

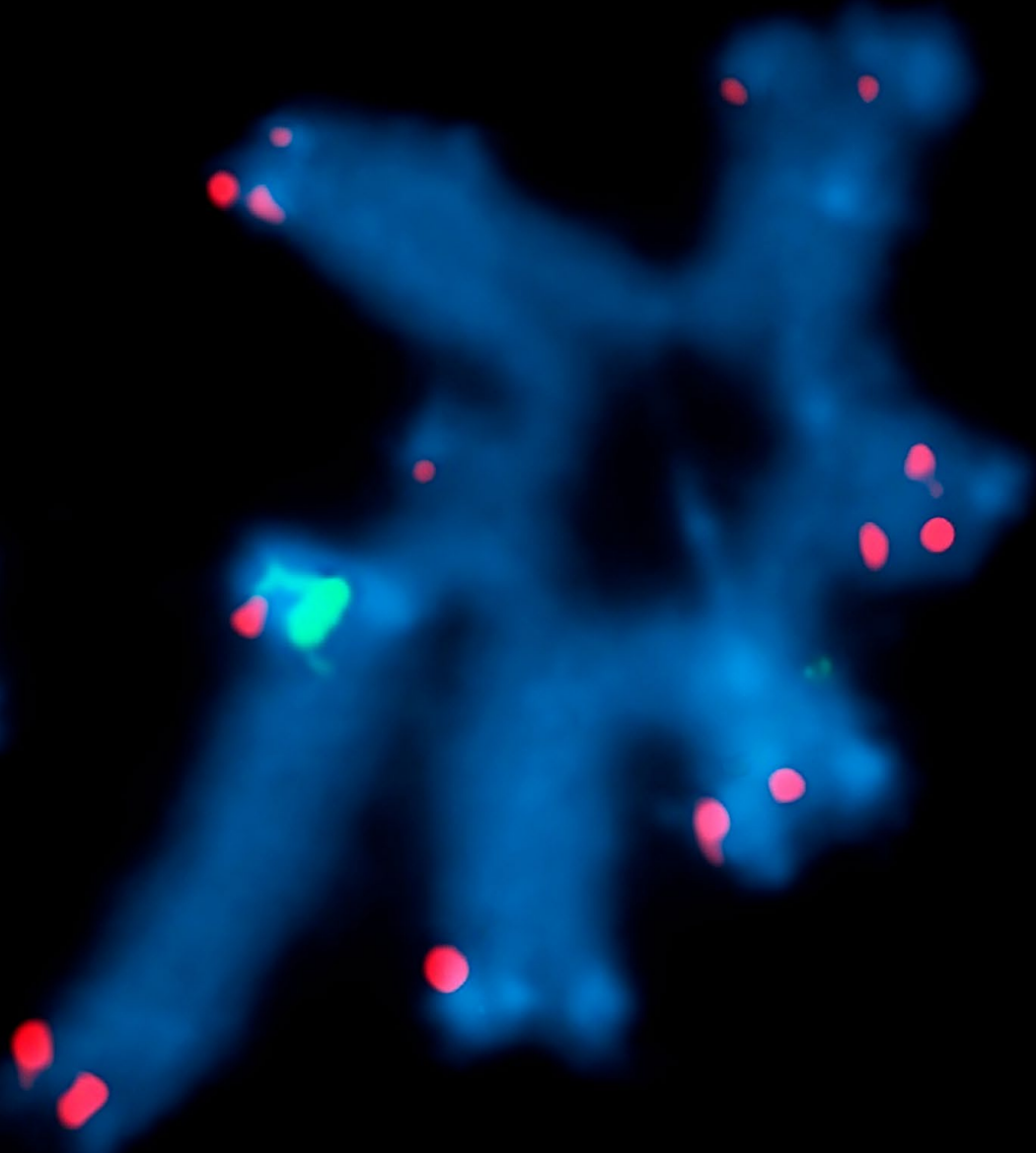
(Formerly MENDELIANA)



December 2023
Volume XXXIV
Issue 2
E-ISNN: 1852-6233

BAG

**Journal of Basic
& Applied Genetics**



Journal of the Argentine Society of Genetics
Revista de la Sociedad Argentina de Genética

www.sag.org.ar/jbag
Buenos Aires, Argentina



BAG

Journal of Basic & Applied Genetics

V. XXXIV - No. 2

December 2023



BAG - Journal of Basic and Applied Genetics

Not yet assigned quartile

SJR 2022
0

powered by scimagojr.com

Editorial Board

Comité Editorial

Editor General:

