupadas en el estudio de estructuras G4 encontramos:

1.4.2.1. **DMS Footprinting**.

Un oligonucleótido que contiene una secuencia con la posibilidad de formar una estructura G4 es incubado con dimetil sulfato (DMS), compuesto que añade un grupo metilo en la posición N7 de cada guanina. Posteriormente el oligonucleótido se incuba con piperidina, lo que provoca un quiebre de la hebra en el sitio de la guanina metilada. Cuando las guaninas se encuentran formando interacciones de Hoogsteen el N7 se encuentra protegido de la metilación por lo tanto no se produce quiebre. Finalmente, los productos son corridos en un gel de electroforesis en condiciones que favorecen o no la formación de G4. De esta manera se puede analizar el patrón de bandas para determinar cuáles guaninas formaban el G4 dentro del oligonucleótido analizado (56).

1.4.2.2. Transferencia de energía entre fluorocromos (FRET).

Un oligonucleótido que contiene una secuencia con la probabilidad de plegarse en una estructura G4 es marcado en sus extremos 5' y 3' con dos moléculas fluorescentes: un donador y un aceptor. Cuando la secuencia se encuentra plegada y el fluoróforo donador es excitado, este transfiere su energía a la molécula aceptor, la cual emite en una longitud de onda que puede ser detectada. Al contrario cuando el oligonucleótido no adopta la estructura G4, el fluoróforo aceptor no es excitado y por lo tanto no emite energía (57).

1.4.3. Métodos de estudio *In Vivo*

1.4.3.1. Sondas pequeñas (small-molecule probe)

Una de las estrategias empleadas para investigar la existencia de las estructuras G-cuádruplex en un contexto *in vivo* consiste en utilizar moléculas pequeñas marcadas con fluoróforos o que intrínsecamente tengan propiedades fluorescentes en su estructura. Estas deben ser capaces de atravesar la membrana plasmática y unirse a las estructuras G4 que se encuentran tanto en el citoplasma (RNA G4) como en el núcleo (DNA G4). Entre estas encontramos a Pyridostatin-α, una molécula pequeña marcada con un fluoróforo que fue utilizada para evidenciar que los sitios G4 estabilizados por el compuesto dan como resultado daño al DNA (41); de manera reciente se desarrolló el compuesto N-TASQ, un ligando estabilizador y sonda a la vez (58); y la molécula pequeña DAOTA-M2 (59). La selectividad de estas distintas sondas se basa en general en los anillos poli-aromáticos que presentan en su estructura molecular, que les permiten interactuar de forma plana con las estructuras G4, ya sea apilándose sobre tétradas G o intercalándose dentro de la estructura misma (60,61).

La utilización de moléculas pequeñas representa un recurso valioso para poder evidenciar las estructuras G4 en un contexto *in vivo*, pero la información experimental obtenida con su uso sigue en discusión debido a la existencia de resultados contradictorios con respecto a los obtenidos con anticuerpos (58,62).

1.4.3.2. Anticuerpos

En el año 2001, *Schaffitzel et al.* crearon un anticuerpo que reconoce G-cuádruplex en el DNA, y que fue utilizado para evidenciar estructuras G4 en el macronúcleo del protozoo ciliado *Stylonychia lemmnae*, mediante microscopia de fluorescencia en células fijadas con formaldehído (14), presentando así uno de los primeros indicios de que estas estructuras se formaban en un contexto *in vivo* dentro de células eucariotas.

Posteriormente en el año 2013, *Biffi et al.* (15) presentaron evidencia de que estas estructuras podían formarse *in vivo* en células humanas, dada su detección mediante un anticuerpo llamado BG4 que identifica estructuras G4 presentes en el DNA humano. Este anticuerpo demostró ser específico para estructuras G-cuádruplex y no presentar unión a horquillas de RNA, DNA de doble hebra y DNA de hebra simple. Este anticuerpo no presenta afinidad particular por ninguna conformación en específica, ya que reconoce indistintamente G-cuádruplex de tipo paralelo y antiparalelo. BG4 también ha sido utilizado para detectar RNA G4 en líneas celulares humanas (16).

En los años subsiguientes se crearon otros anticuerpos anti estructuras G-cuádruplex como por ejemplo el grupo de *Henderson et al.*, mediante la tecnología de hibridomas crearon el anticuerpo 1H6 (63). *Lam et al.* crearon el anticuerpo h2f (64) y más recientemente el grupo de *Liu et al.* diseñaron el anticuerpo D1, específico para detectar estructuras G-cuádruplex paralelas por sobre las antiparalelas (65). De los anticuerpos mencionados BG4 ha sido utilizado en numerosos estudios (15,16,29,33,66–73), debido principalmente a que fue el primer anticuerpo disponible de manera comercial.

Utilizando el anticuerpo BG4 los investigadores descubrieron que la formación de G-cuádruplex es dependiente del ciclo celular, ya que el marcaje con este anticuerpo en poblaciones celulares sincronizadas mostró bajos niveles de estructuras G4 en la fase G0/G1, fase en donde no ocurre replicación y los procesos celulares están quiescentes. En el checkpoint G1/S, momento en donde las células se preparan para entrar a la fase S, se produjo un incremento de 2,5 veces el número de focos con BG4 comparado con G0/G1. Finalmente, durante la fase S el número de focos BG4 fue 4,8 veces más que G0/G1 (**Fig. 6**).

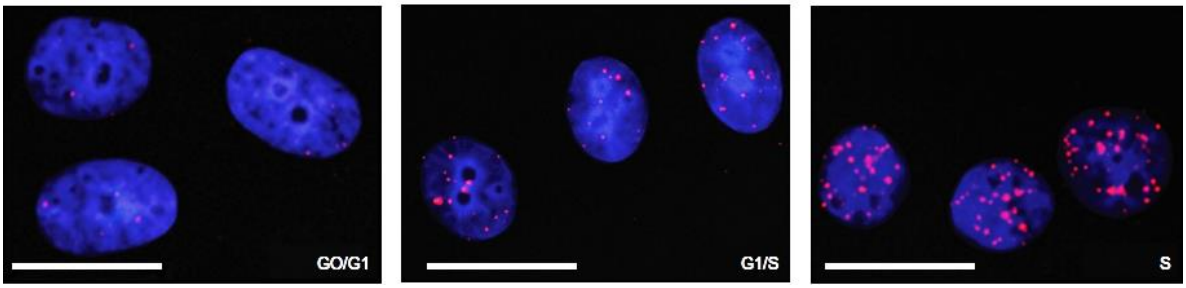


Figura 6. Inmunofluorescencia en células MCF-7 sincronizadas, usando BG4. Núcleos contrastados con DAPI y marca de BG4 con Alexa-549. Fotos extraídas de *Biffi et al* (15)

Además de su presencia en células en cultivo, en estudios subsiguientes también se descubrió que existía una mayor presencia de estructuras G4 en tejidos cancerígenos de estómago e hígado cuando se compararon con su contraparte normal (69).

El conocimiento obtenido con el uso de estos anticuerpos ha proporcionado las directrices para entender mejor la función real que cumplen las estructuras G4 en las células.

1.5. Planteamiento del problema

A la fecha, la gran mayoría de las evidencias mostradas, respecto a la existencia de estructuras G4 *in vivo,* han sido dadas por el uso de anticuerpos específicos anti estructuras G4 utilizados en inmunofluorescencia. Sin embargo, como requisito para la realización de estas técnicas, las células deben ser fijadas y permeabilizadas para permitir el acceso de los anticuerpos a todos los compartimentos celulares (74).

La fijación es un paso fundamental en el método de inmunodetección *in situ* de epítopes de interés. Este proceso detiene los procesos de autolisis y mantiene la arquitectura celular lo más cercano posible a cuando la célula se encontraba viva (75). Existen métodos de fijación física (calor, congelación etc.) y química. Esta última emplea soluciones fijadoras que se pueden clasificar principalmente en dos categorías: fijadores aditivos, los cuales añaden grupos químicos de manera covalente pasando a formar parte de la molécula que están fijando, como el formaldehído; o no aditivos si actúan removiendo el agua libre, generando la precipitación y coagulación de las proteínas , como el metanol (MeOH) (75).

De manera rutinaria en las técnicas inmunohistoquímicas e inmunofluorescentes, las células y tejidos son fijados con formaldehído, obtenido a partir de paraformaldehído (PFA) (76). Cuando el formaldehído se encuentra en solución acuosa, se generan enlaces químicos (puentes de metileno) entre grupos como amino, imino, amido, péptidos, guanidil, carboxil, SH y anillos aromáticos, los cuales forman uniones (entrecruzamiento) entre proteínas y proteínas con ácidos nucleicos (77).

A pesar de existir la suposición generalizada que la fijación con formaldehído refleja de manera precisa las relaciones intermoleculares en la célula, existen reportes como el de *Schmiedeberg et al.*, que indican que la fijación con formaldehído no tiene éxito preservando interacciones moleculares transitorias cortas (78). Al respecto, la evidencia obtenida sobre la cinética de las estructuras G4 apunta a que al menos *in vitro*, coexisten conformaciones que se mantienen plegadas por periodos que van desde los milisegundos a los minutos (28). Sumado a lo anterior, otro artefacto importante producido por la fijación con formaldehído es el enmascaramiento de epítopes, que consiste en la inhabilidad del anticuerpo para unirse a su antígeno, debido a que este último se encuentra presente, pero no disponible para ser reconocido a causa de un sobre-entrecruzamiento producido por el fijador (79).

Por lo tanto, es posible proponer que, con respecto a las estructuras G4, el formaldehído podría: no tener éxito estabilizando y pesquisando estructuras G4 de formación transitoria y rápida, o; por el contrario, estabilizar o inducir estructuras G4 que no se encontraban plegadas cuando la célula se encontraba viva debido al carácter entrecruzante del fijador.

1.6. Pregunta de investigación

Dado que las estructuras G-cuádruplex se forman en los ácidos nucleicos mediante interacciones no covalentes, aislarlas en su forma nativa no ha sido posible. Como resultado, muchos estudios se han realizado utilizando técnicas de inmunomarcaje en células fijadas con paraformaldehído (16,29,70,71,80–82), metanol (58,67), o metanol/ácido acético (15,83), pero ninguno de estos estudios ha puesto énfasis en evaluar si el método de fijación altera la cantidad de señal detectada mediante el uso de anticuerpos en contra de estas estructuras.

Según los antecedentes expuestos, la pregunta de investigación de esta tesis es: ¿Puede el método de fijación modificar la cantidad relativa de estructuras G-cuádruplex detectadas?

Hemos analizado que la pregunta no ha sido ni planteada ni contestada en las diversas publicaciones que han estudiado la función de los G4 (14–16,29,33,68,71,80,84). Por lo tanto, responder esta pregunta supone un punto crucial en las interpretaciones que han hecho y se harán al utilizar la inmunodetección como método de estudio de estructuras G-cuádruplex en el DNA de las células.

En esta tesis, mediante microscopia de fluorescencia se comparó la cantidad de focos fluorescentes en células fijadas con paraformaldehído (PFA) versus los obtenidos en células fijadas con metanol (MeOH)

2. HIPÓTESIS

La cantidad relativa de estructuras G-cuádruplex en el DNA, detectadas mediante técnicas inmunofluorescentes varía según el método de fijación utilizado.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inmunodetección de estructuras G-cuádruplex, entre dos métodos químicos de fijación, en el DNA de células de la línea MCF-7.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar el método de sincronización de ciclo celular en células de la línea MCF-7.
2. Estandarizar el método de inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-G-cuádruplex en células de la línea MCF-7.
3. Comparar la cantidad de focos fluorescentes generada por un anticuerpo anti-G-cuádruplex, en células MCF-7 fijadas con paraformaldehído y metanol, mediante microscopia de fluorescencia.

5. METODOLOGÍA

5.1. Diseño experimental general.

El diseño experimental consta de dos partes: Sincronización de cultivos celulares, seguido de Inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-estructuras G4.
Para poner a prueba la hipótesis planteada en esta investigación, el factor o variable de interés es la "Fijación", el cual presenta 2 tipos: paraformaldehído y metanol. La variable respuesta corresponde a la cuantificación mediante inmunofluorescencia de la cantidad de puntos con señal fluorescente detectados en las células sometidas a cada uno de los tratamientos, por lo tanto, la unidad experimental corresponde a cada una de las células.

5.2. Cultivo celular

Para todos los experimentos se utilizó la línea celular humana MCF-7, debido a un estudio que encontró una mayor presencia de estructuras G4 en tejidos cancerígenos comparados a su contraparte normal (69). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM 1X/Ham's F12 1X (1:1) (Corning) suplementado con Suero Fetal bovino (SFB) (Corning) al 10%, en incubador (Revco, USA) a 37°C bajo atmosfera del 5% de CO_2. Toda manipulación y aplicación de compuestos a los cultivos fue realizada mediante técnica aséptica bajo cabina de bioseguridad tipo flujo laminar (ESCO, USA). Cada vez que se cambió el medio de cultivo las células fueron lavadas con PBS 0,1 M estéril. Las células se despegaron de su sustrato utilizando Tripsina/EDTA 1X (Corning) durante 3-5 minutos y se inactivó con un volumen igual de medio de cultivo con SFB. El número total de células obtenidas se cuantificó manualmente mediante cámara de Neubauer.

5.2.1. Tiempo de duplicación.

Para tener un estimado del tiempo que demora la línea celular MCF-7 en duplicar su población, se utilizó la fórmula de Rothen publicada el 2006 (85):

$$Tiempo\ de\ duplicación\ = \frac{duración\ de\ cultivo\ \times \log(2)}{\log(Células\ cosechadas) - \log(Células\ sembradas)}$$

Para el cálculo se necesitó la cantidad de células sembradas al inicio, la cantidad de células cosechadas, y el tiempo que estas estuvieron en cultivo.

5.3. Sincronización de ciclo celular en la línea celular humana MCF-7.

Junto con la generación del primer anticuerpo anti estructuras G4 (15) se demostró que la cantidad de estructuras G4 presentes en una célula varía de acuerdo a la fase del ciclo celular en la que estas se encuentren (ver sección **1.4.3.2**). En estudios posteriores se presentó nueva evidencia que reafirma esta hipótesis (67,70), incluso ocupando diferentes anticuerpos anti estructuras G4 (65). Tomando en cuenta esta información, la fase del ciclo en la que se encuentra la célula al momento de la medición de la fluorescencia representa una fuente de variabilidad debido a que en cultivo encontramos una población de células en distintas fases del ciclo celular. Por lo tanto, el análisis estadístico que se realice puede arrojar diferencias significativas entre los tratamientos que no son necesariamente causadas por los fijadores utilizados. Para eliminar la variabilidad en el conteo de puntos fluorescentes con el anticuerpo BG4, en esta investigación los experimentos fueron realizados en células sincronizadas en la fase S del ciclo celular. Se eligió esta fase debido a que en ella se ha reportado una mayor presencia de estructuras G4 comparada con las demás fases del ciclo (15), lo que facilitó la comparación entre los tratamientos realizada posteriormente.

Para lograr la sincronización de los cultivos de MCF-7 en la fase S del ciclo, se generó un protocolo de sincronización a partir de la combinación de dos estrategias: depleción de Suero Fetal Bovino (SFB) e incubación con mimosina (86). En primer lugar, se realizó una pre-sincronización en la fase G0/G1, mediante privación de Suero Fetal Bovino, cuyo tiempo óptimo de privación correspondiente a 24 horas, fue calculado experimentalmente mediante un ensayo de ciclo celular en citometría de flujo. Luego, las células fueron detenidas en el límite G1/S mediante la incubación en medio de cultivo con SFB 10% + Mimosina 200 µM (Sigma), cuyo tiempo óptimo de incubación correspondiente a 16 horas fue calculado experimentalmente mediante un ensayo de ciclo celular en citometría de flujo.

La elección de la concentración de mimosina utilizada en este estudio (200 µM) fue obtenida de las publicaciones de Hughes & Cook (87), que indican que

concentraciones de mimosina entre 100 y 500 µM provocan una detención del ciclo previo a la fase S. Y el tiempo máximo de incubación (24 horas) se fijó a partir del estudio realizado por Kulp & Vulliet (88) que indica que posterior a las 24 horas de incubación con mimosina, comienza a disminuir la viabilidad celular.

Una vez aplicados lo métodos de sincronización descritos, las células son liberadas del límite G1/S a la fase S mediante incubación en medio de cultivo con SFB 10% libre de mimosina. En este caso el tiempo de incubación correspondiente a 5 horas también fue determinado experimentalmente mediante un ensayo de ciclo celular en citometría de flujo.

A modo de resumen, en la **figura 7** se presenta un esquema secuencial de los experimentos planteados en los puntos **5.3.1**, **5.3.2** y **5.3.3**.

5.3.1. Sincronización de cultivos en G0/G1

Para determinar el tiempo óptimo de incubación en el que se obtiene la mayor cantidad de células en la etapa G0/G1 del ciclo celular, las células fueron incubadas con medio de cultivo carente de SFB. En los experimentos se sembraron 75.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. La privación de SFB se realizó una vez que los cultivos alcanzaron un 40-50% de confluencia. Mediante el método de tinción de ácidos nucleicos con Yoduro de propidio (89) se analizó la distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo a las 0, 8, 16, 24 y 32 horas post privación de SFB, utilizando un citómetro de flujo. Se realizaron 3 réplicas intraensayo por cada tiempo.

5.3.2. Sincronización de cultivos en G1/S

Para determinar el tiempo óptimo de incubación en el que se obtiene la mayor cantidad de células en la etapa G1/S del ciclo celular, se sembraron 75.000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. La privación de suero se realizó una vez que los cultivos alcanzaron un 40-50% de confluencia, por 24 horas (definido según el punto **5.3.1**). Posteriormente, las células se incubaron en medio de cultivo con SFB al 10% + Mimosina 200µM; mediante el método de tinción de ácidos nucleicos con Yoduro de propidio (89) se analizó la distribución de la población celular en las distintas fases del

ciclo a las 0, 8, 16 y 24 horas de incubación con Mimosina. Se realizaron 3 réplicas intraensayo por cada tiempo.

5.3.3. Sincronización de cultivos en S

Para determinar el tiempo óptimo de incubación en el que se obtiene la mayor cantidad de células en la fase S del ciclo celular, las células fueron detenidas en G0/G1 utilizando la metodología y tiempo óptimo obtenido en el punto **5.3.1**. Luego, las células fueron detenidas en el límite G1/S mediante la metodología y tiempo óptimo obtenido en el punto **5.3.2**. Finalmente, las células fueron incubadas en medio de cultivo con SFB 10%, pero libre de mimosina, lo que permitió a las células proseguir desde el límite G1/S hacia la fase S del ciclo celular. Mediante el método de tinción de ácidos nucleicos con Yoduro de propidio (89) se analizó la distribución de la población celular en las distintas fases del ciclo a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 horas de incubación con medio libre de mimosina. Se realizaron 3 réplicas intraensayo por cada tiempo.

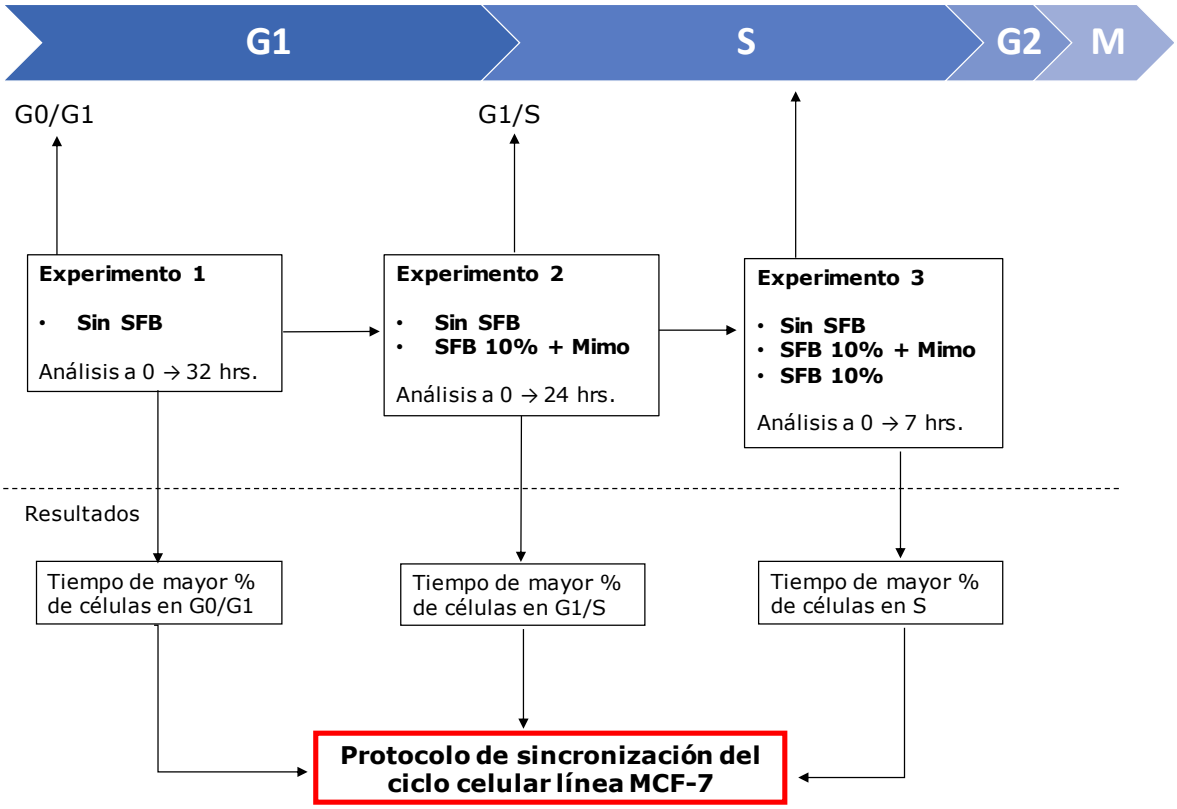


Figura 7: Metodología utilizada para sincronización de ciclo celular en fase S:
Experimento 1, células MCF-7 se incubaron en medio de cultivo sin SFB y se analizó el ciclo celular a distintos tiempos. Como resultado de este experimento se obtuvo el tiempo óptimo en que se consigue el mayor porcentaje de células en G0/G1.
Experimento 2 las células se sincronizaron en G0/G1, y luego se incubó en medio con SFB 10% + mimosina 200 µM (Mimo). Con el resultado de esta prueba se obtuvo el tiempo óptimo en que se consigue el mayor porcentaje de células en G1/S.
Experimento 3 consistió en sincronizar las células en G0/G1 y luego en G1/S. Finalmente se incubó en medio con SFB 10% pero libre de mimosina. Como resultado de este experimento, se obtuvo el tiempo óptimo en que se consigue el mayor porcentaje de células en fase S.
Reuniendo los resultados de estos 3 experimentos, se generó el protocolo de sincronización del ciclo celular de la línea MCF-7. SFB = Suero Fetal Bovino, Mimo = mimosina.

5.3.4. Ensayo de ciclo celular

Posterior a los distintos protocolos de sincronización, las células se cosecharon mediante tripsinización, y el medio de cultivo fue eliminado mediante centrifugación (200g x 5 min). Las células fueron fijadas y permeabilizadas con etanol 70% enfriado a -20°C durante un tiempo mínimo de 30 minutos. Luego, se centrifugaron para eliminar el etanol 70% y fueron resuspendidas en PBS 0,1 M. Posteriormente las células se traspasaron a tubos de citómetro y se incubaron en 500 µL de solución de tinción para ciclo celular: 50 µg/mL yoduro de propidio (Calbiochem) + 100 µg/mL RNasa A (Sigma) en PBS durante 15-30 minutos a 37°C.

La obtención de datos fue realizada en un citómetro de flujo (BD FACScalibur) mediante el software BD CellQuest Pro (BD Biosciences), en donde se capturaron 20.000 eventos por réplica. La configuración del citómetro de flujo para la obtención de los histogramas con la fluorescencia de yoduro de propidio fue la siguiente: Parámetro primario de medición filtro 2 (DDM FL2), FL2 en amplificación lineal, voltaje 430, amp.gain 1.00 y velocidad de fluido lenta o media (Para mayor detalle consultar **Anexo N°1**).

5.3.5. Procesamiento de datos para sincronización de ciclo celular.

El análisis y procesamiento de los datos obtenidos en el citómetro de flujo fue realizado con el software FlowJo (FlowJo LLC, versión 10). Con cada réplica se implementaron estrategias de limpieza de datos mediante el uso de gates. Para todas las muestras se utilizó la siguiente configuración: En un dot plot FSC-H (tamaño) vs SSC-H (complejidad), la población celular se dividió en 4 cuadrantes (**Fig. 8A**), y se trabajó con la población del cuadrante 2. Luego, mediante un dot plot FL2-W (ancho) vs FL2-A (área), se realizó un gate en la población de células individuales descartando del análisis a las células agregadas (**Fig. 8B**). Sobre la población final obtenida se aplicó la opción "Cell Cycle Analysis".

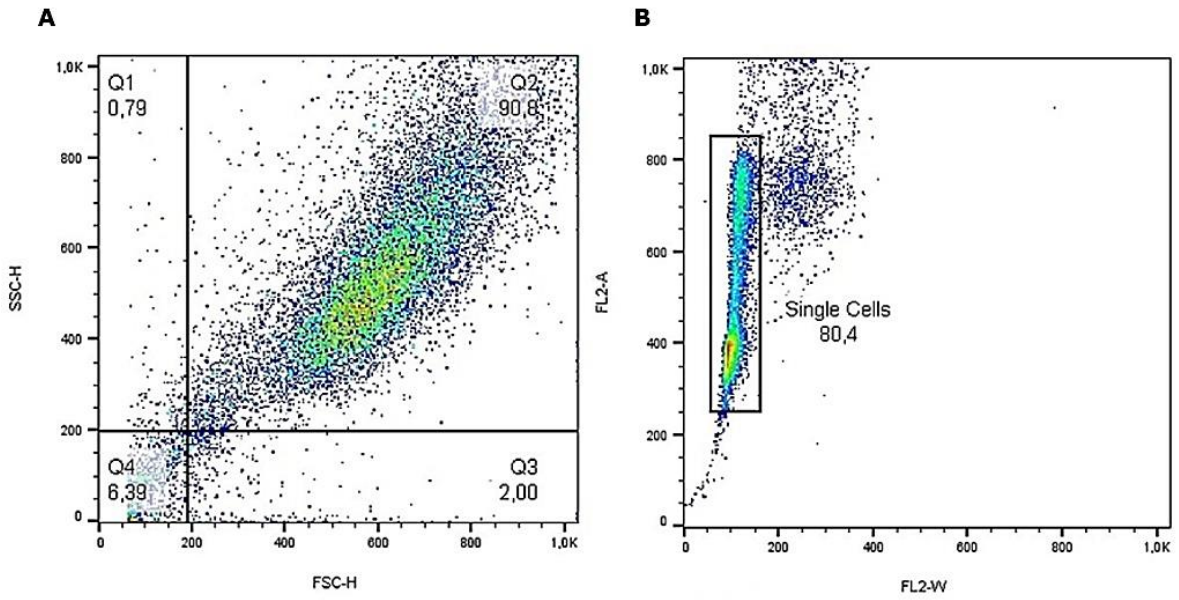


Figura 8. **Selección de población celular mediante "gates"**. **A**: En un gráfico dot plot "FSC-H vs SSC-H" se dividió la población celular en 4 cuadrantes. Se seleccionó la población celular perteneciente al cuadrante Q2 (mayor tamaño y mayor complejidad) y se descartaron del análisis las células de los demás cuadrantes. **B**: Gráfico dot plot "FL2-W vs FL2-A", con células del cuadrante Q2 donde se identificaron las células individuales (no aglomeradas). El área seleccionada (rectángulo) corresponde a las células que fueron analizadas de manera individual por el citómetro de flujo. Las células fuera de la región de interés corresponden a dobletes o células aglomeradas. Según el gráfico, en el rectángulo se encuentran células con diferentes cantidades de fluorescencia (FL2-A), pero con el mismo ancho (FL2-W).

El gráfico resultante proporciona la siguiente información: La fase G1, S y G2 son resaltadas con color morado, amarillo y verde respectivamente; la línea negra representa al histograma analizado, mientras que la línea rosada corresponde al ajuste del modelo hecho por el programa (**Fig. 9**). A su vez, el programa proporciona los porcentajes de células (en relación al total) que se encuentran en cada etapa del ciclo celular (G1, S y G2). Estos datos fueron exportados a una planilla Excel y los gráficos de cada análisis fueron guardados como imágenes JPG.

5.3.6. Análisis Estadístico para sincronización de ciclo celular.

El protocolo final de sincronización de ciclo celular fue creado mediante la comparación de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular, obtenidos desde 3 muestras. Para obtener el tiempo óptimo de sincronización en cada fase del ciclo, se buscaron las siguientes diferencias estadísticas significativas de la situación control (tiempo cero) con los tiempos sucesivos:

1. Tiempo óptimo G0/G1: aumento significativo del porcentaje de células en fase G1, y disminución significativa del porcentaje de células en las fases S y G2 con respecto al tiempo 0.
2. Tiempo óptimo G1/S: aumento significativo del porcentaje de células en fase G1, y disminución significativa del porcentaje de células en las fases S y G2 con respecto al tiempo 0
3. Tiempo óptimo S: disminución significativa del porcentaje de células en fase G1, aumento significativo del porcentaje de células en la fase S y disminución del porcentaje de células en la fase de G2 con respecto al tiempo 0.

Los datos de ciclo celular obtenidos en FlowJo fueron exportados a archivos de Excel. Posteriormente se pusieron a prueba los supuestos de normalidad (test Shapiro-Wilk) y Homocedasticidad de varianzas (test Levene) con el programa MYSTAT 12 (Systat software Inc, versión 12). Al cumplirse los supuestos para pruebas paramétricas, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) a 1 vía para cada fase y posteriormente el post test de Tukey. En caso contrario, cuando no se cumplieron los supuestos, se realizó el test no paramétrico de Kruskall-Wallis y el post test de Dunn. Para la realización de los test estadísticos se utilizó Graphpad Prism (Graphpad software Inc, versión 5).

5.4. Estandarización de inmunofluorescencia

5.4.1. Prueba RNasa y permeabilización.

Previo a la realización de la inmunofluorescencia, se realizó un ensayo para evaluar la efectividad de la enzima RNasa; además se determinó el tiempo óptimo de incubación con el detergente Tritón X-100 (Calbiochem) como agente permeabilizante. Para esto, las células se incubaron con Triton-x-100 durante 10 o 30 minutos, con RNasa A o PBST (PBS + Tween 20 0,1%).

Para evaluar la efectividad de la RNasa y Tritón X-100, células se tiñeron con el colorante para ácidos nucleicos yoduro de propidio y fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81) con un filtro BP de 610-700 nm y un tiempo de exposición de 1 ms.

El yoduro de propidio tiñe tanto el DNA como RNA, por lo tanto, al comparar células con y sin tratamiento con RNasa mediante microscopía fluorescente, se puede

evidenciar diferencias en el patrón de tinción de las células: presencia o ausencia de tinción citoplasmática y nucléolos (**Fig. 16**).

5.4.2. Titulación BG4 e HIS

Para evaluar la mejor concentración en que los anticuerpos primario y secundario (BG4 y HIS) presentan marca específica, se realizó un ensayo de titulación con distintas diluciones del anticuerpo primario BG4 (Absolute antibody Ab00174-10.6) (1:12.5, 1:25, 1:500, 1:1000), y del anticuerpo secundario anti-HIS (Thermofisher, MA1-21315-D488) (1:100, 1:500, 1:1000). Finalmente, las células fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81) con un filtro BP de 510-550 nm y un tiempo de exposición de 42 ms.

5.4.3. Ensayos de métodos de fijación.

Además de paraformaldehído, se probó la presencia de inmunomarcaje en células sometidas a diferentes estrategias de fijación: 1) células sin fijar, 2) fijación con metanol 100% enfriado a -20°C por 15 minutos, 3) fijación con mezcla de metanol/ácido acético (3:1) enfriado a -20°C por 15 minutos, y 4) fijación física en PBS 0,1 M mediante calor húmedo en vaporera por 10 minutos a 95-98°C. Finalmente, las células fueron observadas y fotografiadas en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81) (**Fig. 18**).

5.5. Cuantificación de los sitios marcados con un anticuerpo anti-G-cuádruplex en células MCF-7 fijadas con paraformaldehído o fijadas con metanol, mediante inmunofluorescencia *in situ*.

Se sembraron 20.000-30.000 células en placas de 12 pocillos que contenían 1 cubreobjeto redondo de 12mm Ø por pocillo, con medio de cultivo DMEM/F12 + SFB 10% durante 24 horas. Luego, los cultivos se sometieron al protocolo de sincronización de ciclo celular: DMEM/F12 sin SFB durante 24 horas, DMEM/F12 + SFB 10%+ mimosina 200 µM durante 16 horas, DMEM/F12 + SFB 10% durante 5 horas. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% (Merck) en PBS a 4°C por 15 minutos, o Metanol enfriado a -20°C durante 15 minutos. Posteriormente se permeabilizaron con Triton-x-100 al 0,2% en PBS durante 15 minutos. Luego se

incubaron con RNasa A 100 µg/mL durante 30 minutos a 37°C. Se bloquearon los sitios inespecíficos con Cas-Block (Invitrogen) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubó con el anticuerpo primario.

Para la inmunodetección de las estructuras G4 se utilizó el anticuerpo BG4 (Absolute antibody Ab00174-10.6) a una dilucion de 1:12,5. Para su reconocimiento, se utilizó el anticuerpo secundario anti-HIS conjugado con Dylight488 (Thermofisher, MA1-21315-D488) a una dilucion de 1:100. Finalmente se realizó una tinción nuclear con DAPI (Sigma). Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos usando medio de montaje hidrofílico FLUORO-GEL con anti fading (Electron Microscopy Sciences) y para evitar la desecación de la preparación, se sellaron los bordes con esmalte de uñas (para mayor detalle consultar **Anexo N°2**). Los cubreobjetos con células se observaron y fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81).

Por cada situación experimental (fijación con paraformaldehído o metanol), se realizaron 3 repeticiones (cubreobjetos) acompañados de un control negativo al cual se le aplicó el mismo protocolo mencionado anteriormente, con excepción del anticuerpo primario BG4.

5.5.1. Experimento control de estrés celular.

Al momento de estandarizar y realizar la inmunofluorescencia en células sin ser sometidas al protocolo de sincronización, se observó un patrón de tinción correspondiente a focos fluorescentes delimitados al núcleo de las células, pero cuando se realizó la inmunofluorescencia en células sincronizadas con nuestro protocolo, el patrón de tinción cambió a focos fluorescentes tanto en el núcleo como en el citoplasma. Una posible explicación para este fenómeno, encontrada en la literatura, fue que estos focos en el citoplasma correspondían gránulos de estrés celular mediado por estructuras G4 (84).

De manera que, para testear si correspondían a gránulos de estrés, se reprodujo uno de los experimentos planteados por los investigadores de la publicación original (84): Para el experimento de estrés celular, se utilizaron células MCF-7 no sincronizadas, las células fueron incubadas en medio de cultivo con H_2O_2 0,5 mM durante 2 horas. Posteriormente se realizó la inmunotinción con BG4 como se describió en el punto **5.5**. Finalmente, las células se observaron y fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81).

5.5.2. Procesamiento de imágenes.

La adquisición de fotografías se realizó en un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81), mediante el programa Xcellence Pro (Olympus soft imaging solutions). La marca inmunofluorescente anti-HIS fue fotografiada usando un objetivo de 100x con aceite inmersión y un filtro BP 510-550 nm (verde) durante un tiempo de exposición de 42 ms. La tinción nuclear con DAPI fue fotografiada usando un objetivo de 100x con aceite de inmersión y un filtro BP 450-490 nm (azul) a un tiempo de exposición 13 ms. Se generaron fotografías combinando la fluorescencia anti-HIS y DAPI, utilizando la opción "combine" del programa Xcellence Pro.

Para facilitar la cuantificación de focos inmunofluorescentes posterior, cada imagen con anti-HIS fue procesada como sigue: deconvolución 3D, seguido de image display→ brillo 20, contraste 80 (ver ejemplo en **Anexo 3**).

5.5.3. Cuantificación de focos fluorescentes.

Las imágenes obtenidas se analizaron en imageJ, mediante el plugin ITCN nuclear count (https://imagej.nih.gov/ij/plugins/itcn.html), el cual permite cuantificar la cantidad de peaks dentro de un área definida, previa conversión de la imagen a un formato de análisis para utilizar el plugin, que consta de: Invertir los colores, transformar a imagen 8 bit y seleccionar área a cuantificar (para mayor detalle consultar **Anexo 4**).

5.5.4. Análisis estadístico de la cuantificación de focos fluorescentes.

El tamaño de muestra mínimo (n) para el experimento principal fue calculado de acuerdo a la variable respuesta (cuantificación de la cantidad de puntos con señal fluorescente detectados en cada célula). Para obtener el tamaño de muestra necesario se utilizó el programa estadístico G-power (90) el cual de manera general nos proporciona el tamaño de muestra necesario de acuerdo al nivel de significancia, poder de la prueba y tamaño del efecto que el investigador proporciona. Los valores utilizados fueron: medias 122,05 y 69,67; desviaciones estándar 91,82 y 75,20. Estos valores fueron obtenidos desde un experimento piloto (Para mayor información sobre experimento piloto consultar **anexo 7**)

Para comparar los tratamientos, el conteo de focos con anti-HIS presentes en cada una de las células fue ordenado en Excel y posteriormente se puso a prueba el supuesto de normalidad (test Shapiro-Wilk) y homocedasticidad de varianzas (test de Levene) Como no se cumplió el supuesto de normalidad ni el de homocedasticidad, se realizó el test no paramétrico de Mann Whitney. Para la realización de los test estadísticos se utilizó Graphpad Prism (Graphpad software Inc, versión 5)

6. RESULTADOS

Antes de poner a prueba la hipótesis de esta investigación (**Sección 2**) fue necesario estandarizar los métodos. Dicha estandarización comprendió la generación de un protocolo de sincronización del ciclo celular de la línea MCF-7 en la fase S; y una serie de pruebas para lograr identificar el patrón de marca especifica con el anticuerpo BG4.

6.1. Sincronización de cultivos celulares.

6.1.1. Tiempo de duplicación de la línea celular MCF-7.

Antes de realizar los experimentos de sincronización de cultivos, fue necesario averiguar si la línea MCF-7 era sensible a los métodos que se utilizarían, ya que de acuerdo a la literatura, las estrategias de sincronización de cultivos como la privación de SBF e incubación con mimosina son recomendadas para células con tiempos de duplicación menores a 30 horas (86). Por lo tanto, el primer paso fue determinar el tiempo de duplicación de la línea celular MCF-7.

Con los datos obtenidos de la cuantificación celular utilizados para distintos experimentos, se calcularon los tiempos de duplicación celular para cada ocasión, según la metodología expuesta en el punto **5.2.1**. El tiempo final de duplicación fue el promedio de los tiempos de duplicación obtenidos individualmente. El tiempo de duplicación obtenido corresponde a **28,6 horas** (**Tabla 1**).

Según este resultado, los métodos de sincronización que se utilizaron, fueron adecuados para la línea celular MCF-7

Tabla 1. Cultivo y tiempo de duplicación MCF-7

N° células sembradas	Tiempo de cultivo (días)	N° células cosechadas	Tiempo de duplicación (hrs)
100.000	4	2.135.000	21,7
100.000	6	5.110.000	25,4
100.000	7	5.232.500	29,4
100.000	7	3.780.000	32,1
100.000	9	17.600.000	29,0
100.000	10	13.250.000	34,0
Promedio			**28,6**

6.1.2. Sincronización de cultivos en G0/G1

Mediante la técnica para la determinación de ciclo celular descrita en el punto **5.3.1**, se determinó el tiempo de privación de suero fetal bovino que conlleva a la mayor cantidad de células detenidas en fase G0/G1. Según se muestra en la **figura 9 y 10**, una privación de SBF de al menos **24 horas** generó un 77,1% de las células detenidas en G0/G1 (los histogramas de cada réplica se encuentran en el **Anexo 5**, punto **10.5.1**).

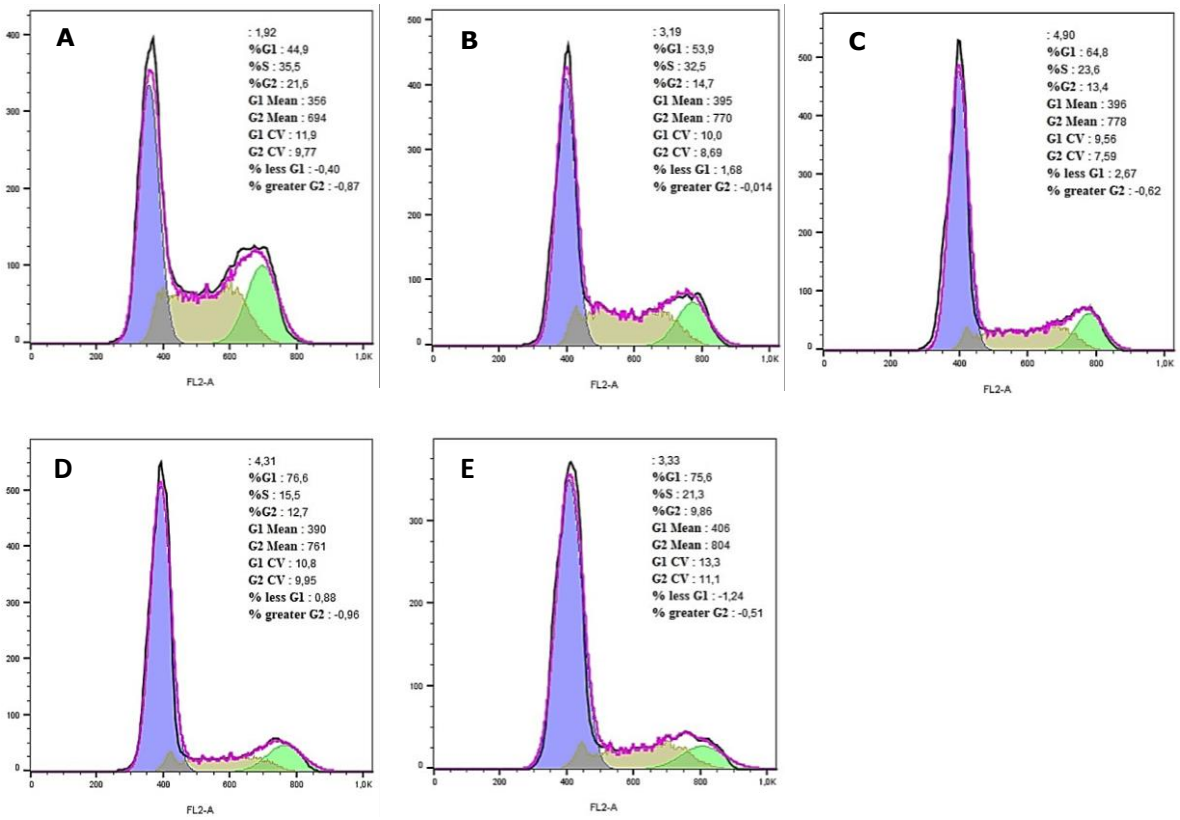


Figura 9. Histogramas representativos de análisis de ciclo celular en células privadas de SFB. Cultivos de la línea MCF-7 fueron incubados con medio de cultivo carente de SFB y se fijaron a las. **A:** 0 horas. **B**: 8 horas. **C:** 16 horas. **D**: 24 horas. **E**: 32 horas. Posteriormente las células se tiñeron con Yoduro de Propidio y la fluorescencia fue detectada en un citómetro de flujo. Finalmente, los histogramas de análisis de ciclo celular se obtuvieron utilizando el software FlowJO.

El análisis estadístico indicó que la privación de SFB a los tiempos 16 (71,7%), 24 (77,1%), y 32 (76,9%) horas de incubación presentaron porcentajes de células en G1 significativamente mayores al tiempo cero (46,6%); para la fase S, solo el tiempo 24 (16,8%) presentó un porcentaje de células significativamente menor al tiempo cero

(34,2%); y para la fase G2 todos los tiempos presentaron porcentajes de células significativamente menores al tiempo cero (20%) (**Fig. 10**) (El desarrollo completo del análisis estadístico se encuentra en **Anexo 6**, punto **10.6.1**).

Por otra parte, tanto en la fase G1 como en S, no existieron diferencias significativas en el porcentaje de células entre el tiempo de privación durante 24 o 32 horas (**Fig. 10**).

Tomando en cuenta estos resultados, para los experimentos subsiguientes se utilizó una privación de SFB de **24 horas.**

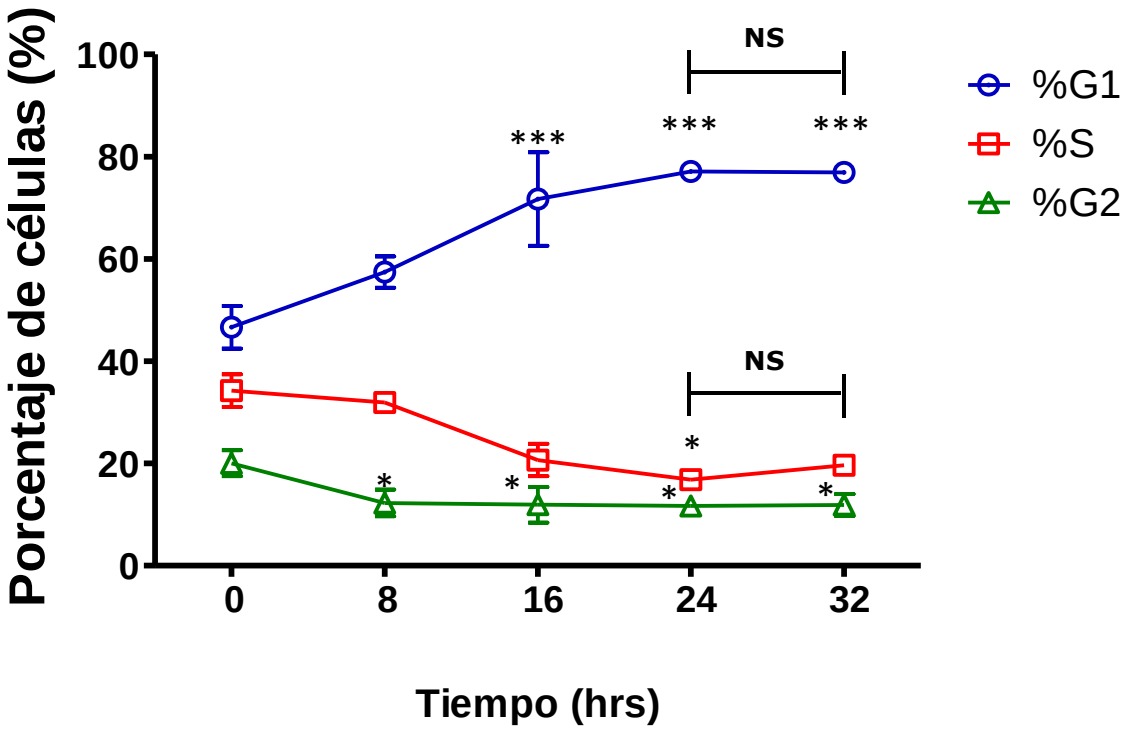


Figura 10. Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular obtenidos post-depleción de SFB. Se compararon los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular a las 0, 8, 16, 24 y 32 horas post-depleción de SFB. Obtenidos mediante citometría de flujo. Se buscaron diferencias significativas por cada fase de manera independiente. Para las fases G1 y G2 se realizó el test ANOVA 1 vía y el post test Tukey. Para la fase S se realizó el test de Kruskall-Wallis y post test de Dunn. *= $p<0.05$; **= $p<0.01$; ***= $p<0.001$ respecto al tiempo 0, y NS = no significativo. Valores corresponden a medias ±desviación estándar. n=3.