Dra. Elsa L. Camadro

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina
bag.editor@sag.org.ar

Editores Asociados:

Citogenética Animal y Citogenética Vegetal

Dra. Liliana Mola

Depto. de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires, y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Buenos Aires, Argentina
limola@ege.fcen.uba.ar

Dra. Mariel Schneider

Dep. de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, Brasil
maricb@rc.unesp.br

Citogenética Vegetal

Dr. Julio R. Daviña

Instituto de Biología Subtropical, Universidad Nacional de Misiones. Posadas, Argentina
julordavina@fceqyn.unam.edu.ar

Genética de Poblaciones y Evolución

Dra. Mariana Pires de Campos Telles

Dep. de Genética, Laboratório de Genética & Biodiversidade, Escola de Ciências Médicas e Vida, Pontifícia Universidade Católica de Goiás e Universidade Federal de Goiás. Goiás, Brasil
tellsmpc@gmail.com

Dra. María Isabel Remis

Depto. de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Buenos Aires, Argentina
mariar@ege.fcen.uba.ar

Dr. Juan César Vilardi

Depto. de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires, y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Buenos Aires, Argentina
vilardi@bg.fcen.uba.ar

Genética Humana, Genética Médica, y Citogenética

Dra. María Inés Echeverría

Instituto de Genética, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina
miecheve@fcm.uncu.edu.ar

Genética Humana

Dr. Carlos Bacino

Dept. of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine. Texas, USA
cbacino@bcm.edu

Genética Médica

Dr. José Arturo Prada Oliveira

Facultad de Medicina, Departamento de Anatomía Humana y Embriología, Universidad de Cádiz. Cádiz, España
arturo.prada@uca.es

Genética Médica y Molecular

Dr. Bernardo Bertoni Jara

Facultad de Medicina, Universidad de la República. Montevideo, República Oriental del Uruguay
bbertoni@fmed.edu.uy

Dra. Mev Domínguez Valentín

Oslo University Hospital. Oslo, Norway
mev.dominguez.valentin@rr-research.no

Genética Molecular Animal

Dr. Guillermo Giovambattista

Instituto de Genética Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. La Plata, Argentina
ggiovam@fcv.unlp.edu.ar

Genética Molecular Vegetal

Dr. Alberto Acevedo

Centro de Investigación de Recursos Naturales, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Hurlingham, Argentina
acevedo.alberto@inta.gov.ar

Dr. Andrés Zambelli

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Balcarce, Argentina
andres.zambelli@mdp.edu.ar

Genética y Mejoramiento Animal

Dra. Liliana A. Picardi

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario. Zavalla, Argentina
lpicardi@unr.edu.ar

Dra. María Inés Oyarzábal

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina
moyazabr@unr.edu.ar

Dr. Gustavo Rodríguez Reynoso

Universidad Agraria La Molina, y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Lima, Perú
gustavogr@lamolina.edu.pe

Genética y Mejoramiento Genético Vegetal

Dra. Natalia Bonamico

Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto, Argentina
nbonamico@ayv.unrc.edu.ar

Dr. Ricardo W. Masuelli

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo, y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Mendoza, Argentina
rmasuelli@fca.uncu.edu.ar

Dr. Rodomiro Ortiz

Dept. of Plant Breeding, Swedish University of Agricultural Science. Uppsala, Suecia
rodomiro.ortiz@slu.se

Dra. Mónica Poverene

Depto. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina
poverene@criba.edu.ar

Dr. Pedro Rimieri

Profesional asociado y asesor científico-técnico. INTA, Pergamino. Buenos Aires, Argentina
primieri730@gmail.com

Genética de Microorganismos

Dra. Mariel Sanso

Facultad de Ciencias. Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Tandil, Argentina
msanso@vet.unicen.edu.ar

Mutagénesis

Dr. Alejandro D. Bolzán

Lab. de Citogenética y Mutagénesis, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. La Plata, Argentina
abolzan@imbice.gov.ar

Consultor Estadístico

Dr. David Almorza

Facultad de Ciencias del Trabajo, Depto. de Estadística e Investigación Operativa, Universidad de Cádiz. Cádiz, España
david.almorza@uca.es

Secretaría de Redacción

Dra. María de las Mercedes Echeverría

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad
Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina
mecheverria@mdp.edu.ar