6.1.3. Sincronización de cultivos en G1/S

Utilizando la misma metodología del punto anterior, se definió el tiempo adecuado para detener el ciclo en el límite G1/S. Se realizó una curva de tiempo de

tratamiento con 200 µM de mimosina. Como se muestra en la **figura 11 y 12**, un tratamiento de al menos **16 horas** generó un 83,7% de las células detenidas en G1/S (los histogramas de cada réplica se encuentran en el **Anexo 5**, punto **10.5.2**).

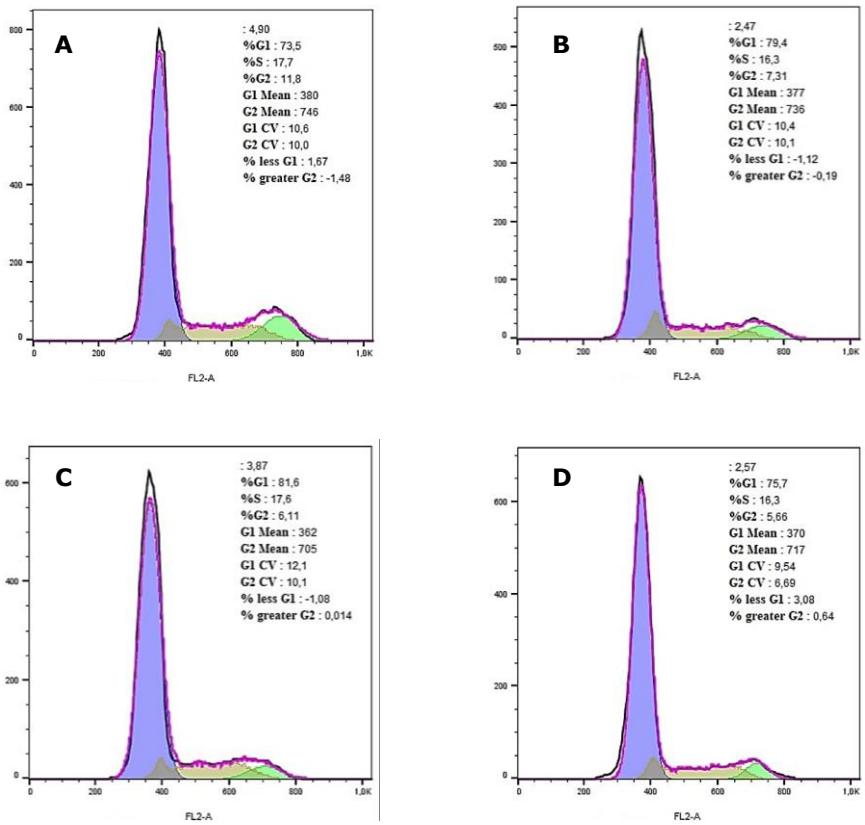


Figura 11. Histogramas representativos de análisis de ciclo celular en células incubadas con Mimosina. Cultivos de la línea MCF-7 fueron incubados con medio de cultivo carente de SFB durante 24 horas. Posteriormente en medio de cultivo con SFB 10% + mimosina 200 µM y se fijaron a las. **A:** 0 horas. **B**: 8 horas. **C:** 16 horas. **D**: 24 horas post incubación. Posteriormente las células se tiñeron con Yoduro de Propidio y la fluorescencia fue detectada en un citómetro de flujo. Finalmente, los histogramas de análisis de ciclo celular se obtuvieron utilizando el software FlowJO.

El análisis estadístico indicó que para la fase G1, la incubación con 200 µM de mimosina durante 16 horas (83,7%), presentó un porcentaje significativamente mayor de células con respecto al tiempo cero (75,9%), y además fue significativamente mayor al tiempo 24 (80,7%); para la fase S no existieron diferencias significativas en los porcentajes de células con respecto al tiempo cero (17,2%); mientras que para la fase G2, la incubación con mimosina durante 16 horas (5,94) presentó un porcentaje de células significativamente menor al tiempo cero (12,7%) (**Fig. 12**) (El desarrollo completo del análisis estadístico se encuentra en **Anexo 6**, punto **10.6.2**)

Para los experimentos que prosiguen se utilizó un tratamiento con 200 µM de mimosina durante **16 horas**.

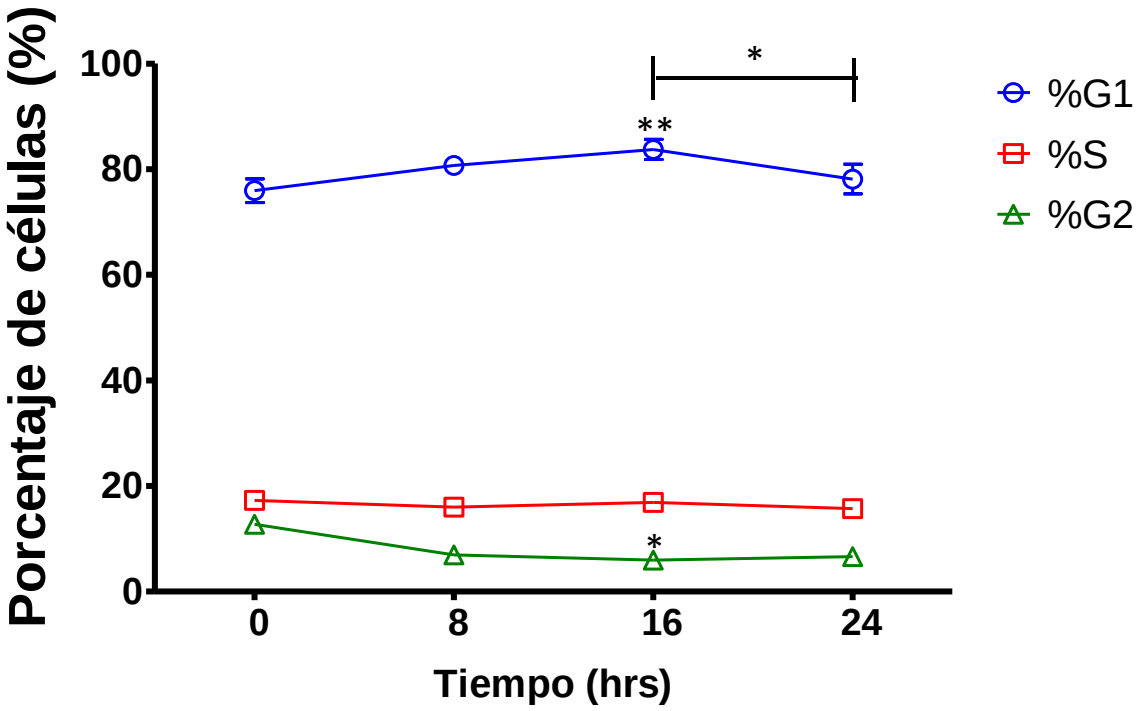


Figura 12. Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular obtenidas post incubación con mimosina 200 µM. Se compararon los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular a las 0, 8, 16 y 24 horas post incubación con mimosina mediante citometría de flujo. Se buscaron diferencias significativas por cada fase de manera independiente. Para las fases G1 y S se realizó el test ANOVA 1 vía y el post test de Tukey. Para la fase G2 se realizó el test de Kruskall-Wallis y post test de Dunn. *= $p<0.05$; **= $p<0,01$ respecto al tiempo 0. Valores son medias ± desviación estándar. n= 3.

6.1.4. Sincronización de cultivos en S

Realizando una curva de tiempo de retiro de mimosina (lo que genera el reinicio del ciclo celular desde el limite G1/S), y utilizando la misma metodología del punto anterior, se definió el tiempo adecuado para obtener el mayor porcentaje de células en la fase S del ciclo celular. Como muestra la **figura 13**, desde las 4 horas posterior a la remoción de mimosina se obtuvieron mayores porcentajes de células en fase S (71,6%), llegando a un porcentaje máximo de 77% a las **5 horas** (**Fig. 14**). Los experimentos que prosiguen se realizaron posterior a las **5 horas** de retiro del tratamiento (los histogramas de cada réplica se encuentran en el **Anexo 5**, punto **10.5.3**).

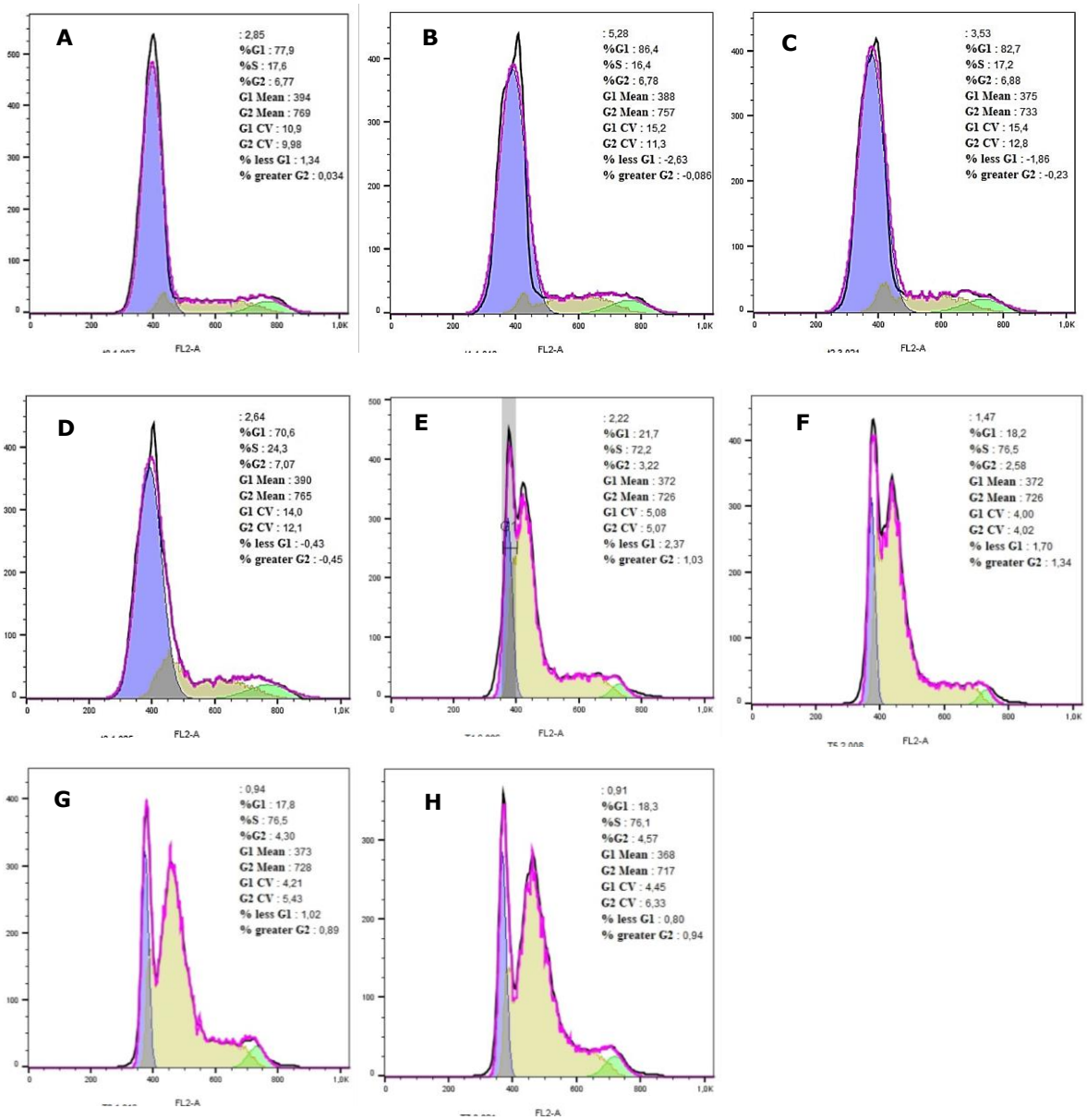


Figura 13: Histogramas representativos de análisis de ciclo celular en células incubadas con medio libre Mimosina. Cultivos de la línea MCF-7 fueron incubados con medio de cultivo carente de SFB durante 24 horas. Posteriormente en medio de cultivo con SFB 10% + mimosina 200 µM durante 16 horas. Finalmente se incubaron en medio de cultivo con SFB 10% sin mimosina y se fijaron a las **A:** 0 horas. **B**: 1 hora. **C:** 2 horas. **D**: 3 horas. **E**: 4 horas. **F**: 5 horas. **G**: 6 horas. **H**: 7 horas de incubación. Posteriormente las células se tiñeron con Yoduro de Propidio y la fluorescencia fue detectada en un citómetro de flujo. Finalmente, los histogramas de análisis de ciclo celular se obtuvieron utilizando el software FlowJO.

El análisis estadístico indicó que la incubación con medio libre de mimosina durante 5 horas (17,6%) presentó un porcentaje significativamente menor de células en fase G1 que el tiempo cero (83,9%); con respecto a la fase S la incubación con

medio libre de mimosina durante 5 horas (77%) presentó un porcentaje significativamente mayor de células en dicha fase con respecto al tiempo cero (16,3%). Para la fase G2 la incubación con medio libre de mimosina durante 4 (3,2%) y 5 horas (3,3%) presentaron porcentajes significativamente menores con respecto al tiempo cero (6,8%) (**Fig. 14**) (El desarrollo del análisis estadístico se encuentra en **Anexo 6**, punto **10.6.3**).

Los experimentos posteriores se realizaron utilizando un tiempo de incubación con medio libre de mimosina durante **5 horas**.

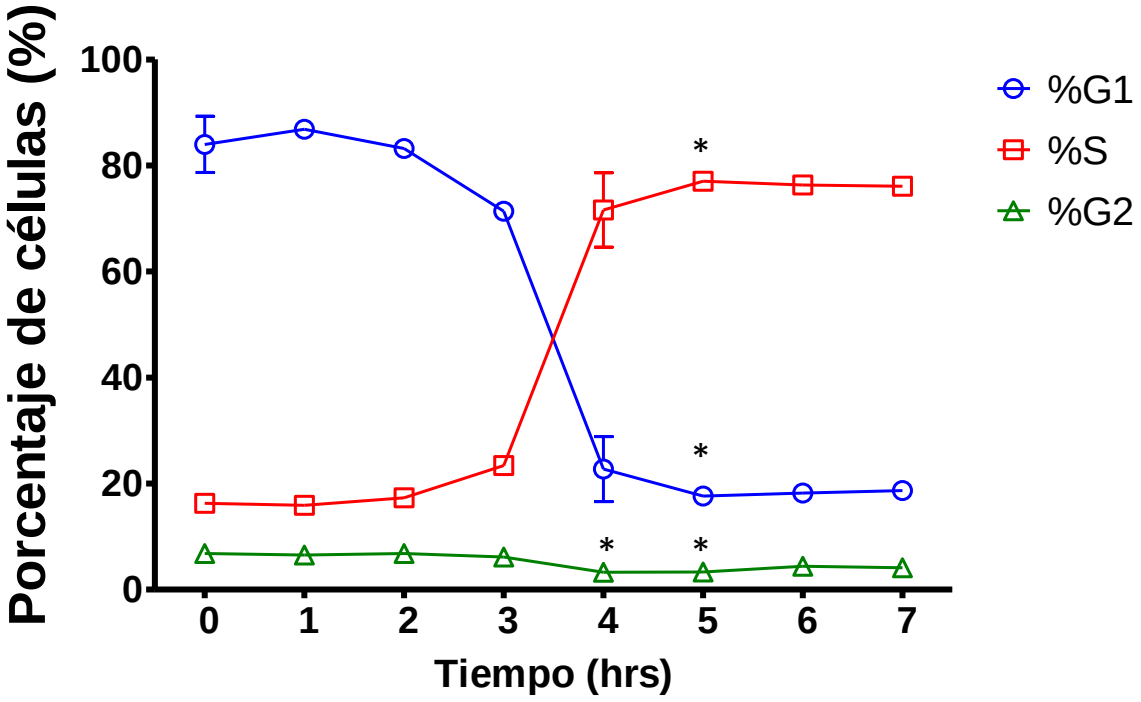


Figura 14: Porcentaje de células en cada fase del ciclo celular obtenidas post incubación con medio libre de mimosina. Se compararon los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 horas post incubación con medio libre de mimosina, obtenidos mediante citometría de flujo. Se buscaron diferencias significativas por cada fase de manera independiente. Para las fases G1, S y G2 se realizó el test de Kruskall-Wallis y post test de Dunn. *= $p<0.05$ respecto a tiempo 0. Valores son medias ± desviación estándar. n=3.

Como conclusión, tomando los resultados expuestos, el protocolo final de sincronización de la línea celular MCF-7 en la fase S del ciclo fue el siguiente: incubación en medio de cultivo carente de SFB durante 24 horas (G0/G1), seguido de incubación en medio de cultivo con SFB 10% + mimosina 200 µM durante 16 horas

(G1/S) y finalmente incubación en medio de cultivo con SFB 10% libre de mimosina durante 5 horas (**Fig. 15**).

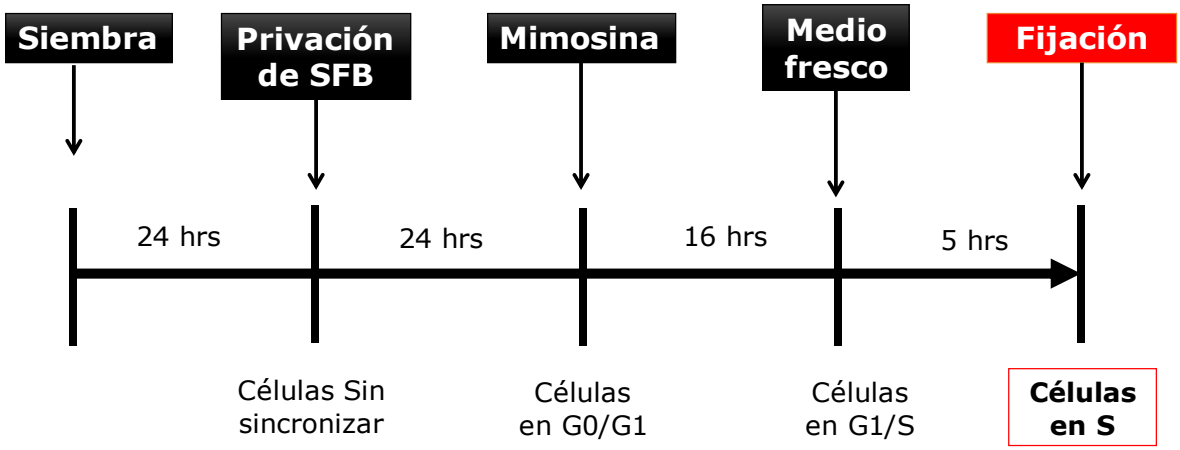


Figura 15: Protocolo de sincronización de ciclo celular para línea MCF-7

6.2. Estandarización de inmunofluorescencia.

6.2.1. Prueba RNasa y permeabilización

Células MCF-7 sobre cubreobjetos fueron permeabilizadas con Tritón X-100 durante 10 o 30 minutos, y luego tratadas con RNasa A o PBST. Se tiñeron con yoduro de propidio y fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (**Fig. 16**).

Con respecto al tiempo de permeabilización, una incubación de 10 minutos con Tritón X-100 no cambia la morfología aparente de las células (**Fig. 16A y B**). Mientras que, al aumentar el tiempo de incubación hasta 30 minutos el núcleo y el citoplasma aparecen degradados por el detergente, fenómeno evidenciado de manera más clara en la **figura 16D** por la presencia de vesículas de citoplasma.

Cuando se compararon las células tratadas con RNasa A versus las no tratadas, se pudo observar en estas últimas la presencia de tinción citoplasmática y de nucléolos (**Fig. 16B y D**), lo que indicó la presencia de moléculas de RNA en el citoplasma y el núcleo teñidas con el colorante, patrón que no se repitió en las células tratadas con RNasa A (**Fig. 16A y B**).

Los resultados de este ensayo indicaron que un tiempo de permeabilización de 10 minutos es suficiente para que la RNasa A ingrese a la célula, y que esta digiera el RNA presente tanto en el citoplasma como en el núcleo

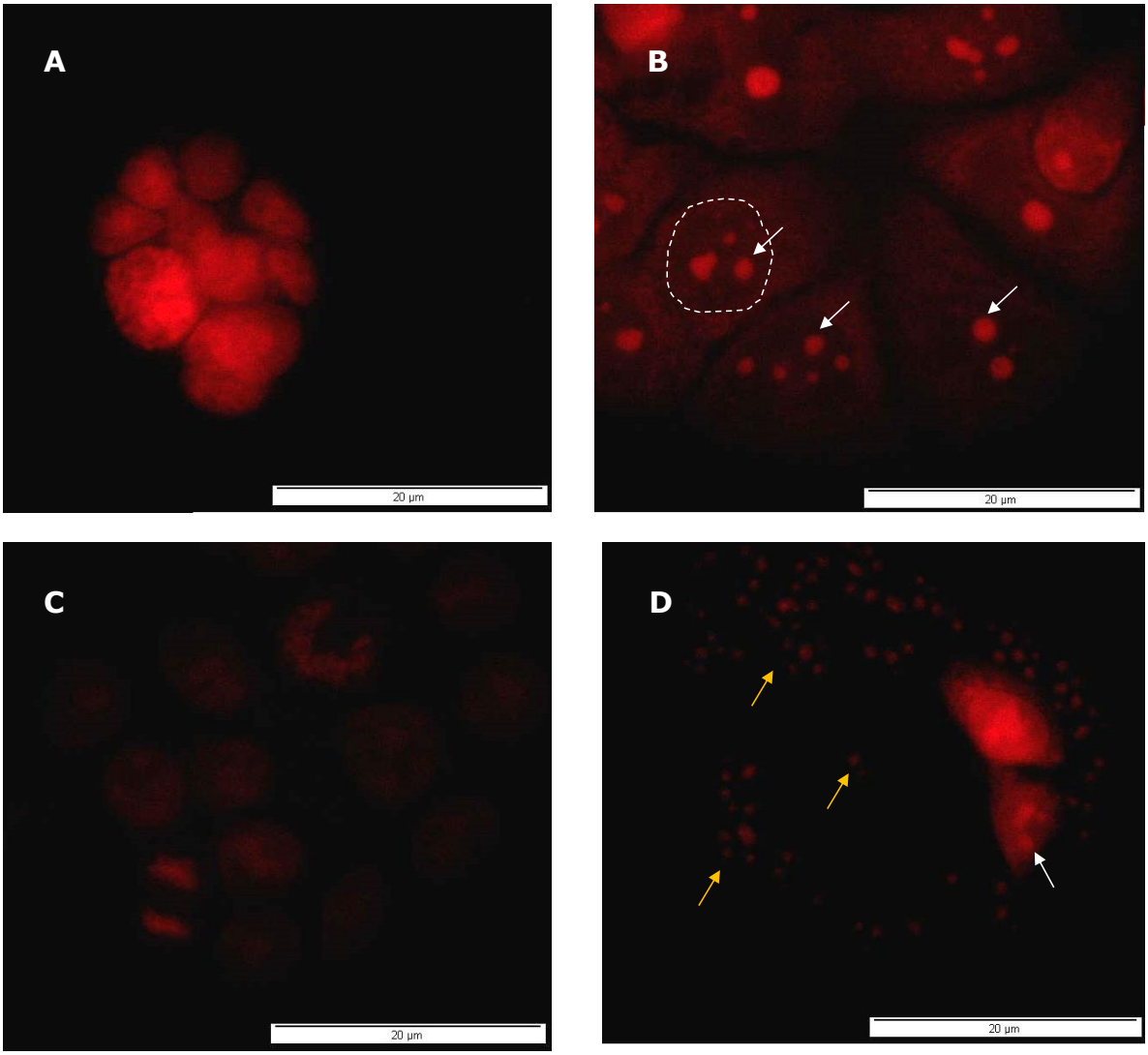


Figura 16: Prueba RNasa y permeabilización. Células MCF-7 se fijaron con PFA y fueron sometidas a un periodo de permeabilización con Tritón X-100 de 10 o 30 minutos, y posteriormente se incubaron con 100µg/mL de RNasa A o PBST (PBS + Tween 20) durante 30 minutos a 37°C. Finalmente las células fueron teñidas con yoduro de propidio (50µg/mL) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 100x **A**: Tritón X-100 por 10 minutos, RNasa A+. Se evidencia tinción nuclear, y no se distinguen nucléolos. **B:** Tritón X-100 por 10 minutos, RNasa A-. Se evidencia tinción dentro del núcleo (circunscrito por línea discontinua) y en el citoplasma. También se evidencia la presencia de nucléolos (flechas blancas). **C:** Tritón X-100 por 30 minutos, RNasa A+. Se observa tinción nuclear débil y los núcleos se encuentran degradados. **D:** Tritón X-100 por 30 minutos, RNasa A-. Se observa tinción nuclear y presencia de pequeñas vesículas (flechas amarillas), presumiblemente corresponden a vesículas de citoplasma. Barra de escala = 20 µm.

6.2.2. Titulación de anticuerpos BG4 e HIS

Para determinar la mejor concentración del anticuerpo primario y secundario, se realizaron ensayos utilizando distintas diluciones de ambos anticuerpos en células MCF-7 sembradas sobre cubreobjetos.

Al utilizar diluciones altas de los anticuerpos BG4 e HIS, como 1:500 y 1:1000 (**Fig. 17A, B, C y D**) no se observa tinción específica, y solo se presenta una tenue tinción de las células. La marca especifica se presenta al incubar las células con el anticuerpo primario a diluciones bajas (1:25 y 1:12,5), y esta se evidencia por la presencia de focos o puntos fluorescentes en el núcleo de las células (**Fig. 17E y F**). Para el resto de los experimentos se decidió ocupar las diluciones: BG4 1:12,5 e HIS 1:100 (**Fig. 17F**).

6.2.3. Ensayos de fijación

Ya que la hipótesis plantea que la inmunomarcación del anticuerpo BG4 varía dependiendo del método de fijación, las células MCF-7 fueron fijadas con diferentes métodos y se evaluaron los niveles de inmunomarcación en ellas.

Se probaron 4 métodos distintos: Células sin fijar, fijación con metanol, fijación con metanol/ácido acético y fijación física por calor húmedo.

A pesar de que ya está establecido que las técnicas de inmunotinción funcionan en células fijadas se decidió probar realizar la técnica en células vivas sin fijar, pero los resultados obtenidos fueron negativos (**Fig. 18A**). Esto debido a que los diferentes reactivos a los que fueron sometidas las células al realizar la inmunofluorescencia (como por ejemplo Tritón X-100) las despegaron del sustrato de vidrio sobre el que fueron sembradas. La marca especifica se obtuvo cuando las células se fijaron con metanol frio a -20°C durante 15 minutos, evidenciado por la presencia de focos fluorescentes en el núcleo de las células (**Fig. 18B**). La fijación con metanol/ácido acético y con calor húmedo solo provocaron la aparición de marca inespecífica y tinción de fondo (**Fig. 18C y D**). Por lo tanto, para el experimento final se comparó la presencia de focos fluorescentes con BG4 en células fijadas con paraformaldehído versus células fijadas con metanol.

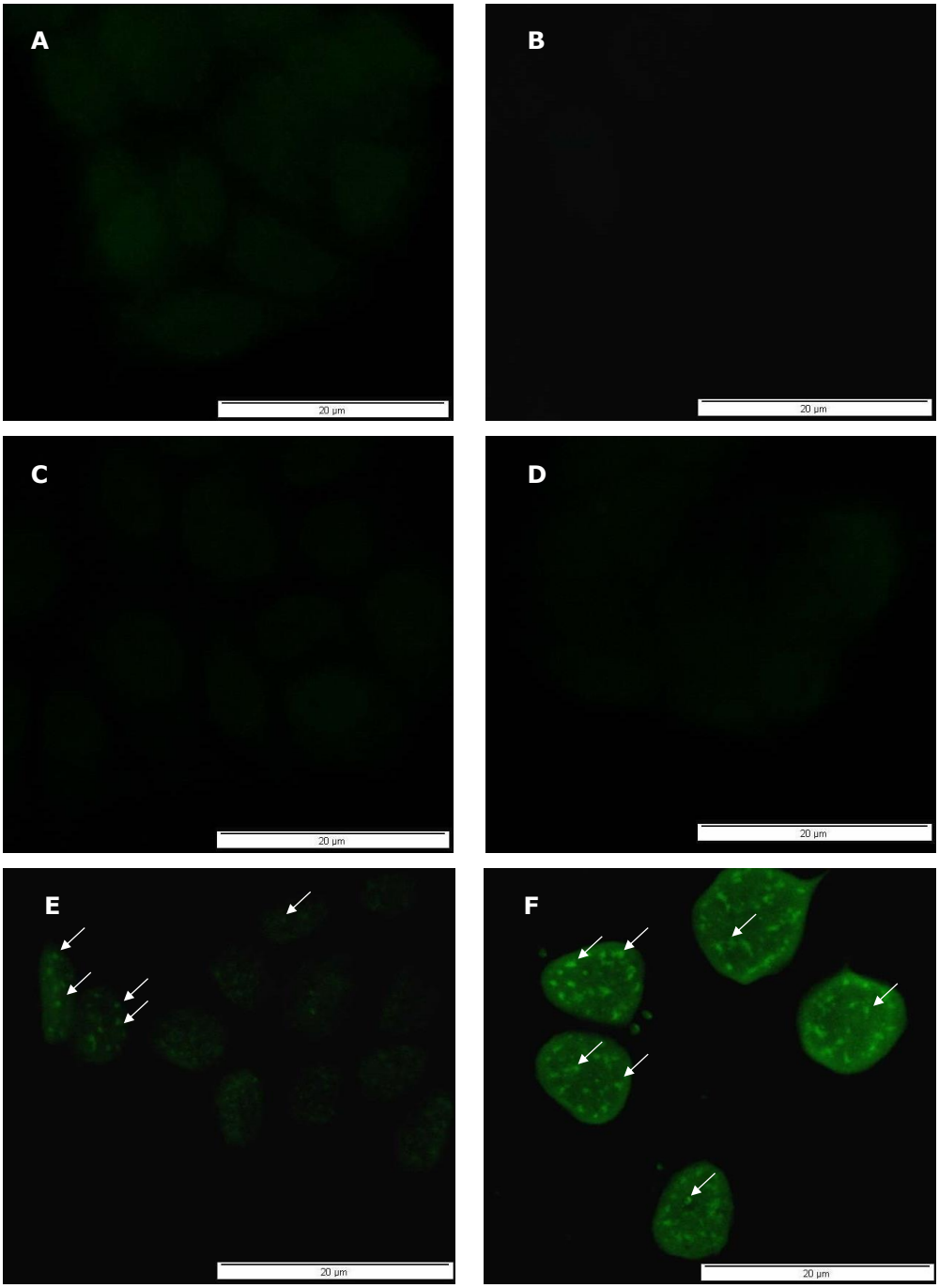


Figura 17. Titulación de los anticuerpos BG4 e HIS. Células MCF-7 se fijaron con PFA, se incubaron con el anticuerpo primario BG4 y posteriormente con el anticuerpo secundario anti-HIS a distintas concentraciones. Posteriormente se observaron en un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 100x. **A:** BG4 1:500, HIS 1:500. Se observa una tenue tinción inespecífica **B:** BG4 1:500, HIS 1:1000. No se observa tinción **C:** BG4 1:1000, HIS 1:500. Se observa una tenue marca inespecífica. **D:** BG4 1:1000, HIS 1:1000. Se observa una tenue marca inespecífica. **E:** BG4 1:25, HIS 1:100. Se observa marca especifica en forma de focos fluorescentes en el núcleo de las células (flechas). **F:** BG4 1:12,5 HIS 1:100. Se observa marca especifica más intensa en forma de focos fluorescentes en el núcleo de las células (flechas). Barra de escala = 20µm.

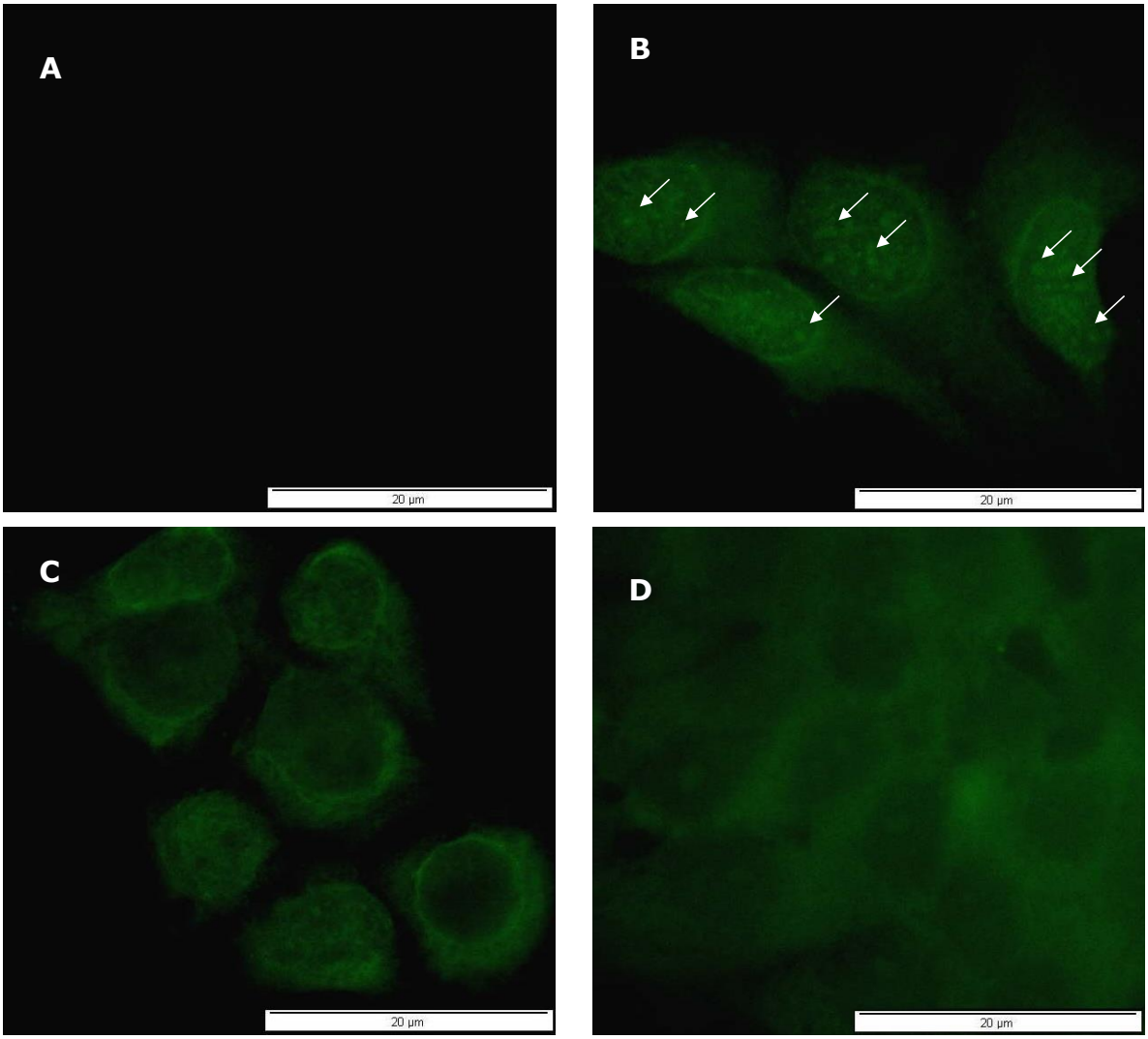


Figura 18. Ensayos de fijación. Células MCF-7 fueron fijadas mediante diferentes métodos, y se realizó inmunofluorescencia con BG4. Posteriormente se observaron en un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 100x. **A:** Células sin fijar. No se observan células. **B:** Fijación con Metanol. Se observa marca especifica en forma de focos fluorescentes en el núcleo de las células (Flechas) **C:** Fijación con Metanol/Ácido acético (3:1). Se observa marca inespecífica. **D:** Fijación por calor húmedo. Se observa marca inespecífica y tinción de fondo. Barra de escala = 20µm.

6.3. Cuantificación de los sitios marcados con un anticuerpo anti-G-cuádruplex en células de la línea celular MCF-7 fijadas con paraformaldehído o fijadas en metanol, mediante inmunofluorescencia *in situ*.

Los resultados obtenidos de la inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo primario BG4 en conjunto con el anticuerpo secundario anti-HIS marcado con DyLight488, en células MCF-7 sincronizadas en la fase S del ciclo celular y fijadas con paraformaldehído o metanol, son mostrados en las **figuras 19 y 20** respectivamente.

En las células fijadas con paraformaldehído se evidenció la presencia de inmunomarcación fluorescente en forma de focos o puntos en el núcleo, pero también en el citoplasma (**Fig. 19A**). En las células fijadas con Metanol también se evidenció un patrón de inmunomarcación en forma de focos tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células (**Fig. 20A**). Este patrón de inmunomarcación difiere con el que fue descrito al momento de estandarizar la inmunofluorescencia (**Fig. 17F y 18B**), asunto que es abordado en la **sección 6.3.1**.

En ambos casos, como control negativo se realizó la inmunofluorescencia, pero obviando la incubación de las células con el anticuerpo primario BG4, lo que resultó en la total ausencia de marca con el anticuerpo secundario anti-HIS (**Fig. 19B y 20B**).

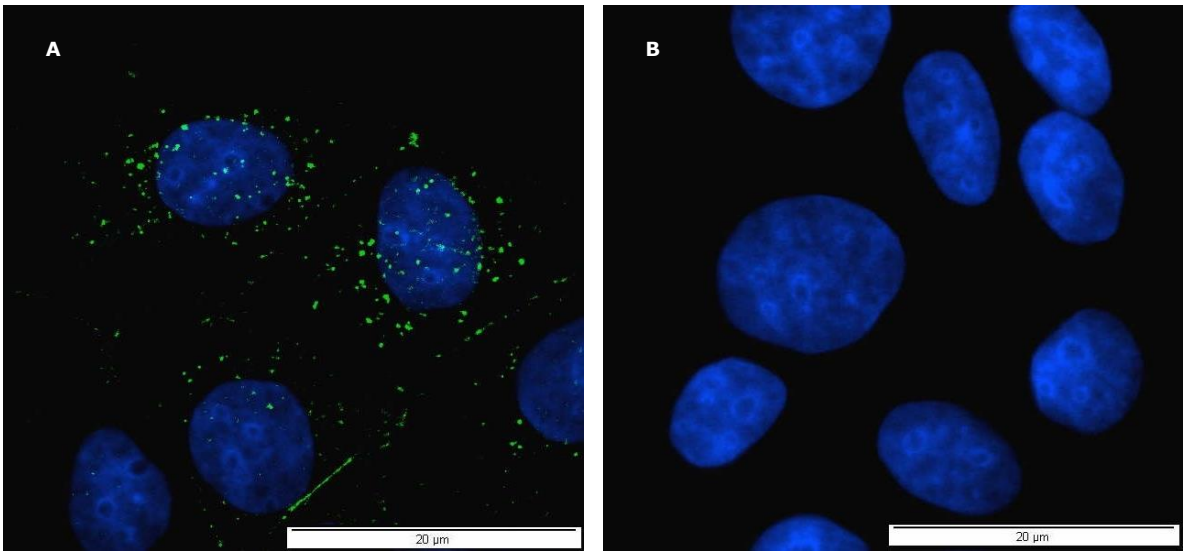


Figura 19. Imagen combinada de Inmunofluorescencia con anticuerpo BG4/HIS DyLight488 + DAPI en células MCF-7 fijadas con paraformaldehído. **A:** Inmunomarcaje positivo con BG4. **B:** Control negativo sin BG4. Barra de escala = 20µm.

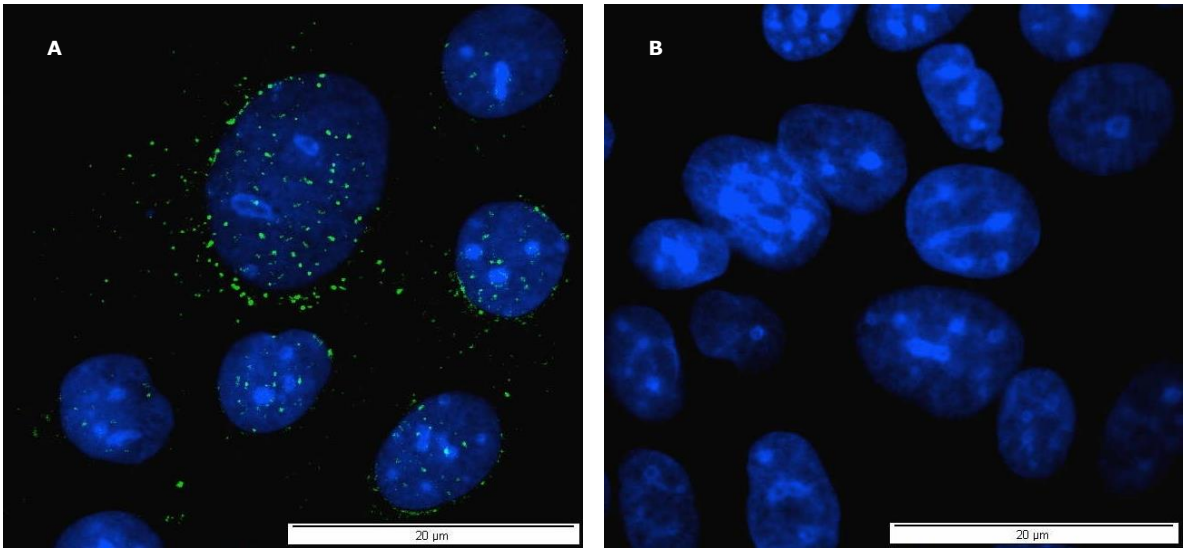


Figura 20. Imagen combinada de Inmunofluorescencia con anticuerpo BG4/HIS DyLight488 + DAPI en células MCF-7 fijadas con Metanol. **A:** Inmunomarcaje positivo con BG4. **B:** Control negativo sin BG4. Barra de escala=20µm.

6.3.1. Experimento control de inmunomarcación del anticuerpo BG4 en estrés celular

Como se mencionó en la sección **5.5.1**, el patron de tinción con BG4 obtenido en células sincronizadas difiere del obtenido en células sin sincronizar, por lo tanto, se realizó un experimento para descartar posibles errores en la técnica.

Reportes recientes evidencian la existencia de una nueva vía de respuesta al estrés oxidativo, mediada principalmente por estructuras G4 endógenas presentes en el DNA nuclear y mitocondrial: en este modelo, propuesto por *Byrd et al*, segmentos de DNA con estructuras G4 son escindidos a causa de estrés oxidativo, y migran hacia el citoplasma para participar en la formación de gránulos de estrés (84). Tomando en cuenta la investigación de Byrd, el cambio del patrón de expresión de inmunomarcación del anticuerpo BG4 en células MCF-7 sin sincronizar, versus células sincronizadas en la fase S del ciclo celular (**ver sección 6.3**), podría corresponder a estructuras G4 del DNA que migraron al citoplasma y se encuentran formando parte de gránulos de estrés. Para evaluar este concepto, se realizó un experimento en donde las células fueron incubadas con 0,5 mM de H_20_2 durante 2 horas para generar una respuesta de estrés y así observar el patrón de expresión con el anticuerpo BG4.

Según se observa en la **Fig. 21A**, en células no sincronizadas y no estresadas, la inmunomarcación con el anticuerpo BG4 apareció delimitada al núcleo de las células. En cambio, cuando las células son tratadas con H_2O_2, la presencia de focos fluorescentes aparece también en el citoplasma de las células (**Fig. 21B**).

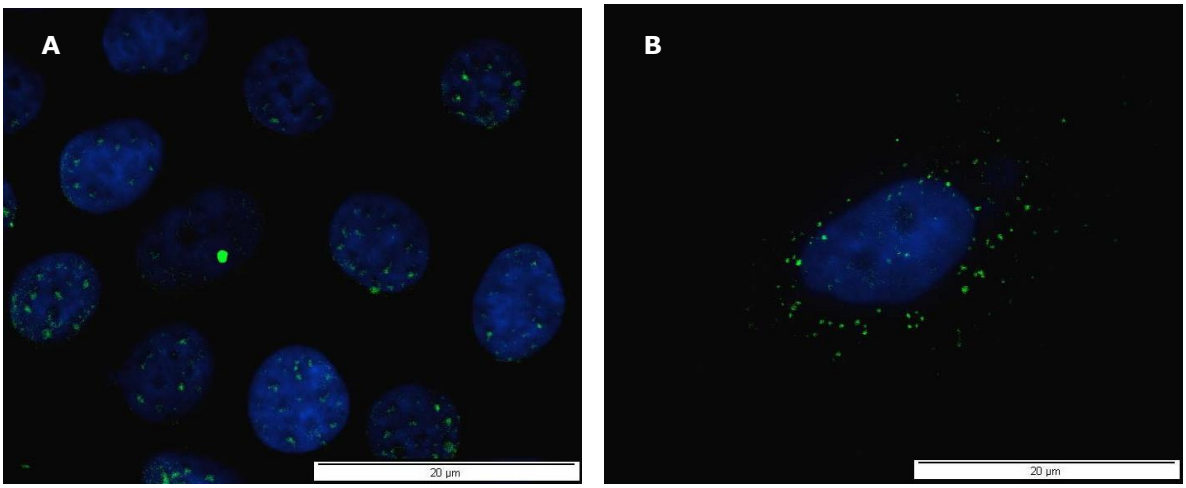


Figura 21. Estrés celular inducido con H_20_2. Células MCF-7 fueron incubadas con medio de cultivo fresco o con H_2O_2 0,5mM durante 2 horas. Luego fueron fijadas y se realizó inmunofluorescencia con BG4. Posteriormente se observaron en un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 100x. **A:** Células incubadas en medio de cultivo fresco. El patrón de marca con el anticuerpo BG4 se limita al núcleo de las células. **B:** Células incubadas con H_2O_2 0,5mM. El patrón de marca con el anticuerpo BG4 aparece en gran cantidad fuera del núcleo, en el citoplasma de la célula.

6.3.2. Análisis estadístico y comparación de la inmunomarcación del anticuerpo BG4 en células MCF-7 fijadas con paraformaldehído o metanol.

Para cada tratamiento (PFA o MeOH), se contaron los focos fluorescentes presentes tanto en el núcleo como en el citoplasma. Las células de los 3 cubreobjetos fueron consideradas como una sola población. A continuación, se presentan las principales estadísticas descriptivas de ambos grupos.

Para el grupo PFA (paraformaldehído), la cantidad de células contadas (unidades experimentales) fue 410, con una media de 79,09 focos inmunofluorescentes por célula, una desviación estándar de 81, y una mediana de 49. La forma de la distribución es asimétrica y con sesgo positivo de valor 2,123

Para el grupo MeOH (metanol), la cantidad de células contadas fue 379, con una media de 137,8 focos por célula, una desviación estándar de 130,2 y una mediana de 88. La forma de la distribución es asimétrica con sesgo positivo de valor 1,504.