Diseño y maquetación

Lic. Mauro Salerno

maurosalerno92@gmail.com

Corrección de estilo

Dra. Gabriela Leofanti

gabrielaleofanti@gmail.com

Comité de colaboradores

Dra. María Mercedes Ibañez

Facultad de Agronomía y Veterinaria,
Universidad Nacional de Río Cuarto. Río Cuarto,
Córdoba, Argentina
mibanez@ayv.unrc.edu

Dr. Daniel Maizon

Estación Experimental Agropecuaria "Guillermo
Covas", Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria, y Universidad Nacional de La
Pampa. Anguil, La Pampa, Argentina
maizon.daniel@inta.gob.ar

Dra. María Andrea Tomas

Estación Experimental Agropecuaria Rafaela,
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria;
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas; Universidad Nacional de
Rafaela. Rafaela, Santa Fe, Argentina
tomas.maria@inta.gob.ar

Imágen de tapa:

Meiosis I en macho de *Tityus argentinus*
(Buthidae, $2n=9$ (II+VII)). FISH con sondas
de ADNr 28S

Autores: **Renzo S. Adilardi y Liliana M. Mola**

Contents

Contenidos

ARTICLE 1
RESEARCH

9 – 23

—

ALT-EJ GENERA REARREGLOS CROMOSÓMICOS EN RESPUESTA A ETOPÓSIDO EN CÉLULAS HUMANAS CON LOS PRINCIPALES SISTEMAS DE REPARACIÓN DE RUPTURAS DE DOBLE CADENA COMPROMETIDOS

ALT-EJ ORIGINATES CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS IN RESPONSE TO ETOPOSIDE IN HUMAN CELLS WITH THE MAIN DNA DOUBLE-STRAND BREAK REPAIR SYSTEMS COMPROMISED

Kramar J., Palmitelli M., De Campos-Nebel M., González-Cid M.

ARTICLE 2
RESEARCH

25 – 32

—

PRENATALLY DIAGNOSED PARTIAL TRISOMY 3Q22.2→3QTER, PARTIAL MONOSOMY 11Q25→11QTER AND INTERSTITIAL DELETION 10Q25.1-10Q25.2: A CASE REPORT AND REVIEW OF LITERATURE

DIAGNÓSTICO PRENATAL DE TRISOMÍA PARCIAL 3Q22.2→3QTER, MONOSOMÍA PARCIAL 11Q25→11QTER Y DELECIÓN INTERSTITIAL 10Q25.1-10Q25.2: REPORTE DE UN CASO Y REVISIÓN DE LA LITERATURA

Della Vedova M.C., Gancia M.D., Mendoza G.V., Barrasa N.F., Bravo R., Losada D., Siewert S., Marsá S.M.

ARTICLE 3
REVIEW

33 – 40

—

MICROSOMÍA CRANEOFACIAL, UN RECUENTO ACTUALIZADO CRANEOFACIAL MICROSOMIA, AN UPDATED REVIEW

Valencia-Pérez A., Quintero-Orozco M.

ARTICLE 4
REVIEW

41 – 49

—

OMICS: A NEW VISION FOR BREAST CANCER TREATMENT OMICS: UNA NUEVA VISIÓN DEL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA

Salvatierra A., Díaz-Baena D., Güven Ö., Ruiz-Serrano E.

ARTICLE 5
REVIEW

51 – 65

—

HUMAN X-CROMOSOME NON-CODING VARIATION IN LATIN AMERICAN POPULATIONS: A REVIEW

VARIACIÓN NO CODIFICANTE DEL CROMOSOMA X HUMANO EN POBLACIONES LATINOAMERICANAS: UNA REVISIÓN

Catanesi C.I., Hohl D.M., Bolzán A.D.