Finalmente, se evaluó si existen diferencias significativas entre ambos grupos. El test de normalidad de Shapiro-Wilk dio como resultado que los datos no se ajustaban a una distribución normal, y el test de Levene indicó que las varianzas no eran homogéneas (**Anexo 7, sección 10.7.2**), por lo tanto, se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney para comparar las medianas. Los resultados obtenidos de este test estadístico, indican que existe un 73% más de focos fluorescentes por célula ($p<0.0001$) cuando éstas son fijadas con metanol versus células fijadas con paraformaldehído. (**Fig. 22**)

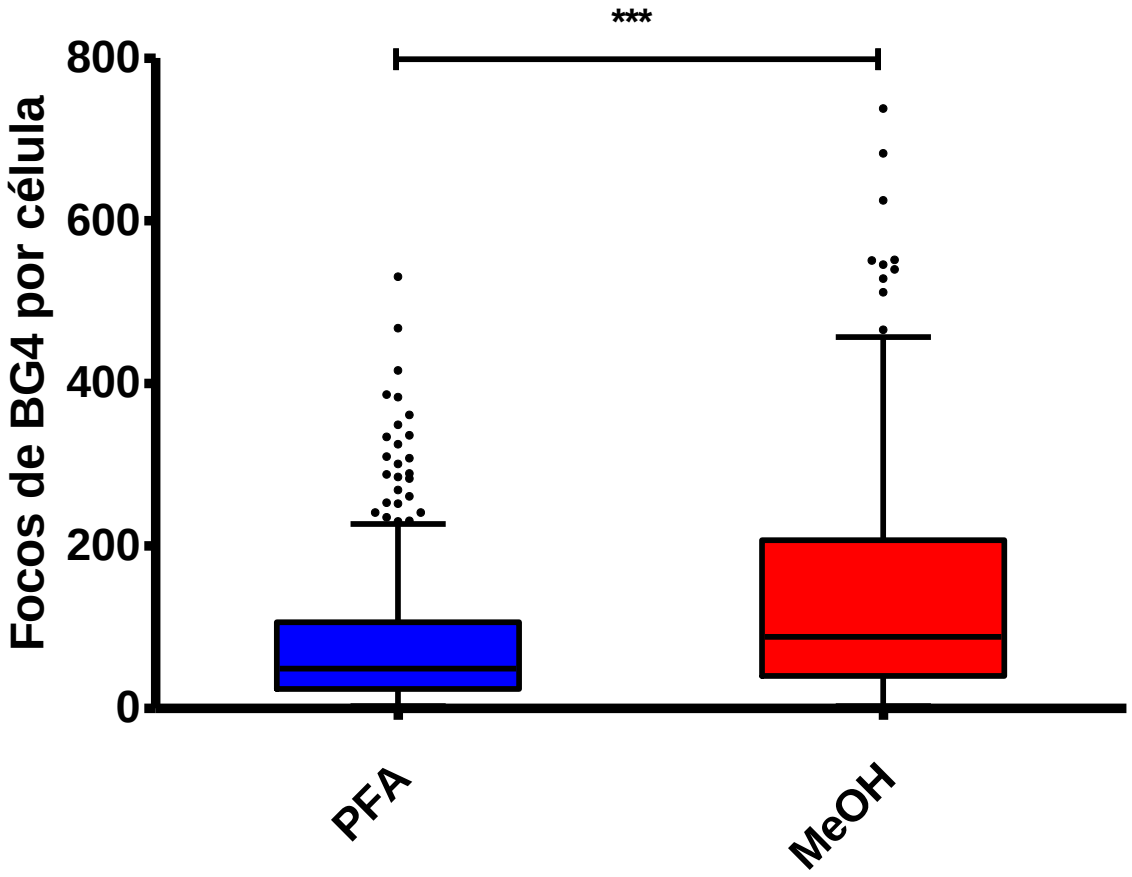


Figura 22. Cuantificación de la cantidad de focos inmunofluorescentes con el anticuerpo BG4 detectados en células sincronizadas en la fase S del ciclo celular, fijadas con paraformaldehído o metanol. En cada grupo fueron contadas 350-400 células. Se buscó diferencias significativas entre las medianas mediante el test no paramétrico de Mann Whitney. Las cajas representan el 50% de los datos, mientras que cada bigote representa el 25% de los datos. La línea que divide las cajas corresponde a la mediana. Los puntos luego de los bigotes simbolizan datos outliers. *** = p value <0,0001.

7. DISCUSIÓN.

Los ácidos nucleicos pueden adoptar conformaciones secundarias no canónicas dentro de las que se encuentran las estructuras G-cuádruplex. El estudio de estas estructuras y su rol biológico ha incrementado en los últimos años, debido al desarrollo de métodos de visualización de estas estructuras *in situ*, principalmente con la creación y uso de anticuerpos anti estructuras G-cuádruplex. Para utilizar un anticuerpo con el fin de detectar estas estructuras en las células, un requisito importante es realizar la fijación de las células (75). Sin embargo, las técnicas de fijación conllevan la aparición de artefactos producidos por los distintos fijadores utilizados (74). Hasta el momento ninguna investigación utilizando estos anticuerpos ha puesto énfasis en determinar si la utilización de diferentes fijadores influye en la detección de estas estructuras. El objetivo de esta investigación fue determinar si existen diferencias en la cantidad de estructuras G4 detectadas por un anticuerpo anti-G-cuádruplex (BG4) en la línea celular MCF-7, cuando estás son fijadas mediante distintos métodos.

Para cumplir el objetivo anterior, células MCF-7 fueron fijadas con un fijador de tipo aditivo (paraformaldehído) o un fijador de tipo coagulante (metanol). La marcación, mediante el anticuerpo BG4, fue cuantificada usando microscopia de fluorescencia, posterior a un protocolo de sincronización de ciclo celular. Los resultados obtenidos mostraron que los focos fluorescentes producidos por el anticuerpo BG4 en células fijadas con metanol fueron significativamente mayor a los producidos en células fijadas con paraformaldehído, lo que indica que el método de fijación afecta la cantidad de señal inmunofluorescente detectada y por lo tanto la presencia de estructuras G-cuádruplex.

7.1. Aproximaciones metodológicas para la inmunodetección de estructuras G-cuádruplex.

Al cuantificar la cantidad de estructuras G-cuádruplex utilizando los focos fluorescentes obtenidos con el anticuerpo BG4 en cada protocolo de fijación, se observó que existe un incremento de un 73%, que es estadísticamente significativo ($p>0.0001$), de estas estructuras en células fijadas con metanol (MeOH), en comparación a células fijadas con paraformaldehído (PFA) (**Fig. 22**).

El carácter entrecruzante que posee el paraformaldehído nos hizo pensar que esta característica tendría como consecuencia la estabilización de las estructuras G-cuádruplex, dando como resultado una mayor presencia de señal inmunofluorescente; sin embargo, los resultados de esta investigación parecen indicar lo contrario. Este resultado podría deberse a la lenta acción entrecruzante del formaldehido, que contrasta a su rápida difusión dentro de la célula (91); de manera que, aunque el fijador ingrese de inmediato a la célula, la fijación propiamente tal no ocurre inmediatamente (92,93). Por otro lado, el metanol posee una alta velocidad de penetración y de fijación (94). El mecanismo de fijación que posee este último incluye el desplazamiento del agua de las proteínas, rompiendo los enlaces de hidrógeno y perturbando la estructura terciaria de éstas, lo que conlleva a que las proteínas precipiten (94). Con respecto a los ácidos nucleicos, estos no precipitan, pero permanecen fuertemente asociados a proteínas (93). Por lo tanto, la mayor presencia de señal detectada con el anticuerpo BG4 en células fijadas con metanol, podría deberse a un mejor acceso del anticuerpo al DNA, ya que este no necesita formar enlaces químicos con otra molécula (como lo hace el formaldehido) y a la alta velocidad de fijación que posee.

En la literatura, el anticuerpo BG4 ha sido utilizado en protocolos de inmunotinción que abarcan distintos métodos de fijación, donde el más utilizado ha sido formaldehido (16,29,70,71,80–82). Sin embargo, la inmunomarcación también ha sido realizada mediante otros fijadores. *Biffi et al* (15) realizaron sus experimentos en células fijadas con PFA, y como prueba de concepto también utilizó células fijadas con metanol/ácido acético. En ambos casos, los autores obtuvieron un patrón de tinción correspondiente a focos fluorescentes circunscritos al núcleo (15). Luego, en una publicación posterior *Biffi et al* (16) también realizaron experimentos en células fijadas con etanol, obteniendo el mismo patrón de tinción que con las células fijadas con PFA. Este patrón de inmunomarcación nuclear fue reproducido también por *Amato et al* (83) y por *Hasegawa et al* (67), quienes utilizaron como fijador metanol/ácido acético y metanol solo, respectivamente. Por lo tanto, de acuerdo a la literatura, el patrón de inmunomarcación para estructuras G-cuádruplex con el anticuerpo BG4 se mantiene independiente del fijador utilizado y corresponde a focos presentes en el núcleo de las células.

Con respecto a otros anticuerpos que se unen a estructuras G-cuádruplex, *Henderson et al* (63) utilizando el anticuerpo 1H6, realizaron experimentos en células

fijadas con PFA y con MeOH, obteniendo un patrón de tinción correspondiente a focos fluorescentes circunscritos al núcleo de las células; *Byrd et al* (84) utilizaron el anticuerpo BG4 en células fijadas con PFA y lo contrastaron con el anticuerpo 1H6, obteniendo un patrón de tinción nuclear con ambos anticuerpos; *Hänsel-hertsch et al* (95) utilizaron el anticuerpo BG4 y el anticuerpo 1H6 para evaluar la presencia de estructuras G4 en diferentes regiones de la cromatina. Con ambos anticuerpos obtuvieron resultados similares: la formación de estructuras G4 en células humanas se encontró en regiones reguladoras de la eucromatina que no contienen nucleosomas (95). Este último resultado contrasta con el de *Hoffmann et al* (96) en donde, usando el anticuerpo 1H6 para detectar G4 mediante microscopia electrónica, detectaron que estas estructuras se localizaban en la heterocromatina. En ambas publicaciones el patrón de inmunomarcación fue nuclear. Al respecto, los experimentos realizados en esta tesis no proporcionan información acerca de la localización exacta de las estructuras G-cuádruplex en el contexto de la cromatina, pero en general, estas publicaciones confirman el patrón de tinción nuclear.

Cabe mencionar que en ninguno de los estudios mencionados anteriormente se cuantificó la señal fluorescente con respecto al fijador utilizado; sin embargo, estimamos que los resultados de esta tesis, obtenidos mediante PFA, alcanzan niveles de inmunomarcación similares a los reportados anteriormente por *Liu et al.*, quienes utilizaron la misma metodología (65).

Como caso especial, la publicación de *Laguerre et al* (58) presenta resultados que se contraponen a los presentados en este trabajo. En uno de sus experimentos, utilizando el anticuerpo BG4 en células MCF-7, se comparó la inmunomarcación en células fijadas con PFA con células fijadas con MeOH. Los resultados mostraron dos patrones de tinción distintos: Al utilizar PFA como fijador, el patrón de tinción fue predominantemente citoplasmático difuso (sin focos aparentes); mientras que cuando se fijaron con MeOH, el patrón de tinción fue nuclear y citoplasmático. Un análisis exhaustivo de los métodos y resultados publicados por *Laguerre et al* (58), nos da cuenta de algunas diferencias metodológicas que podrían explicar la diferencia de resultados respecto a esta tesis. Uno de ellos es que la concentración de BG4 que utilizaron fue de 10 µg/mL (equivalente a una dilución 1:100), la cual es considerablemente menor a la dilución utilizada en esta tesis (1:12,5). Una explicación para la diferencia en las diluciones puede ser una mayor avidez del anticuerpo por el

epítopo, para el caso de *Laguerre et al*. Sin embargo, la publicación no explicita el fabricante del anticuerpo. Si descartamos dicha posibilidad, el patrón de inmunomarcación difuso reportado por la publicación, podría ser un efecto de sobreexposición al capturar la imagen al microscopio. Lamentablemente, los autores no reportan el uso de control con RNasa A, o de controles negativos sin anticuerpo primario, que si se hicieron en nuestro trabajo (**Fig.16, 19B, 20B)**

Actualmente, a los investigadores que utilizan anticuerpos o estudios con células fijadas y permeabilizadas, se les recomienda que los hallazgos deben ser complementadas con imágenes tomadas en células vivas (74). Al respecto, las sondas pequeñas (small-molecule probe), creadas para visualizar estructuras G-cuádruplex en células vivas, han arrojado resultados que se contraponen a los producidos mediante la utilización de anticuerpos. Por ejemplo, *Shivalingam et al* (59) desarrollaron la sonda pequeña DAOTA-M2, la cual reveló, en células vivas, un patrón de tinción nuclear difuso con algunos focos en el citoplasma. Las publicaciones de *Laguerre et al* (58,62) también ponen a prueba el compuesto N-TASQ para visualizar estructuras G4 en células vivas. Sus resultados muestran un patrón de tinción citoplasmático difuso; sin embargo, los detalles metodológicos publicados no permiten comprender a cabalidad el procedimiento (58).

7.2. Gránulos de estrés celular

En esta tesis, el proceso de estandarización de la inmunofluorescencia se realizó en células no sincronizadas, dando como resultado un patrón de marcación correspondiente a focos fluorescentes delimitados al núcleo de las células (**Fig. 17F**). Sin embargo, al realizar la inmunofluorescencia en células sincronizadas en la fase S del ciclo celular, este patrón cambió a la presencia de focos fluorescentes en el núcleo y una gran cantidad en el citoplasma (**Fig. 19 y 20**). Lo anterior se contrapuso al patrón nuclear mostrado en las publicaciones previas que también han utilizado métodos para sincronizar cultivos celulares (15,65,70). En la reevaluación de la metodología utilizada, se descartó la posibilidad de que los focos fluorescentes correspondiesen a estructuras G-cuádruplex formadas por RNA (RNA-G4) (16), debido al uso sistemático de RNAasa A antes de la incubación con el anticuerpo BG4; cuyo efecto negativo se observa en la **figura 16**. Por lo tanto, pensamos que el protocolo

utilizado detectó estructuras G-cuádruplex formadas por DNA en el citoplasma de células sincronizadas.

Al respecto, *Byrd et al.* (84), mostraron evidencias que estructuras G4 presentes en el DNA, participan en formación de gránulos de estrés en el citoplasma. Así fue que, estrés oxidativo inducido en células Hela, melanocitos, y células de melanoma, mediante peróxido de hidrógeno (H_2O_2), indujo que estructuras G4 fuesen detectadas en el citosol; las que co-localizaron con proteínas que forman parte de los gránulos de estrés como TIA1 y G3BP (97). Para evaluar si el patrón de inmunomarcación citoplasmático, detectado en nuestro protocolo en células sincronizadas, pudiese corresponder a estructuras G4 presentes en gránulos de estrés, se decidió replicar uno de los experimentos mostrados por *Byrd et al*. (84): Células MCF-7, no sincronizadas, fueron tratadas con H_2O_2 0,5 mM por 2 horas antes de ser fijadas. La inmunodetección con el anticuerpo BG4 mostró que la localización de la marca fue principalmente citoplasmática (**Fig. 21B**), a diferencia de las células no tratadas con H_2O_2, donde la marcación fue nuclear (**Fig. 21A).** Por lo tanto, interpretamos que el tratamiento con mimosina (utilizada para sincronizar el ciclo celular) y/o la detención del ciclo celular, sería el desencadenante de estrés celular.

Los resultados que se obtuvieron en esta investigación, se encuentran en concordancia con la publicación de *Byrd et al* (84), sin embargo se contraponen con la publicación original de *Biffi et al* (15), en donde también se utilizó mimosina para sincronizar células de la línea MCF-7, pero no fue reportado ningún cambio en el patrón de localización de las estructuras G4.

El principal hallazgo de esta tesis, evidencia que el tipo de fijador influye en la cantidad de estructuras G-cuádruplex que se detectan mediante técnicas de inmunodetección. Lo que muestra que las técnicas de fijación y, en segundo caso, de sincronización celular, no son fácilmente reproducibles. Como se mencionó anteriormente, la utilización de anticuerpos en células fijadas representa la principal evidencia de que estas estructuras se forman dentro de las células; aun así, la discordancia entre la detección en un contexto *in vivo* versus células fijadas, todavía mantiene el escepticismo de su existencia. Por lo tanto, para evidenciar su existencia *in vivo* y dilucidar el posible el rol de estas estructuras dentro de las células, se necesitarán nuevas investigaciones, que vayan en paralelo con el desarrollo de nuevos métodos de detección de estas estructuras; lo que, a juicio del autor de esta tesis, deberán enfocarse en pesquisar el plegamiento *in situ* e *in vivo* de estas estructuras.

8. CONCLUSIÓN

En esta investigación se puso en evidencia que el tipo de fijador que se utilice, ya sea un fijador de tipo aditivo o coagulante, altera las propiedades de la inmunodetección e incide en la cantidad de estructuras G-cuádruplex detectadas mediante el uso del anticuerpo BG4.

El presente trabajo servirá para plantear la necesidad de estandarizar los métodos para detectar estructuras G-cuádruplex mediante anticuerpos, y además sugiere seguir desarrollando nuevas técnicas para detectar estas estructuras dentro de las células, y de esta manera estudiar el rol biológico que estas poseen.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Watson J, Crick F. Molecular structure of nucleic acids. Nature. 1953;171(4356):737–8.
2. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition [Internet]. Regulation. 2004. 1100 p.
3. Armas P, David A, Calcaterra NB. Transcriptional control by G-quadruplexes: In vivo roles and perspectives for specific intervention. Transcription. 2017;8(1):21–5.
4. Bang I. Untersuchungen über die Guanylsäure. Biochem Ztschr. 1910;26:293–311.
5. Gellert M, Lipsett MN, Davies DR. Helix Formation By Guanylic Acid. Proc Natl Acad Sci. 1962;48(12):2013–8.
6. Zimmerman SB, Cohen GH, Davies DR. X-ray fiber diffraction and model-building study of polyguanylic acid and polyinosinic acid. J Mol Biol. 1975;92(2):181–92.
7. Sen D, Gilbert W. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. Nature. 1988;334(6180):364–6.
8. Williamson JR. G-Quartet Structures in Telomeric Dna. AnnuRevBiophysBiomolSruct. 1994;23:703–30.
9. Huppert JL, Balasubramanian S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. Nucleic Acids Res. 2007;35(2):406–13.
10. Lipps HJ, Rhodes D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. Trends Cell Biol. 2009;19(8):414–22.
11. Neidle S. DNA and RNA Quadruplex Structures. In: Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids. Elsevier/Academic Press; 2012. p. 21–42.
12. Neidle S. The Structures of Human Telomeric DNA Quadruplexes. In: Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids. Elsevier/Academic Press; 2012. p. 43–66.
13. Harrington C, Lan Y, Akman SA. The identification and characterization of a G4-DNA resolvase activity. J Biol Chem. 1997;2(December):24631–6.
14. Schaffitzel C, Berger I, Postberg J, Hanes J, Lipps HJ, Plückthun A. In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(15):8572–

7.
15. Biffi G, Tannahill D, McCafferty J, Balasubramanian S. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. Nat Chem. 2013;5(3):182–6.
16. Biffi G, Di Antonio M, Tannahill D, Balasubramanian S. Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. Nat Chem. 2013;6(1):75–80.
17. Guschlbauer W, Chantot J-F, Thiele D. Four-Stranded Nucleic Acid Structures 25 Years Later: From Guanosine Gels to Telomer DNA. J Biomol Struct Dyn. 1990;8(3):491–511.
18. Ghosal G, Muniyappa K. Hoogsteen base-pairing revisited: Resolving a role in normal biological processes and human diseases. Biochem Biophys Res Commun. 2006;343(1):1–7.
19. Phillips K, Dauter Z, Murchie a I, Lilley DM, Luisi B. The crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex at 0.95 A resolution. J Mol Biol. 1997;273(1):171–82.
20. Parkinson GN, Lee MPH, Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. Nature. 2002;417(6891):876–80.
21. Balasubramanian S, Hurley LH, Neidle S. Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? Nat Rev Drug Discov. 2011;10(4):261–75.
22. Todd AK, Johnston M, Neidle S. Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. Nucleic Acids Res. 2005;33(9):2901–7.
23. Haider S, Neidle S. Molecular Modeling and Simulation of G-Quadruplexes and Quadruplex-Ligand Complexes. In: G-Quadruplex DNA: Methods and Protocols. 2010. p. 17–37.
24. Bhattacharyya D, Mirihana Arachchilage G, Basu S. Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability. Front Chem. 2016;4(September):38.
25. Simonsson T. G-quadruplex DNA structures--variations on a theme. Biol Chem. 2001;382(4):621–8.
26. Han H, Hurley LH. G-quadruplex DNA: A potential target for anti-cancer drug design. Trends Pharmacol Sci. 2000;21(4):136–42.
27. Akman SA, Lingeman RG, Doroshow JH, Smith SS. Quadruplex DNA formation in a region of the tRNA gene supF associated with hydrogen peroxide mediated mutations. Biochemistry. 1991;30(35):8648–53.

28. Lee JY, Okumus B, Kim DS, Ha T. Extreme conformational diversity in human telomeric DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(52):18938–43.
29. Drosopoulos WC, Kosiyatrakul ST, Schildkraut CL. BLM helicase facilitates telomere replication during leading strand synthesis of telomeres. J Cell Biol. 2015;210(2):191–208.
30. Mendoza O, Bourdoncle A, Boulé JB, Brosh RM, Mergny JL. G-quadruplexes and helicases. Nucleic Acids Res. 2016;44(5):1989–2006.
31. Gray LT, Vallur AC, Eddy J, Maizels N. G quadruplexes are genomewide targets of transcriptional helicases XPB and XPD. Nat Chem Biol. 2014;10(4):313–8.
32. Chen MC, Murat P, Abecassis K, Ferre-D'Amare AR, Balasubramanian S. Insights into the mechanism of a G-quadruplex-unwinding DEAH-box helicase. Nucleic Acids Res. 2015;43(4):2223–31.
33. Gao X, Ma W, Nie J, Zhang C, Zhang J, Yao G, et al. A G-quadruplex DNA structure resolvase, RHAU, is essential for spermatogonia differentiation. Cell Death Dis. 2015;6(1):e1610.
34. Das K, Srivastava M, Raghavan SC. GNG motifs can replace a GGG stretch during G-quadruplex formation in a context dependent manner. PLoS One. 2016;11(7):1–21.
35. Neidle S. Introduction: Quadruplexes and their Biology. In: Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids. Elsevier/Academic Press; 2012. p. 1–20.
36. Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. Genes Dev. 1997;11(21):2801–9.
37. Ying L, Green JJ, Li H, Klenerman D, Balasubramanian S. Studies on the structure and dynamics of the human telomeric G quadruplex by single-molecule fluorescence resonance energy transfer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(25):14629–34.
38. Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. Nat New Biol. 1972;239(94):197–201.
39. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Specific association of human telomerase activity with inmortal cells and cancer. Science (80-). 1994;266:2011–5.
40. Yuan L, Tian T, Chen Y, Yan S, Xing X, Zhang Z, et al. Existence of G-quadruplex

structures in promoter region of oncogenes confirmed by G-quadruplex DNA cross-linking strategy. Sci Rep. 2013;3:1811.

41. Rodriguez R, Miller KM, Forment J V, Bradshaw CR, Nikan M, Britton S, et al. Small molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. Nat Chem Biol. 2012;8(3):301–10.
42. Phan AT, Kuryavyi V, Gaw HY, Patel DJ. Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter. Nat Chem Biol. 2005;1(3):167–73.
43. Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(18):11593–8.
44. Gomez D, Lamarteleur T, Lacroix L, Mailliet P, Mergny JL, Riou JF. Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing. Nucleic Acids Res. 2004;32(1):371–9.
45. Besnard E, Babled A, Lapasset L, Milhavet O, Parrinello H, Dantec C, et al. Unraveling cell type–specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. Nat Struct Mol Biol. 2012;19(8):837–44.
46. Valton AL, Prioleau MN. G-Quadruplexes in DNA Replication: A Problem or a Necessity? Trends Genet. 2016;32(11):697–706.
47. Maizels N, Gray LT. The G4 Genome. PLoS Genet. 2013;9(4):e1003468.
48. Ryvkin P, Hershman SG, Wang L, Johnson FB. Computational Approaches to the Detection and Analysis of Sequences with Intramolecular G-Quadruplex forming Potential. In: G-Quadruplex DNA: Methods and Protocols. 2010. p. 39–50.
49. Huppert JL, Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. Nucleic Acids Res. 2005;33(9):2908–16.
50. Kostadinov R, Malhotra N, Viotti M, Shine R, D'Antonio L, Paramjeet B. GRSDB: a database of quadruplex forming G-rich sequences in alternatively processed mammalian pre-mRNA sequences. Nucleic Acids Res. 2006;34(90001):D119–24.
51. Zhang R, Lin Y, Zhang CT. Greglist: A database listing potential G-quadruplex regulated genes. Nucleic Acids Res. 2008;36(SUPPL. 1):372–6.
52. Mishra SK, Tawani A, Mishra A, Kumar A. G4IPDB: A database for G-quadruplex structure forming nucleic acid interacting proteins. Sci Rep. 2016;6(1):38144.

53. Sun D, Hurley LH. Biochemical Techniques for the Characterization of G-Quadruplex Structures: EMSA, DMS Footprinting, and DNA Polymerase Stop Assay. In: G-Quadruplex DNA: Methods and Protocols. 2010. p. 65–79.
54. Harris LM, Merrick CJ. G-Quadruplexes in Pathogens: A Common Route to Virulence Control? PLoS Pathog. 2015;11(2).
55. Neidle S. Telomeric Quadruplex Ligands I: Anthraquinones and Acridines. In: Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids. Elsevier/Academic Press; 2012. p. 67–91.
56. Mattes WB, Hartley JA, Kohn KW. Mechanism of DNA strand breakage by piperidine at sites of N7-alkylguanines. BBA - Gene Struct Expr. 1986;868(1):71–6.
57. Okumus B, Ha T. Real-Time Observation of G-Quadruplex Dynamics Using Single-Molecule FRET Microscopy. In: G-Quadruplex DNA: Methods and Protocols. 2010. p. 81–96.
58. Laguerre A, Hukezalie K, Winckler P, Katranji F, Chanteloup G, Pirrotta M, et al. Visualization of RNA-Quadruplexes in Live Cells. J Am Chem Soc. 2015;137(26):8521–5.
59. Shivalingam A, Izquierdo MA, Le Marois A, Vyšniauskas A, Suhling K, Kuimova MK, et al. The interactions between a small molecule and G-quadruplexes are visualized by fluorescence lifetime imaging microscopy. Nat Commun. 2015;6:8178.
60. Müller S, Kumari S, Rodriguez R, Balasubramanian S. Small-molecule-mediated G-quadruplex isolation from human cells. Nat Chem. 2010;2(12):1095–8.
61. Collie GW, Parkinson GN. The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines. Chem Soc Rev. 2011 Nov 14 [cited 2019 Mar 20];40(12):5867.
62. Laguerre A, Wong JMY, Monchaud D. Direct visualization of both DNA and RNA quadruplexes in human cells via an uncommon spectroscopic method. Sci Rep. 2016;6(April):32141.
63. Henderson A, Wu Y, Huang YC, Chavez EA, Platt J, Johnson FB, et al. Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells. Nucleic Acids Res. 2014;42(2):860–9.
64. Lam EYN, Beraldi D, Tannahill D, Balasubramanian S. G-quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA. Nat Commun. 2013;4:1796.
65. Liu H-Y, Zhao Q, Zhang T-P, Wu Y, Xiong Y-X, Wang S-K, et al. Conformation

Selective Antibody Enables Genome Profiling and Leads to Discovery of Parallel G-Quadruplex in Human Telomeres. Cell Chem Biol. 2016;23(10):1261–70.

66. Weldon C, Behm-Ansmant I, Hurley LH, Burley GA, Branlant C, Eperon IC, et al. Identification of G-quadruplexes in long functional RNAs using 7-deazaguanine RNA. Nat Chem Biol. 2016;(November):1–4.
67. Hasegawa D, Okabe S, Okamoto K, Nakano I, Shin-Ya K, Seimiya H. G-quadruplex ligand-induced DNA damage response coupled with telomere dysfunction and replication stress in glioma stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2016;471(1):75–81.
68. Banerjee K, Wang M, Cai E, Fujiwara N, Baker H, Cave JW. Regulation of tyrosine hydroxylase transcription by hnRNP K and DNA secondary structure. Nat Commun. 2014;5:5769.
69. Biffi G, Tannahill D, Miller J, Howat WJ, Balasubramanian S. Elevated levels of G-quadruplex formation in human stomach and liver cancer tissues. PLoS One. 2014;9(7).
70. Moye AL, Porter KC, Cohen SB, Phan T, Zyner KG, Sasaki N, et al. Telomeric G-quadruplexes are a substrate and site of localization for human telomerase. Nat Commun. 2015;6(May):7643.
71. Xiong Y-X, Su H-F, Lv P, Ma Y, Wang S-K, Miao H, et al. A newly identified berberine derivative induces cancer cell senescence by stabilizing endogenous G-quadruplexes and sparking a DNA damage response at the telomere region. Oncotarget. 2015;6(34):35625–35.
72. Conlon EG, Lu L, Sharma A, Yamazaki T, Tang T, Shneider NA, et al. The C9ORF72 GGGGCC expansion forms RNA G-quadruplex inclusions and sequesters hnRNP H to disrupt splicing in ALS brains. Elife. 2016;5(September):1–28.
73. François M, Leifert WR, Hecker J, Faunt J, Fenech MF. Guanine-quadruplexes are increased in mild cognitive impairment and correlate with cognitive function and chromosomal DNA damage. DNA Repair (Amst). 2016;46:29–36.
74. Schnell U, Dijk F, Sjollema KA, Giepmans BNG. Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. Nat Methods. 2012;9(2):152–8.
75. Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques [Internet]. 6th ed. Churchill Livingstone/Elsevier; 2008. 725 p.
76. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde Fixation. J Histochem

Cytochem. 1985;33(8):845–53.
77. Montero C. The Antigen–Antibody Reaction in Immunohistochemistry. Histochemistry. 2003;51(1):1–4.
78. Schmiedeberg L, Skene P, Deaton A, Bird A. A Temporal threshold for formaldehyde crosslinking and fixation. PLoS One. 2009;4(2).
79. Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. J Histochem Cytochem. 1997;45(3):327–43.
80. François M, Leifert WR, Tellam R, Fenech MF. Folate deficiency and DNA-methyltransferase inhibition modulate G-quadruplex frequency. Mutagenesis. 2016;31(4):409–16.
81. Hu MH, Chen S Bin, Wang B, Ou TM, Gu LQ, Tan JH, et al. Specific targeting of telomeric multimeric G-quadruplexes by a new triaryl-substituted imidazole. Nucleic Acids Res. 2017;45(4):1606–18.
82. Zhang Y, Zeng D, Cao J, Wang M, Shu B, Kuang G, et al. Interaction of Quindoline derivative with telomeric repeat–containing RNA induces telomeric DNA-damage response in cancer cells through inhibition of telomeric repeat factor 2. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 2017;1861(12):3246–56.
83. Amato J, Pagano A, Cosconati S, Amendola G, Fotticchia I, Iaccarino N, et al. Discovery of the first dual G-triplex/G-quadruplex stabilizing compound: a new opportunity in the targeting of G-rich DNA structures? Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 2017;1861(5):1271–80.
84. Byrd AK, Zybailov BL, Maddukuri L, Gao J, Marecki JC, Jaiswal M, et al. Evidence that G-quadruplex DNA accumulates in the cytoplasm and participates in stress granule assembly in response to oxidative stress. J Biol Chem. 2016;291(34):18041–57.
85. Roth V. Doubling Time Computing [Internet]. 2006.
86. Jackman J, O'Connor PM. Methods for Synchronizing Cells at Specific Stages of the Cell Cycle. Curr Protoc Cell Biol. 1998 Oct;Chapter 8(1):8.3.1-8.3.20.
87. Hughes T a, Cook PR. Mimosine arrests the cell cycle after cells enter S-phase. Exp Cell Res. 1996;222(2):275–80.
88. Kulp KS, Vulliet PR. Mimosine Blocks Cell Cycle Progression by Chelating Iron in Asynchronous Human Breast Cancer Cells. Toxicol Appl Pharmacol. 1996;139(2):356–64.
89. Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by

propidium iodide staining. J Cell Biol. 1975 Jul 1 [cited 2018 Oct 10];66(1):188–93.

90. Faul F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behav Res Methods. 2007 May [cited 2017 May 19];39(2):175–91.
91. Hewlett BR. Penetration Rates of Formaldehyde. Micros Today. 2002 Nov 14;10(6):30–1.
92. Kiernan JA. Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do. Micros Today. 2000 Jan 14;8(1):8–13.
93. Kiernan JA. Histological and histochemical methods : theory and practice. 4th ed. Scion; 2008. 606 p.
94. Huang BQ, Yeung EC. Chemical and Physical Fixation of Cells and Tissues: An Overview. In: Plant Microtechniques and Protocols. Cham: Springer International Publishing; 2015 [cited 2018 Oct 9]. p. 23–43.
95. Hänsel-Hertsch R, Beraldi D, Stefanie L, Giovanni M, Zyner K, Parry A, et al. G-quadruplex structures mark human regulatory chromatin. Nat Genet. 2016;48(10):1267–72.
96. Hoffmann RF, Moshkin YM, Mouton S, Grzeschik NA, Kalicharan RD, Kuipers J, et al. Guanine quadruplex structures localize to heterochromatin. Nucleic Acids Res. 2016;44(1):152–63.
97. Kedersha N, Anderson P. Mammalian Stress Granules and Processing Bodies. Methods Enzymol. 2007;431(07):61–81.

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1. Protocolo tinción con yoduro de propidio para análisis de ciclo celular.

Cosecha de células	min
Sacar placa (s) de 6 pocillos del incubador y mirarlas en microscopio invertido	5
Trasladar placa a lab. Biología molecular (desde este punto no se necesita esterilidad)	5
Quitar medio de cultivo y guardarlo en tubos de centrifuga de 15mL debidamente rotulados	5
Lavar pocillos con 1 mL de PBS	5
Incubar pocillos con 500 µl de tripsina x 3 min (5 min max)	5
Inactivar tripsina con 500-1000 µl de medio de cultivo con SFB	5
Tomar todo el medio con células y traspasar a los tubos de 15mL que previamente tenían medio (Resuspender al menos 10 veces tomando todo el contenido y soltándolo en la pared del tubo para separar las células)	5
Centrifugar a 200g por 5 min a 4°C	5
Eliminar sobrenadante (voltear rápidamente el tubo y secar el borde con papel)	5
Fijación	
Añadir 1 ml de etanol 70% frio a -20°C gota a gota sobre el pellet y aplicar vortex brevemente. Si queda pellet, Resuspender con micropipeta. Dejar fijando durante al menos 30 min a -20°C. Las células pueden permanecer a -20°C durante semanas.	30
Añadir 4 mL de PBS y resuspender	5
Centrifugar a 200g por 5 min	5
Eliminar sobrenadante (voltear rápidamente el tubo y secar el borde con papel)	5
Resuspender en 1ml de PBS	5
Centrifugar a 200g por 5 min	5
Eliminar sobrenadante (voltear rápidamente el tubo y secar el borde con papel)	5
Tinción Yoduro de propidio	
Incubar en 500 µl de solución yoduro de propidio: 100 µg/ml RNasa A en PBS + 50 µg/ml yoduro propidio. Durante 15-30 min a 37° C.	15
Traspasar a tubos de citómetro	5
Obtención de datos en citómetro de flujo	
Crear en citómetro dot plot FSC- SSC, dot plot FL2-A vs FL2-W, histograma FL2-A.	5
Colocar como parámetro DDM FL2	1
Colocar FL2 como amplificación lin y ajustar voltaje a 430-450 y amp gain en 1.00	1
Colocar amp gain de FL2-A y FL2-W en 1.00	1
Correr muestra en modo setup y crear gate en dot plot FL2-A vs FL2-W de manera que se excluyan los dobletes o cúmulos de células	1
Colocar el gate creado en el histograma FL2-A y setear para que se detenga al	1

capturar 20.000 de estos eventos	
Correr muestra a velocidad lenta o media (nunca alta)	10
Guardar datos	
Análisis de datos	
En FlowJo abrir archivo y crear dot plot FCS vs SSC. Dividir en 4 cuadrantes de manera que el cuadrante 3 quede en 200.	
Seleccionar cuadrante 2 y crear dot plot FL2-W vs FL2-A. Crear gate de cumulo de células individuales.	
Seleccionar gate y aplicar opción "Cell Cycle Analysis"	
Exportar datos a planilla Excel.	

10.2. Anexo 2. Protocolo de inmunofluorescencia para células cultivadas en cubreobjetos utilizando el anticuerpo BG4.

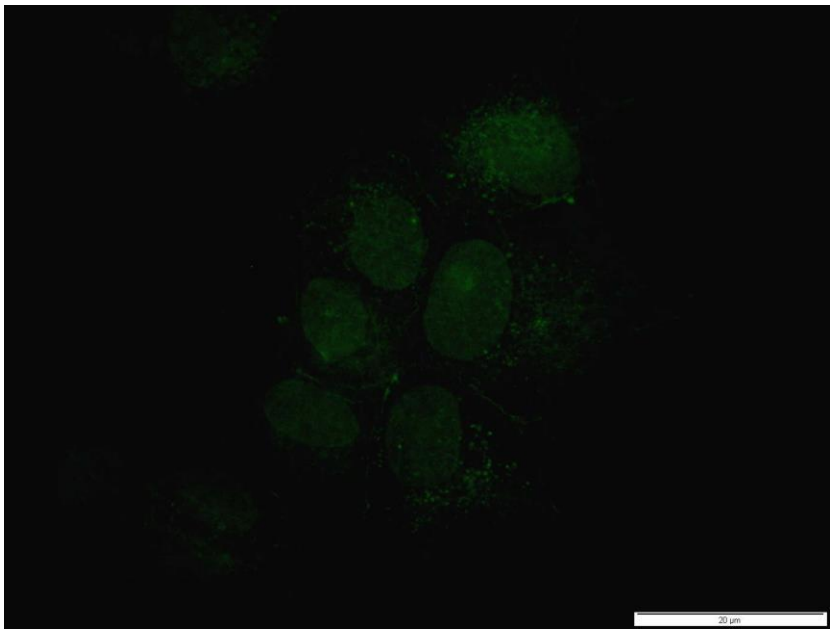
Sembrado de cubreobjetos	min
En placas de cultivo de 12 pocillos colocar un cubreobjeto redondo estéril por pocillo.	5
Sembrar la cantidad adecuada de células en c/cubreobjeto contenida en un volumen máximo de 100µL. Tratar de que los 100µL queden solamente sobre el cubreobjeto y no toque el pocillo. Como máximo sembrar 50.000 células por cubreobjeto si la IF se va a realizar al día siguiente. Calcular 30 horas de tiempo de duplicación. Dejar con cuidado la placa en el incubador durante 15-30 min para que las células se adhieran al cubreobjeto	30
Añadir con cuidado y por el borde opuesto al cubreobjeto, 1mL de medio de cultivo al pocillo	5
Fijación	
Eliminar medio de cultivo.	5
Lavar con 500µL PBS.	5
Utilizando la misma placa de cultivo, añadir 1 mL PFA 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, o metanol 100% enfriado a -20°C, durante 15 minutos.	15
Lavar con 1 mL PBS durante 5 minutos en pocillo.	5
Lavar con 1 mL PBS durante 5 minutos en pocillo.	5
Lavar con 1 mL PBS durante 5 minutos en pocillo.	5
Preparación de cámara de incubación	
Cortar trozos de parafilm un poco más grande que el ancho de un portaobjetos. Colocar el parafilm sobre el portaobjetos y estirar solo los bordes. Sobre el parafilm se colocarán las gotas de los reactivos donde se incubarán las células.	
Con una pinza trasladar cubreobjetos redondos sobre la gota de reactivo en el parafilm. Tener mucho cuidado y asegurarse de colocar los cubreobjetos con las células hacia abajo sobre la gota.	
Permeabilización	
Permeabilizar con Tritón x-100 0,2% en PBS por 10 minutos a 37°C. en pocillo. 500µl por cubreobjeto	10
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador	5
Tratamiento con RNasa	
Tratar con 25µL de RNasa A (100ug/ml de RNasa A en PBS) por 30 min a 37°C. sobre Parafilm.	30
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Bloqueo de sitios inespecíficos	
Bloquear con Cas-Block durante 30 min a temp. Amb. 25µl por cubreobjeto en	30

parafilm.	
Incubación anticuerpo primario	
Tomar el cubreobjeto con Cas-Block e Incubar con Anticuerpo primario BG4 1:12,5 (80 ng/µL) disuelto en PBST + Cas-Block 10%. Durante 1 hora 30min sobre parafilm en cámara húmeda a 37°C. 15µl por cubreobjeto	90
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Incubación anticuerpo secundario	
Incubar con anticuerpo secundario anti-HIS Dylight488 1:100 (10 ng/µL) disuelto en PBST + Cas-Block 10% durante 1 hora 30 min sobre parafilm en cámara húmeda y oscuridad. 25µl por cubreobjeto	90
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Contraste nuclear	
Incubar células con Dapi 1µg/ml en PBS por 20 min. 50µL por cubreobjeto en pocillo.	20
Lavar con 500µL de PBST durante 5 minutos en pocillo sobre agitador.	5
Montaje	
Colocar 10 µL de medio de montaje hidrófilo con anti-fading en un portaobjeto limpio y rotulado. Con una pinza, tomar el cubreobjetos y colocarlo con las células hacia abajo sobre la gota de medio de montaje	5
Esperar 20 min de secado a temp. Amb. Y Sellar el borde del cubreobjeto con esmalte de uña para prevenir el secado de la preparación. almacenar en oscuridad.	20
Análisis en microscopio de epifluorescencia.	
Configurar el microscopio para Dapi y observar a 100x	
Configurar el microscopio para DyLight 488 y observar a 100x. Tiempo de exposición entre 42 y 56. Min 187. Max 485	

10.3. Anexo 3. Procesamiento de imágenes

Cada imagen tomada en el microscopio fue sometida a un proceso de "limpieza" mediante deconvolución 3D y posteriormente se ajustó el brillo y contraste en 20 y 80 respectivamente (**Fig. 23**)

A



B

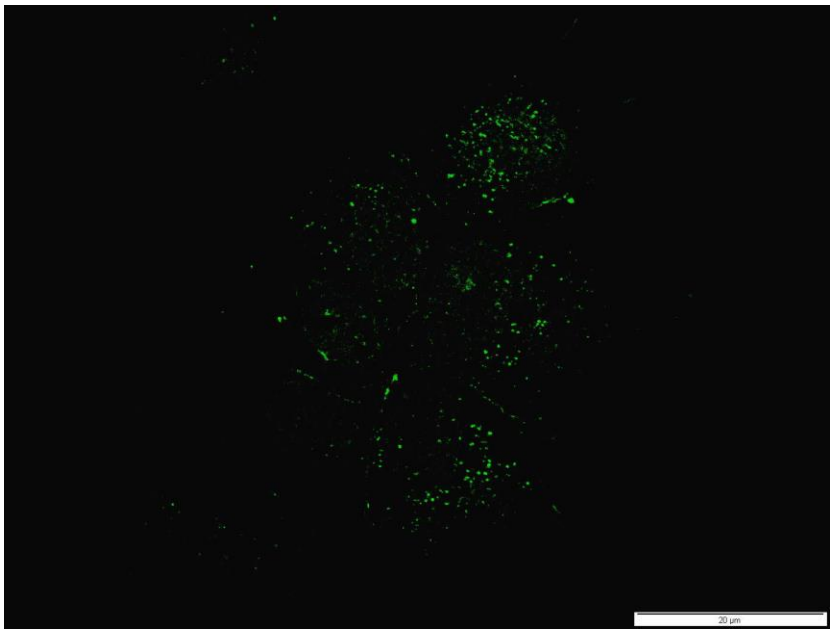
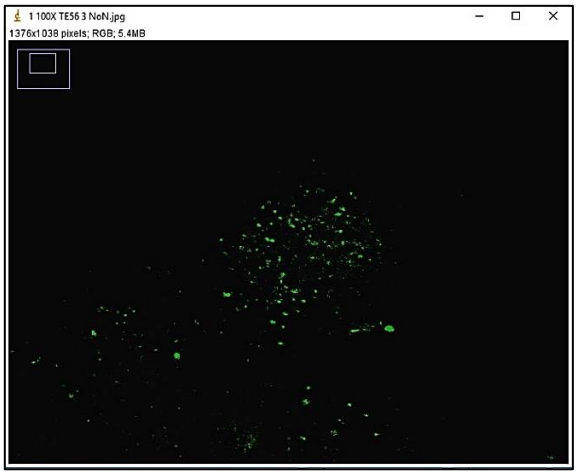


Figura 23: Procesamiento de imágenes. **A:** Imagen original. **B:** Imagen sometida a deconvolución 3D, Brillo 20, contraste 80. Barra de escala=20µm

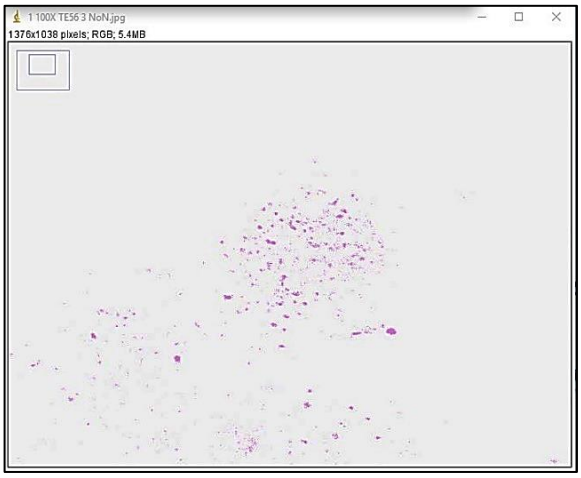
10.4. Anexo 4. Cuantificación de señal inmunofluorescente mediante ITCN.

El conteo de focos inmunofluorescentes se realizó en el programa ImageJ mediante el plugin ITCN. Para realizar el conteo se realizaron los siguientes pasos: la imagen se abre en ImageJ (**Fig. 24A**), se invierten los colores (**Fig. 24B**), se transforma a una imagen 8-bit (**Fig. 24C**), y se selecciona el área de conteo (**Fig. 24D**). Luego, se inicia el plugin, y se completa el cuadro dialogo con los siguientes valores: Width 5, Minimum distance 2,5, Thresold 5. Se selecciona "Detect dark peaks", y se presiona count. El programa crea una nueva imagen resaltando todas las áreas que consideró en el conteo (**Fig. 24E**), y un cuadro resumen con la cantidad e peaks contabilizado (**Fig. 24F**).