OBITUARY

67 – 68

—

DRA. LILIANA AMELIA PICARDI 1942–2023

ALT-EJ GENERA REARREGLOS CROMOSÓMICOS EN RESPUESTA A ETOPÓSIDO EN CÉLULAS HUMANAS CON LOS PRINCIPALES SISTEMAS DE REPARACIÓN DE RUPTURAS DE DOBLE CADENA COMPROMETIDOS

ALT-EJ ORIGINATES CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS IN RESPONSE TO ETOPOSIDE IN HUMAN CELLS WITH THE MAIN DNA DOUBLE-STRAND BREAK REPAIR SYSTEMS COMPROMISED

Kramar J.¹, Palmitelli M.¹, De Campos-Nebel M.¹, González-Cid M.^{1*}

¹Laboratorio de Mutagénesis, Instituto de Medicina Experimental, IMEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

Corresponding author:
Marcela Beatriz González Cid
margoncicid@gmail.com

 ORCID 0000-0001-9537-0925

Cite this article as:

Kramar J., Palmitelli M., De Campos-Nebel M., González-Cid M. 2023. ALT-EJ GENERA REARREGLOS CROMOSÓMICOS EN RESPUESTA A ETOPÓSIDO EN CÉLULAS HUMANAS CON LOS PRINCIPALES SISTEMAS DE REPARACIÓN DE RUPTURAS DE DOBLE CADENA COMPROMETIDOS. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXIV (2): 9–23.

Received: 10/18/2022

Accepted: 01/30/2023

Style corrected manuscript
accepted: 05/23/23

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2023.34.02.01

ISSN online version: 1852-6233

ABSTRACT

The antitumor drug Etoposide (ETO) induces DNA double-strand breaks (DSB) and is associated with the development of secondary neoplasms in treated patients. DSB are repaired by two main mechanisms, homologous recombination (HR) and classical non-homologous end joining (c-NHEJ). When HR and c-NHEJ are defective, DSB are repaired by the PARP-1-dependent alternative end-joining (alt-EJ) pathway. The involvement of alt-EJ in the progression of DSB induced by ETO in the G2 phase of human cells was analyzed. HeLa cells deficient in HR (cohesin RAD21 inhibition, HeLa RAD21kd) and their non-silencing control (HeLa NS) were established. Cells were treated with ETO in the presence of a chemical inhibitor of DNA-PKcs (DNA-PKi, c-NHEJ). In both cell lines, ETO-induced DSB (γ H2AX+) in G2 phase were increased compared to their controls. The incorrect repair of DSB in DNA-PKcs- and RAD21-deficient cells caused a synergistic augment in chromatid exchanges and dicentric chromosomes in the first and second metaphase, respectively. In contrast, the frequency of dicentric chromosomes was reduced in PARP-1-deficient cells (HeLa PARP-1kd) following ETO treatment. In HeLa RAD21kd binucleated cells, DNA-PKi/ETO increased the percentage of cells with ≥ 20 γ H2AX foci in the G1-postmitotic phase and of micronuclei at 96 h. A greater accumulation in G2/M was observed in HeLa NS treated with DNA-PKi/ETO compared with HeLa RAD21kd at 8 h. The cell cycle restarted in HeLa NS at 16 h; however, the G2/M accumulation was maintained in HeLa RAD21kd. Chromosomal rearrangements obtained when DNA-PKcs and RAD21 were absent and their decrease in HeLa PARP-1kd cells suggest that alt-EJ contributes to their formation.

Key words: chromosomal aberrations, cell cycle, cohesin, double-strand breaks, DNA repair pathways.

RESUMEN

La droga antitumoral Etopósido (ETO) induce rupturas de doble cadena en el ADN (RDC) y promueve el desarrollo de neoplasias secundarias en los pacientes tratados. Dos mecanismos principales, recombinación homóloga (HR) y reunión de extremos no-homólogos clásica (c-NHEJ) reparan las RDC. Cuando HR y c-NHEJ son defectuosas, la vía alternativa de reunión de extremos (alt-EJ) dependiente de PARP-1 está implicada. Se examinó la participación de alt-EJ en la progresión de las RDC inducidas por ETO en la fase G2 de células humanas. Se establecieron células HeLa deficientes en HR (inhibición de cohesina RAD21, HeLa RAD21kd) y su control no-silenciada (HeLa NS). Las células se trataron con ETO en presencia del inhibidor químico de DNA-PKcs (DNA-PKi, c-NHEJ). En ambas líneas celulares, la inducción de RDC (γ H2AX+) por ETO en la fase G2 aumentó respecto a sus controles. La reparación incorrecta en células deficientes en DNA-PKcs y RAD21 originó un incremento sinérgico de intercambio de cromátidas y de cromosomas dicéntricos en la primera y segunda metafase, respectivamente. En cambio, la frecuencia de cromosomas dicéntricos se redujo en células deficientes en PARP-1 (HeLa PARP-1kd) luego del tratamiento con ETO. En células binucleadas HeLa RAD21kd, DNA-PKi/ETO acrecentó el porcentaje de células con ≥ 20 focos γ H2AX en la fase G1-posmitótica y de micronúcleos a las 96 h. Una mayor acumulación en G2/M se observó en HeLa NS tratadas con DNA-PKi/ETO en relación a HeLa RAD21kd a las 8 h. El ciclo celular se reanudó en HeLa NS a las 16 h, sin embargo, la acumulación se mantuvo en HeLa RAD21kd. Los rearreglos cromosómicos obtenidos con DNA-PKcs y RAD21 disfuncionales y su disminución en células HeLa PARP-1kd, sugieren que alt-EJ contribuye a su formación.