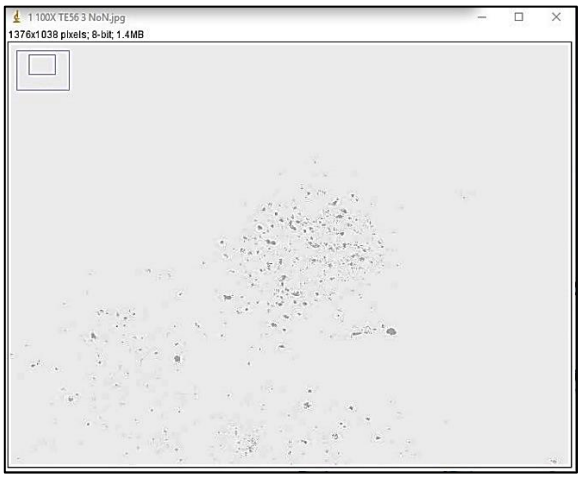
A



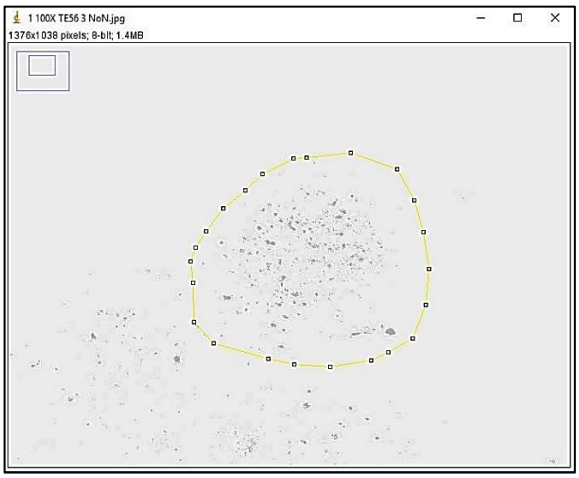
B



C



D



E **F**

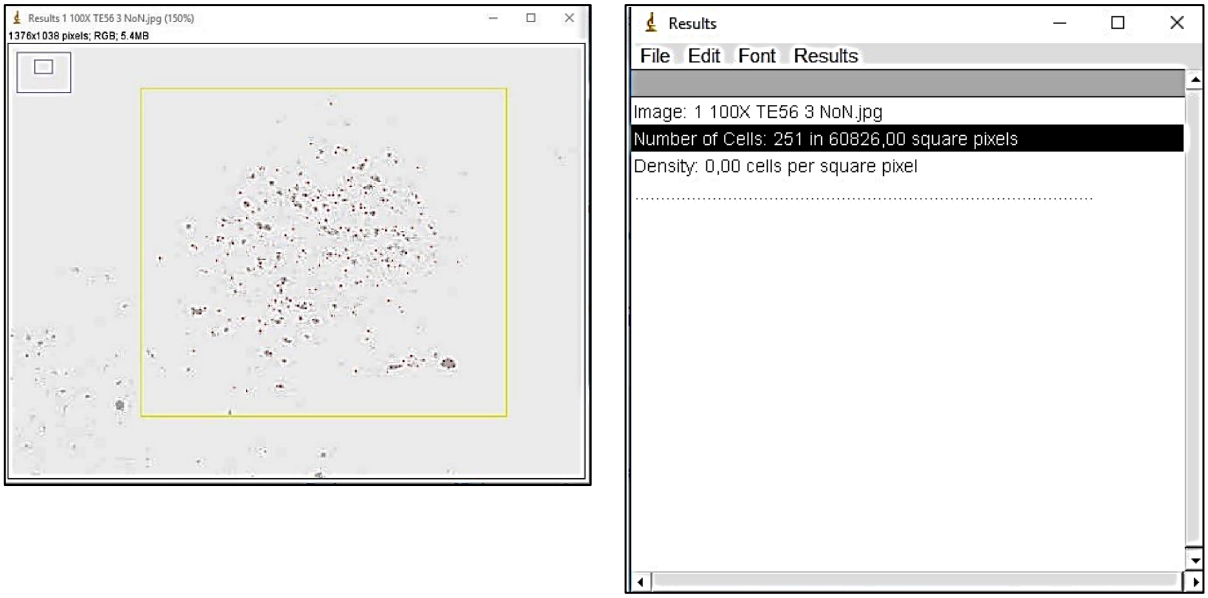
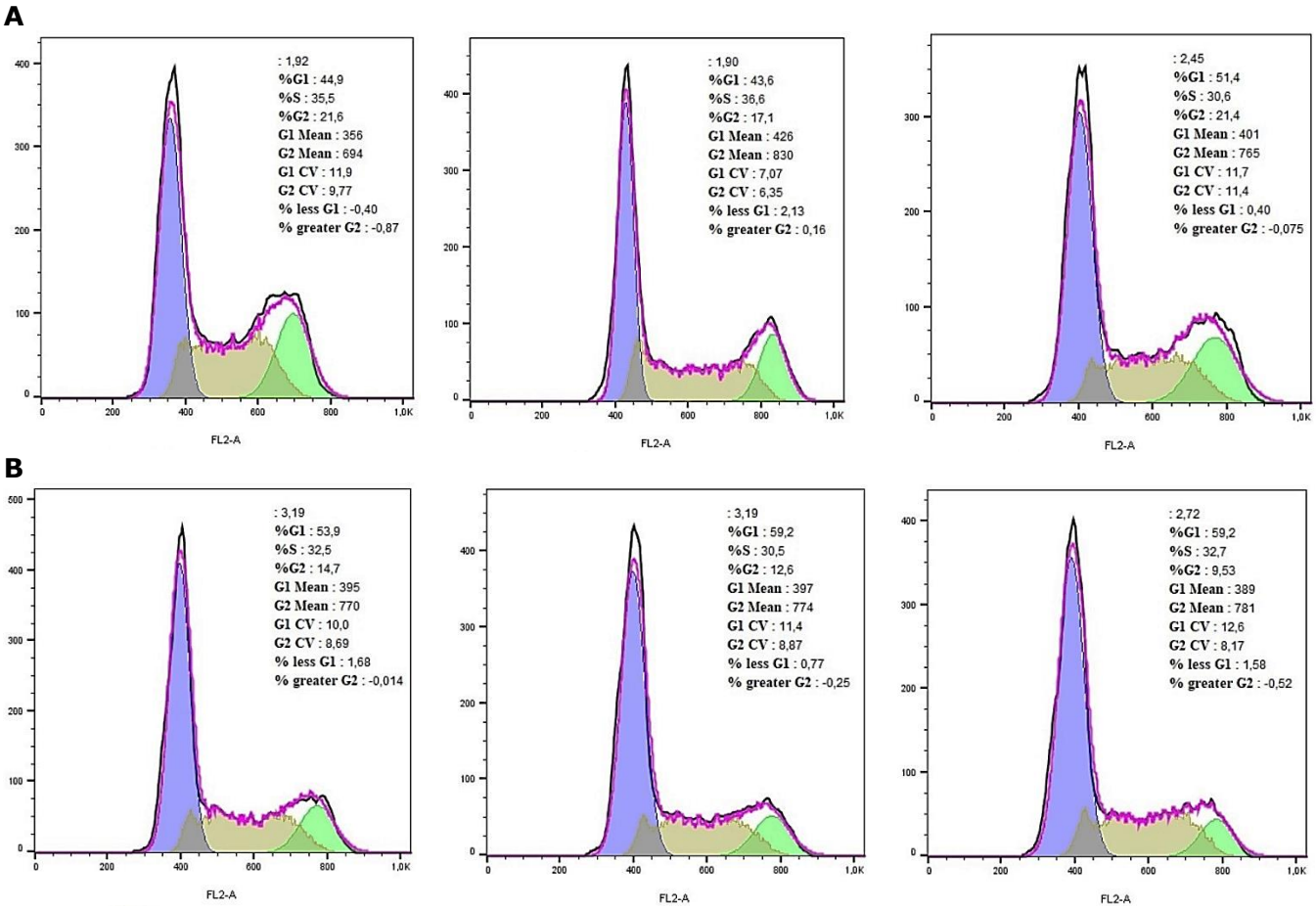


Figura 24: **Conteo de focos inmunofluorescentes mediante imageJ**. **A**: Imagen inicial. **B:** Inversión de colores. **C:** Imagen 8-bit. **D:** Área de conteo seleccionada. **E:** Peaks considerados en el conteo. **F:** Cuadro resumen.

10.5. Anexo 5. Histogramas de ciclo celular

10.5.1. Sincronización de cultivos en G0/G1

Los histogramas de ciclo celular obtenidos en el experimento de sincronización de cultivos en G0/G1 mediante la depleción de SFB, son presentados en la **figura 25**.



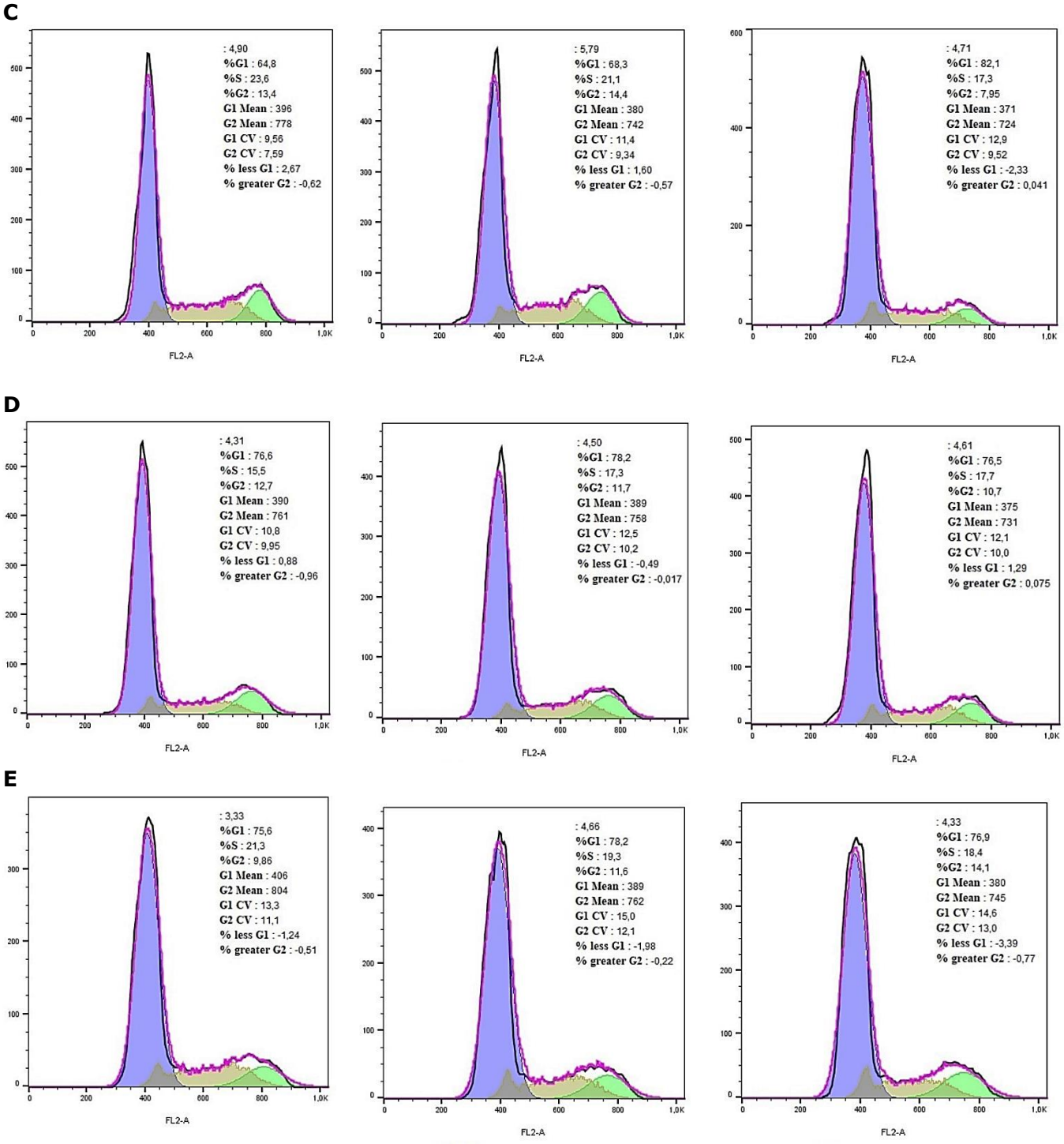
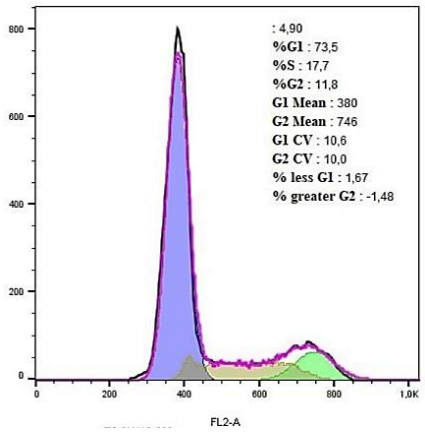


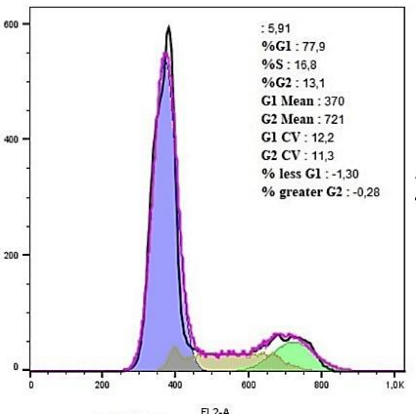
Figura 25: Histogramas de análisis de ciclo celular en medio de cultivo sin SFB. **A:** 0 horas. **B**: 8 horas. **C:** 16 horas. **D**: 24 horas. **E**: 32 horas post incubación con medio sin SFB.

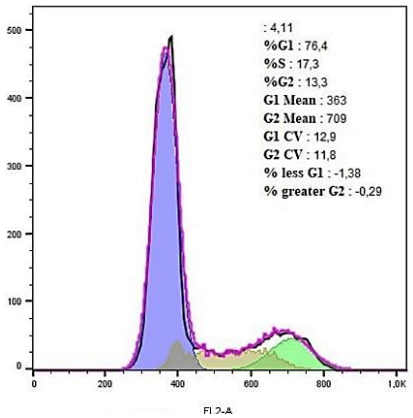
10.5.2. Sincronización de cultivos en G1/S

Los histogramas de ciclo celular obtenidos en el experimento de sincronización de cultivos en G1/S mediante mimosina 200 µM, son presentados en la **figura 26**

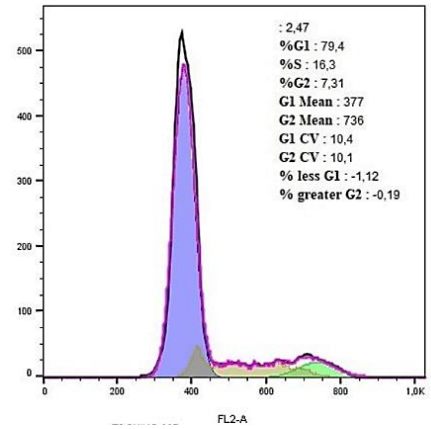
A

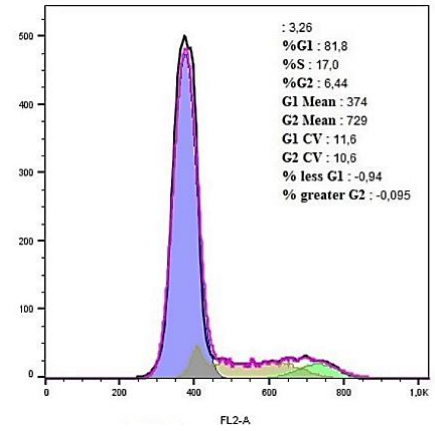


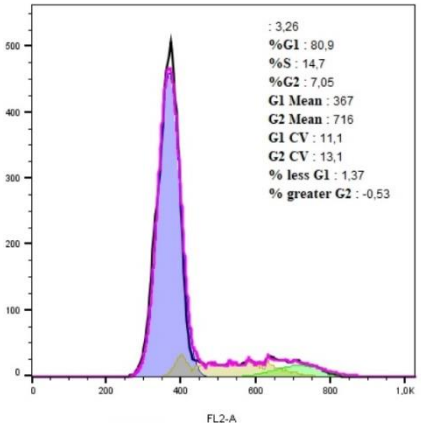




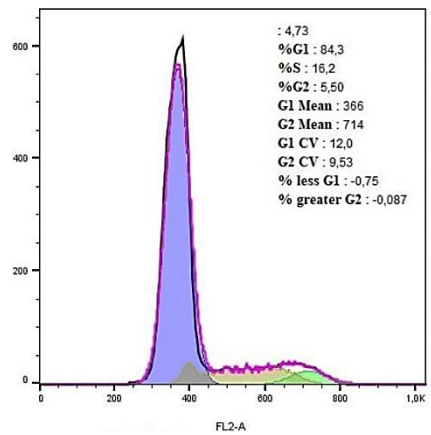
B

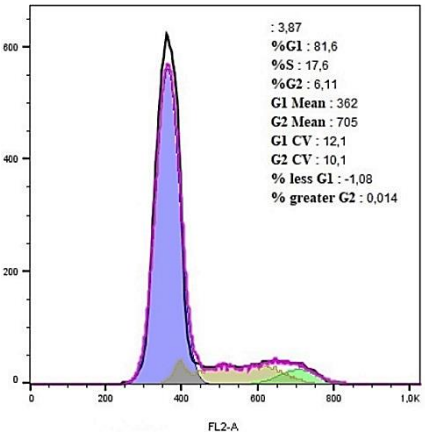


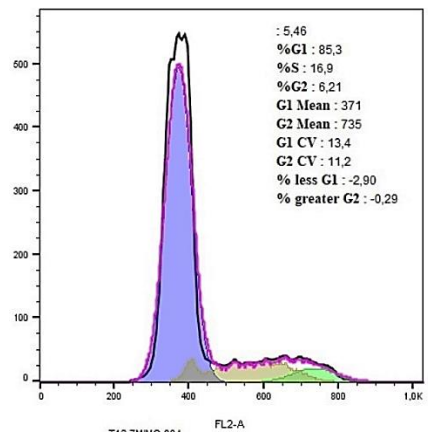




C







D

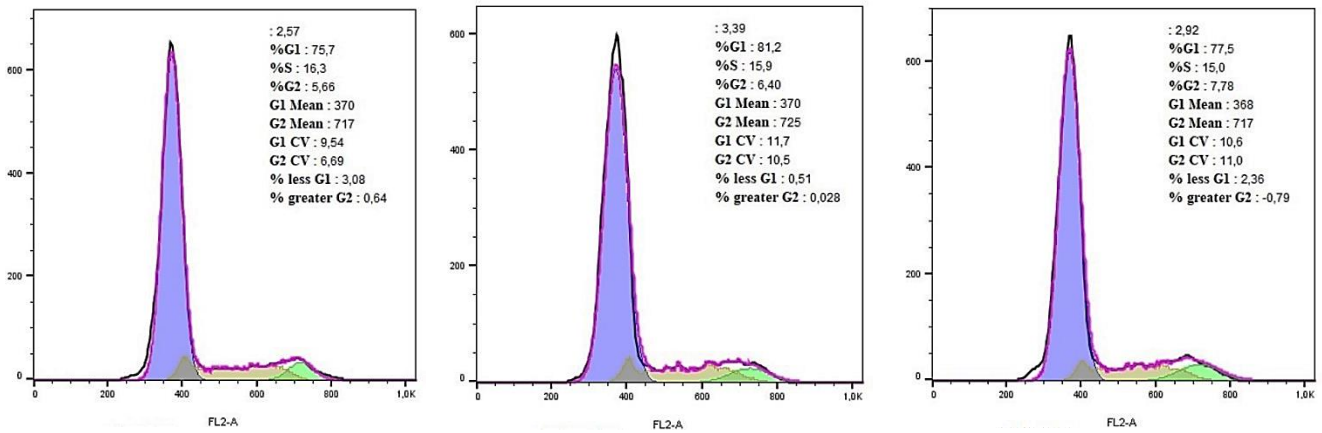
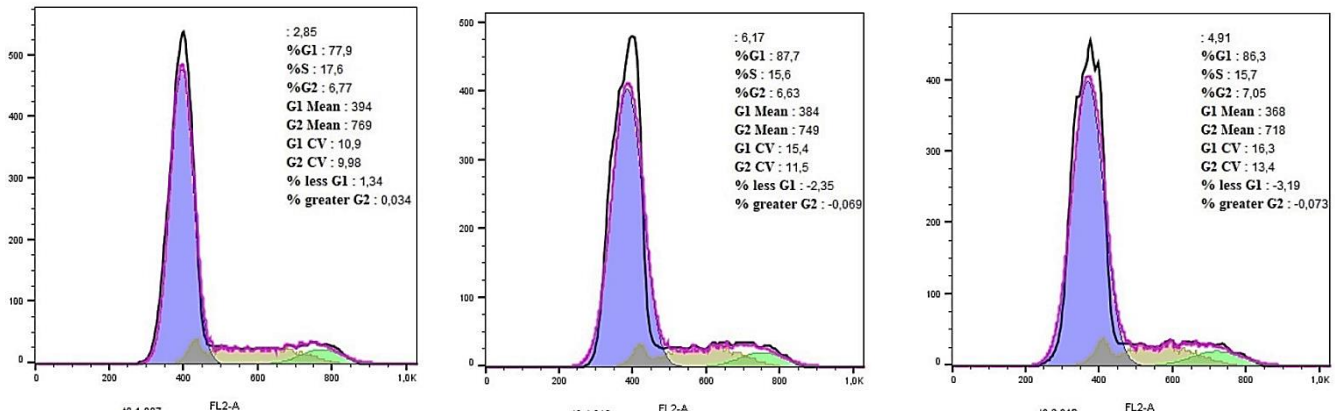


Figura 26: Histogramas de análisis de ciclo celular en medio de cultivo con mimosina 200 µM. **A:** 0 horas. **B**: 8 horas. **C:** 16 horas. **D**: 24 horas post incubación con medio + SFB +. mimosina 200 µM

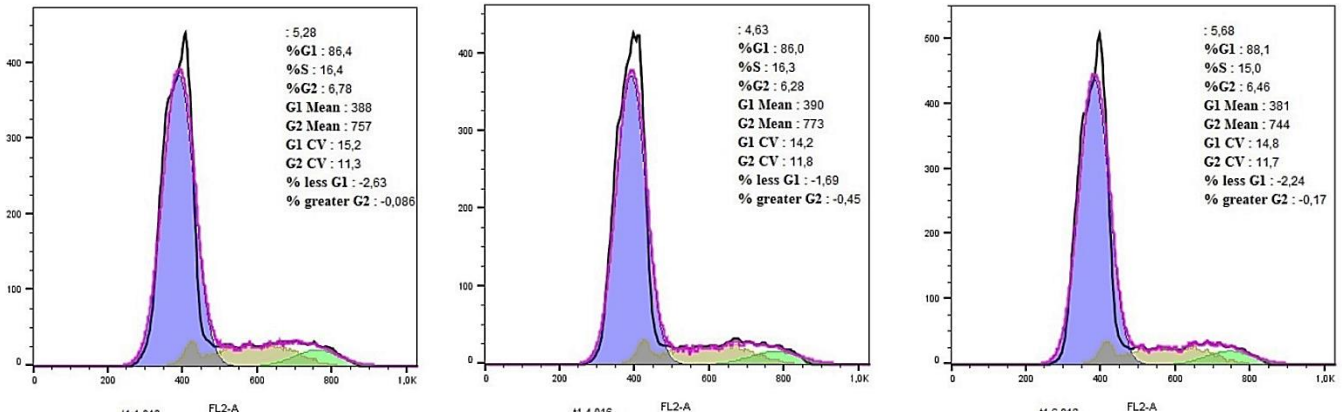
10.5.3. Sincronización de cultivos en S

Los histogramas de ciclo celular obtenidos en el experimento de sincronización de cultivos en S mediante la incubación con medio libre de mimosina, son presentados en la figura 27.

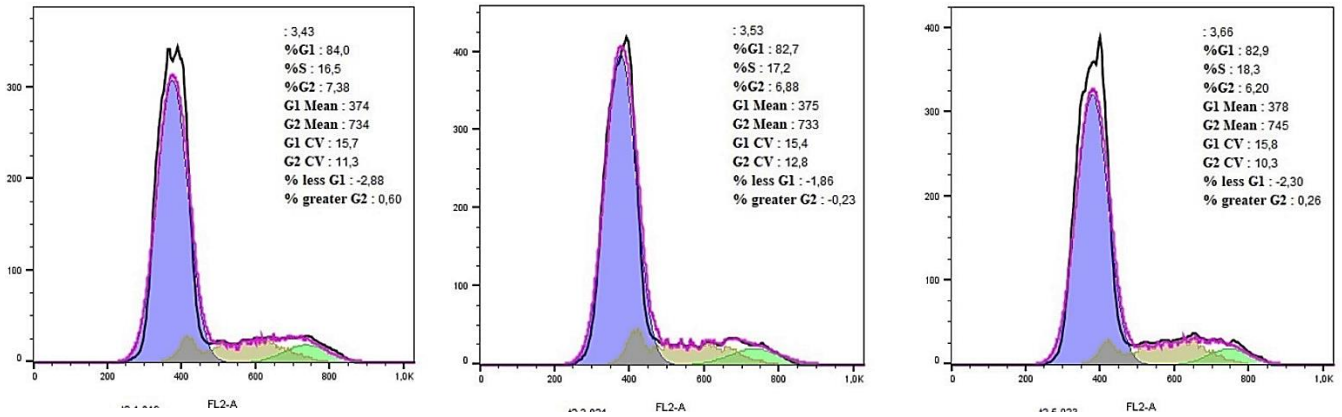
A



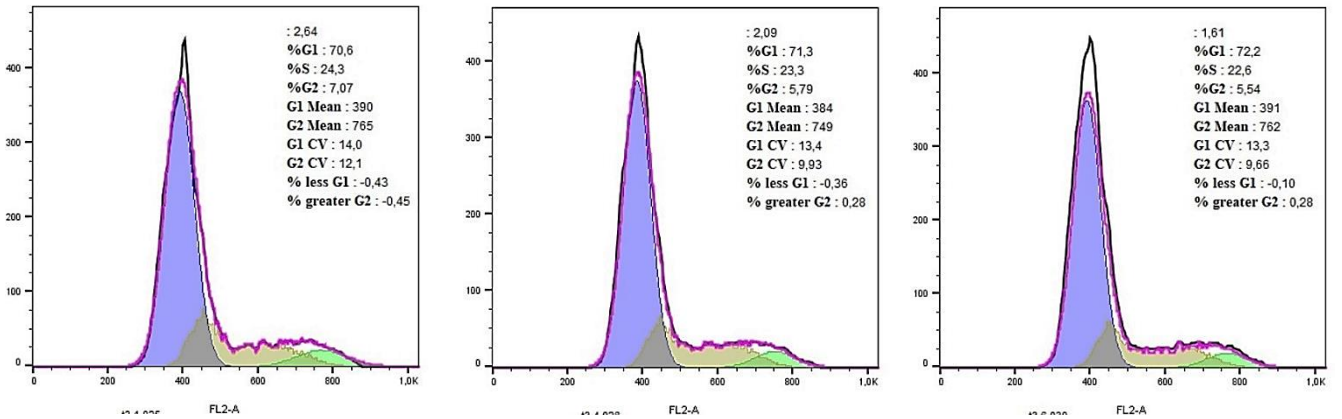
B


: 5,28
%G1 : 86,4
%S : 16,4
%G2 : 6,78
G1 Mean : 388
G2 Mean : 757
G1 CV : 15,2
G2 CV : 11,3
% less G1 : -2,63
% greater G2 : -0,086
: 4,63
%G1 : 86,0
%S : 16,3
%G2 : 6,28
G1 Mean : 390
G2 Mean : 773
G1 CV : 14,2
G2 CV : 11,8
% less G1 : -1,69
% greater G2 : -0,45
: 5,68
%G1 : 88,1
%S : 15,0
%G2 : 6,46
G1 Mean : 381
G2 Mean : 744
G1 CV : 14,8
G2 CV : 11,7
% less G1 : -2,24
% greater G2 : -0,17
FL2-A

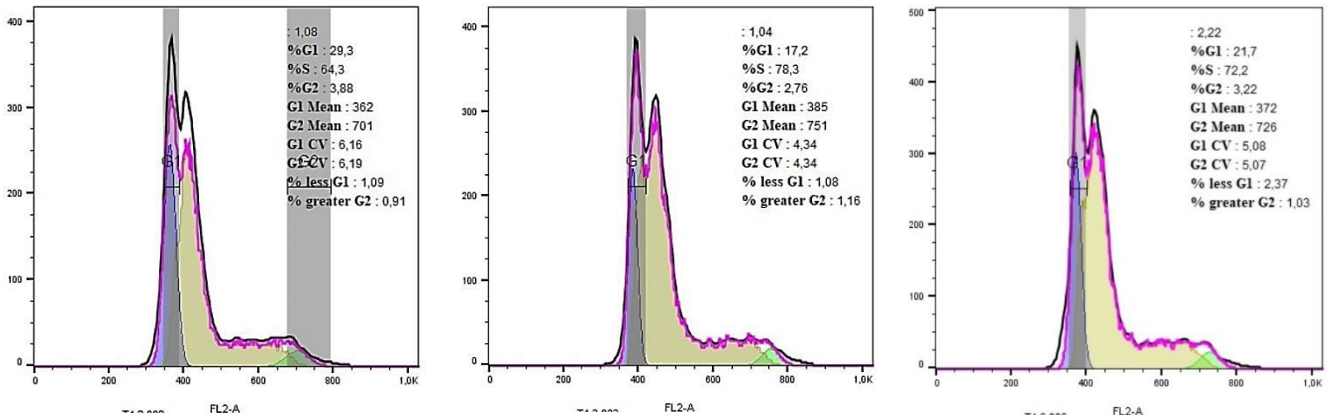
C


: 3,43
%G1 : 84,0
%S : 16,5
%G2 : 7,38
G1 Mean : 374
G2 Mean : 734
G1 CV : 15,7
G2 CV : 11,3
% less G1 : -2,88
% greater G2 : 0,60
: 3,53
%G1 : 82,7
%S : 17,2
%G2 : 6,88
G1 Mean : 375
G2 Mean : 733
G1 CV : 15,4
G2 CV : 12,8
% less G1 : -1,86
% greater G2 : -0,23
: 3,66
%G1 : 82,9
%S : 18,3
%G2 : 6,20
G1 Mean : 378
G2 Mean : 745
G1 CV : 15,8
G2 CV : 10,3
% less G1 : -2,30
% greater G2 : 0,26
FL2-A

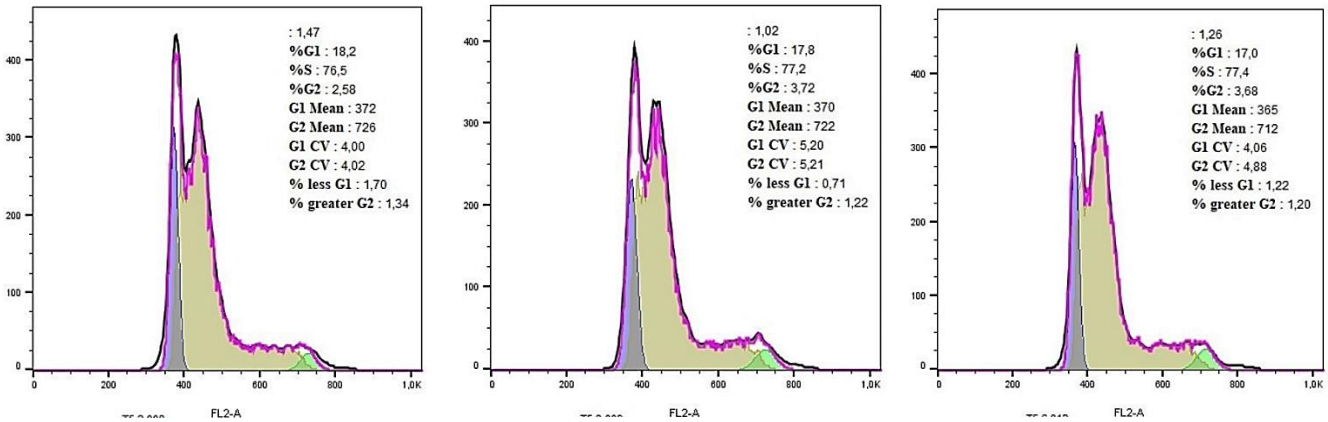
D


: 2,64
%G1 : 70,6
%S : 24,3
%G2 : 7,07
G1 Mean : 390
G2 Mean : 765
G1 CV : 14,0
G2 CV : 12,1
% less G1 : -0,43
% greater G2 : -0,45
: 2,09
%G1 : 71,3
%S : 23,3
%G2 : 5,79
G1 Mean : 384
G2 Mean : 749
G1 CV : 13,4
G2 CV : 9,93
% less G1 : -0,36
% greater G2 : 0,28
: 1,61
%G1 : 72,2
%S : 22,6
%G2 : 5,54
G1 Mean : 391
G2 Mean : 762
G1 CV : 13,3
G2 CV : 9,66
% less G1 : -0,10
% greater G2 : 0,28
FL2-A

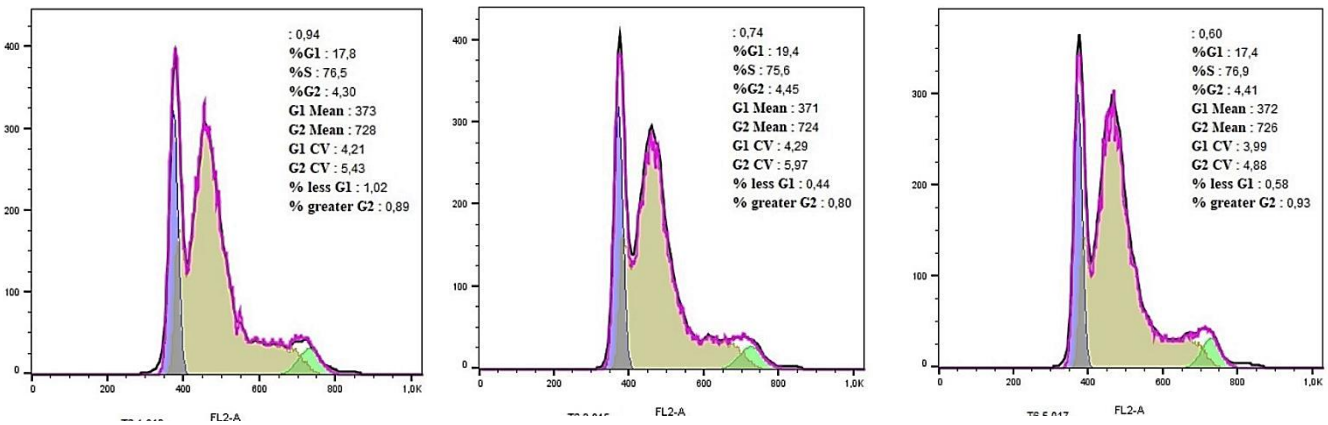
E


: 1,08
%G1 : 29,3
%S : 64,3
%G2 : 3,88
G1 Mean : 362
G2 Mean : 701
G1 CV : 6,16
G2 CV : 6,19
% less G1 : 1,09
% greater G2 : 0,91
: 1,04
%G1 : 17,2
%S : 78,3
%G2 : 2,76
G1 Mean : 385
G2 Mean : 751
G1 CV : 4,34
G2 CV : 4,34
% less G1 : 1,08
% greater G2 : 1,16
: 2,22
%G1 : 21,7
%S : 72,2
%G2 : 3,22
G1 Mean : 372
G2 Mean : 726
G1 CV : 5,08
G2 CV : 5,07
% less G1 : 2,37
% greater G2 : 1,03
FL2-A

F


: 1,47
%G1 : 18,2
%S : 76,5
%G2 : 2,58
G1 Mean : 372
G2 Mean : 726
G1 CV : 4,00
G2 CV : 4,02
% less G1 : 1,70
% greater G2 : 1,34
: 1,02
%G1 : 17,8
%S : 77,2
%G2 : 3,72
G1 Mean : 370
G2 Mean : 722
G1 CV : 5,20
G2 CV : 5,21
% less G1 : 0,71
% greater G2 : 1,22
: 1,26
%G1 : 17,0
%S : 77,4
%G2 : 3,68
G1 Mean : 365
G2 Mean : 712
G1 CV : 4,06
G2 CV : 4,88
% less G1 : 1,22
% greater G2 : 1,20
FL2-A

G


: 0,94
%G1 : 17,8
%S : 76,5
%G2 : 4,30
G1 Mean : 373
G2 Mean : 728
G1 CV : 4,21
G2 CV : 5,43
% less G1 : 1,02
% greater G2 : 0,89
: 0,74
%G1 : 19,4
%S : 75,6
%G2 : 4,45
G1 Mean : 371
G2 Mean : 724
G1 CV : 4,29
G2 CV : 5,97
% less G1 : 0,44
% greater G2 : 0,80
: 0,60
%G1 : 17,4
%S : 76,9
%G2 : 4,41
G1 Mean : 372
G2 Mean : 726
G1 CV : 3,99
G2 CV : 4,88
% less G1 : 0,58
% greater G2 : 0,93
FL2-A

H

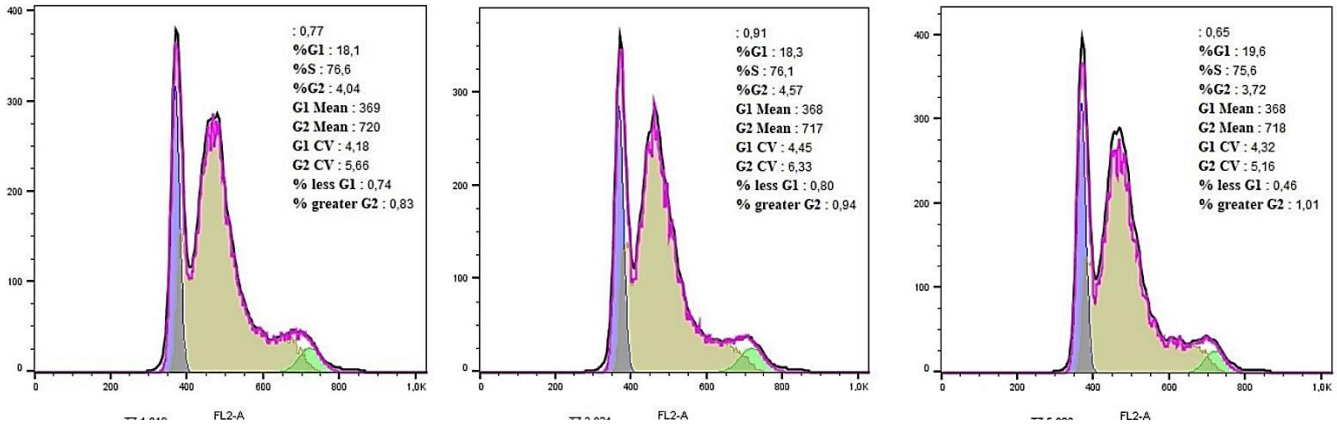


Figura 27: Histogramas de análisis de ciclo celular en medio de cultivo libre de mimosina. **A:** 0 horas. **B**: 1 hora. **C: 2** horas. **D**: 3 horas. **E**: 4 horas. **F**:5 horas. **G:** 6 horas. **H:** 7 horas post incubación con medio libre de mimosina.

10.6. Anexo 6. Test estadísticos ciclo celular

10.6.1. Sincronización de cultivos en G0/G1

Para averiguar si existen diferencias significativas con respecto al tiempo 0, y de ser así, cual tiempo genera estas diferencias, cada fase del ciclo fue analizada de manera independiente.

10.6.1.1. %G1

Supuestos para pruebas paramétricas:

Test Shapiro-Wilk	
Estadístico	0,890
p-value	0,068

Test de Levene	
F-ratio	0,884
p-value	0,507

Test paramétricos:

ANOVA 1 vía	
P-value	< 0.0001
P-value resumen	***
Número de grupos	5
F	23,99
R squared	0,9056

Tabla ANOVA	SS	df	MS
Tratamientos (entre columnas)	2170	4	542,5
Residuos (dentro de las columnas)	226,2	10	22,62
Total	2396	14	

Test de comparación múltiple de Tukey	Mean Diff.	q	Significativo? P < 0.05?	Resumen	95% CI of diff
0 vs 8	-10,80	3,933	No	ns	-23.58 to 1.979
0 vs 16	-25,10	9,141	Si	***	-37.88 to -12.32
0 vs 24	-30,47	11,10	Si	***	-43.25 to -17.69
0 vs 32	-30,27	11,02	Si	***	-43.05 to -17.49
8 vs 16	-14,30	5,208	Si	*	-27.08 to -1.521
8 vs 24	-19,67	7,162	Si	**	-32.45 to -6.888
8 vs 32	-19,47	7,090	Si	**	-32.25 to -6.688
16 vs 24	-5,367	1,955	No	ns	-18.15 to 7.412

16 vs 32	-5,167	1,882	No	ns	-17.95 to 7.612
24 vs 32	0,2000	0,07284	No	ns	-12.58 to 12.98

10.6.1.2. %S

Supuestos para pruebas paramétricas:

Test Shapiro-Wilk	
estadístico	0,873
p-value	0,038

Test de Levene	
F-ratio	0,525
p-value	0,720

Test no paramétricos:

Test Kruskal-Wallis	
P-value	0,0192
P-value resumen	*
Número de grupos	5
Estadístico Kruskal-Wallis	11,76

Test de comparación múltiple de Dunn	Difference in rank sum	Significativo? P < 0.05?	Resumen
0 vs 8	1,667	No	ns
0 vs 16	7,167	No	ns
0 vs 24	10,83	Si	*
0 vs 32	7,000	No	ns
8 vs 16	5,500	No	ns
8 vs 24	9,167	No	ns
8 vs 32	5,333	No	ns
16 vs 24	3,667	No	ns
16 vs 32	-0,1667	No	ns
24 vs 32	-3,833	No	ns

10.6.1.3. %G2

Supuestos para pruebas paramétricas:

Test Shapiro-Wilk	
Estadístico	0,910
p-value	0,138

Test de Levene	
F-ratio	0,235
p-value	0,912

Test paramétricos:

ANOVA 1 vía	
P-value	0,0080
P-value resumen	**
Número de grupos	5
F	6,404
R squared	0,7192

Tabla ANOVA	SS	df	MS
Tratamiento (entre columnas)	157,9	4	39,47
Residuos (dentro de las columnas)	61,63	10	6,163
Total	219,5	14	

Test de comparación múltiple de Tukey	Mean Diff.	q	Significativo? P < 0.05?	Resumen	95% CI of diff
0 vs 8	7,757	5,412	Si	*	1.086 to 14.43
0 vs 16	8,117	5,663	Si	*	1.446 to 14.79
0 vs 24	8,333	5,814	Si	*	1.663 to 15.00
0 vs 32	8,180	5,707	Si	*	1.509 to 14.85
8 vs 16	0,3600	0,2512	No	ns	-6.311 to 7.031
8 vs 24	0,5767	0,4023	No	ns	-6.094 to 7.247
8 vs 32	0,4233	0,2953	No	ns	-6.247 to 7.094
16 vs 24	0,2167	0,1512	No	ns	-6.454 to 6.887
16 vs 32	0,06333	0,04419	No	ns	-6.607 to 6.734
24 vs 32	-0,1533	0,1070	No	ns	-6.824 to 6.517

10.6.2. Sincronización de cultivos en G1/S

Para averiguar si existen diferencias significativas con respecto al tiempo 0, y de ser así, cual tiempo genera estas diferencias, cada fase del ciclo fue analizada de manera independiente.

10.6.2.1. %G1

Supuestos para pruebas paramétricas:

Test Shapiro-Wilk	
Estadístico	0,975
p-value	0,959

Test de Levene	
F-ratio	0,283
p-value	0,837

Test paramétricos**:**

ANOVA 1 vía	
P value	0,0102
P value resumen	*
Número de grupos	4
F	7,531
R squared	0,7385

Tabla ANOVA	SS	df	MS
Tratamientos (entre columnas)	101,7	3	33,89
Residuos (dentro de las columnas)	36,00	8	4,500
Total	137,7	11	

Test de comparación múltiple de Tukey	Mean Diff.	q	Significativo? P < 0.05?	Resumen	95% CI of diff
0 vs 8	-4,767	3,892	No	ns	-10.31 to 0.7802
0 vs 16	-7,800	6,369	Si	**	-13.35 to -2.253
0 vs 24	-2,200	1,796	No	ns	-7.747 to 3.347
8 vs 16	-3,033	2,477	No	ns	-8.580 to 2.514
8 vs 24	2,567	2,096	No	ns	-2.980 to 8.114
16 vs 24	5,600	4,572	Si	*	0.05313 to 11.15

10.6.2.2. %S

Supuestos para pruebas paramétricas:

Test Shapiro-Wilk	
Estadístico	0,938
p-value	0,479

Test de Levene	
F-ratio	0,431
p-value	0,736

Test paramétricos:

ANOVA 1 via	
P value	0,1329
P value resumen	ns
Número de grupos	4
F	2,506
R squared	0,4845

Tabla ANOVA	SS	df	MS
Tratamientos (entre columnas)	4,749	3	1,583
Residuos (dentro de las columnas)	5,053	8	0,6317
Total	9,803	11	

Test de comparación multiple de Tukey	Mean Diff.	q	Significativo? P < 0.05?	Resumen	95% CI of diff
0 vs 8	1,267	2,760	No	ns	-0.8115 to 3.345
0 vs 16	0,3667	0,7991	No	ns	-1.712 to 2.445
0 vs 24	1,533	3,342	No	ns	-0.5449 to 3.612
8 vs 16	-0,9000	1,961	No	ns	-2.978 to 1.178
8 vs 24	0,2667	0,5811	No	ns	-1.812 to 2.345
16 vs 24	1,167	2,543	No	ns	-0.9115 to 3.245

10.6.2.3. %G2

Supuestos para pruebas paramétricas:

Test Shapiro-Wilk	
Statistic	0,761
p-value	0,003

Test de Levene	
F-ratio	0,474
p-value	0,709

Test no paramétricos:

Test Kruskal-Wallis	
P value	0,0378
P value resumen	*
Número de grupos	4
Estadístico de Kruskal-Wallis	8,436

Test de comparación múltiple de Dunn	Difference in rank sum	Significativo? P < 0.05?	Resumen
0 vs 8	4,000	No	ns
0 vs 16	8,333	Yes	*
0 vs 24	5,667	No	ns
8 vs 16	4,333	No	ns
8 vs 24	1,667	No	ns
16 vs 24	-2,667	No	ns

10.6.3. Sincronización de cultivos en S

Para averiguar si existen diferencias significativas con respecto al tiempo 0, y de ser así, cual tiempo genera estas diferencias, cada fase del ciclo fue analizada de manera independiente.

10.6.3.1. %G1

Supuestos para pruebas paramétricas:

Test Shapiro-Wilk	
Estadistico	0,738
p-value	0,000

Test de Levene	
F-ratio	1,359
p-value	0,287

Test no paramétricos:

Test Kruskal-Wallis	
P value	0,0053
P value resumen	**
Número de grupos	8
Estadístico Kruskal-Wallis	20,11

Test de comparación multple de Dunn	Difference in rank sum	Significativo? P < 0.05?	Resumen
0 vs 1	-2,000	No	ns
0 vs 2	2,000	No	ns
0 vs 3	6,000	No	ns
0 vs 4	11,67	No	ns
0 vs 5	15,83	Si	*
0 vs 6	14,50	No	ns
0 vs 7	12,00	No	ns

10.6.3.2. %S

Supuestos para pruebas paramétricas:

Test Shapiro-Wilk	
Estadístico	0,712
p-value	0,000

Test de Levene	
F-ratio	2,674
p-value	0,049

Test no paramétricos:

Test Kruskal-Wallis	
P-value	0,0054
P-value resumen	**
Número de grupos	8
Estadístico Kruskal-Wallis	20,06

Test de comparación múltiple de Dunn	Difference in rank sum	Significativo? P < 0.05?	Resumen
0 vs 1	1,000	No	ns
0 vs 2	-3,000	No	ns
0 vs 3	-6,667	No	ns
0 vs 4	-12,67	No	ns
0 vs 5	-16,83	Si	*
0 vs 6	-14,00	No	ns
0 vs 7	-13,17	No	ns

10.6.3.3. %G2

Supuestos para pruebas paramétricas:

Test Shapiro-Wilk	
Estadístico	0,912
p-value	0,039

Test de Levene	
F-ratio	0,481
p-value	0,835

Test no paramétricos:

Test Kruskal-Wallis	
P-value	0,0064
P-value resumen	**
Número de grupos	8
Estadístico Kruskal-Wallis	19,64

Test de comparación múltiple de Dunn	Difference in rank sum	Significativo? P < 0.05?	Resumen
0 vs 1	2,000	No	ns
0 vs 2	-0,3333	No	ns
0 vs 3	3,000	No	ns
0 vs 4	15,67	Si	*
0 vs 5	16,17	Si	*
0 vs 6	9,667	No	ns
0 vs 7	11,17	No	ns

10.7. Anexo 7: Ensayo piloto y test estadísticos en el conteo de focos inmunofluorescentes

10.7.1. Experimento piloto

Del experimento piloto se obtuvieron los siguientes valores:

Piloto	Grupo 1	Grupo 2
Media	122,05	69,67
Desviación estándar	91,82	75,20

Al ingresar estas cifras en G-power, se obtuvo un tamaño del efecto de 0,6341815.

De acuerdo al experimento piloto y los valores ingresados en G-power, para un nivel de significancia del 1%(α=0.01), un poder fijado al 99% (1-β) y un tamaño del efecto de 0,6341815, el tamaño de muestra por cada grupo es de 122. Dicho valor fue considerado como el mínimo tamaño de muestra.

10.7.2. Test estadísticos

Supuestos para pruebas paramétricas

Test Shapiro-Wilk	**PFA**	**MeOH**
Estadístico	0,775	0,844
p-value	0,000	0,000

Test Levene	
F-ratio	2,585
p-value	0,000

Test no paramétrico:

Tabla Analizada	
Columna A	PFA
Vs	vs
Columna B	MeOH
Test de Mann Whitney	
P value	< 0.0001
P-value resumen	***
¿Las medianas son significativamente diferentes? (P < 0.05)	Si
Sum of ranks in column A,B	139808 , 171847
Mann-Whitney U	55550