Palabras clave: aberraciones cromosómicas, ciclo celular, cohesina, rupturas de doble cadena, vías de reparación del ADN

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

INTRODUCCIÓN

Las rupturas de doble cadena (RDC) en el ADN son consideradas lesiones perjudiciales para las células debido a que su falta de reparación o reparación incorrecta pueden llevar a mutaciones, pérdida de información genética o rearreglos cromosómicos y así, promover un proceso tumorigénico (Pierce *et al.*, 2001). El hecho que las RDC sean lesiones citotóxicas es explotado en el tratamiento convencional del cáncer empleando drogas quimioterapéuticas inductoras de este tipo de daño, como es el caso de la epipodofilotoxina etopósido (ETO) (Kopa *et al.*, 2019). Esta droga actúa como veneno de ADN-topoisomerasa II (Top2), pues convierte a esta enzima en una potente toxina que fragmenta al genoma en su presencia (Baldwin y Osheroff, 2005). Las enzimas Top2 resuelven problemas topológicos del ADN durante la replicación, transcripción, segregación y condensación cromosómica catalizando la liberación de torsiones sobre el mismo mediante la introducción de rupturas transitorias en la doble hélice (McKie *et al.*, 2021). ETO se caracteriza por estabilizar los complejos entre el ADN y Top2, conocidos como complejos de clivaje, previniendo la religación de los extremos rotos y conduciendo a la formación de RDC persistentes (Montecucco *et al.*, 2015).

Los mecanismos de reparación de las RDC en células humanas son generalmente agrupados en tres categorías, dependiendo del uso o no de una secuencia de ADN como templado (Ranjha *et al.*, 2018; Scully *et al.*, 2019; Vítor *et al.*, 2020): la vía de recombinación homóloga (*homologous recombination*, HR), la vía clásica de reunión de extremos no homólogos (*classical non-homologous end joining*, c-NHEJ) y la vía alternativa de reunión de extremos (*alternative end-joining*, alt-EJ). HR actúa en forma lenta, y es un mecanismo preciso debido a que utiliza una molécula de ADN sin daño, la cromátida hermana, como templado para restituir la información original. En el proceso de reparación mediante c-NHEJ se produce la ligación de los extremos rotos del ADN sin necesidad de una secuencia homóloga. La característica más destacada de esta vía es la velocidad con la cual funciona suprimiendo en gran medida, la formación de translocaciones cromosómicas; no obstante, pueden surgir alteraciones en la secuencia del ADN en los sitios de unión. En el caso de alt-EJ, la vía opera con velocidad y fidelidad marcadamente más bajas que c-NHEJ, provocando translocaciones cromosómicas con mayor frecuencia y generando, en el sitio de unión, alteraciones más extensas en la secuencia del ADN. Un subgrupo de alt-EJ emplea secuencias de microhomología a cada lado de la RDC para usar como templado, luego estas secuencias son removidas y se produce la síntesis del ADN y la unión de los extremos rotos (Wang y Xu, 2017).

La contribución relativa de estas vías depende de la fase del ciclo celular donde se haya producido la RDC. Mientras que HR actúa durante las fases S tardía y G2

donde se realiza la síntesis del ADN y se dispone de una cromátida hermana como templado, la vía c-NHEJ opera a lo largo del ciclo celular, actuando principalmente en las fases G0/G1 y G2. Por último, alt-EJ permanece activa a lo largo del ciclo celular, mostrando un marcado aumento durante la fase G2 (Mladenov *et al.*, 2016).

La regulación de la vía HR está limitada por el complejo multiproteico cohesina (Watrin y Peters, 2006). En organismos multicelulares, este complejo está compuesto por RAD21, las subunidades del mantenimiento estructural de los cromosomas SMC1 y SMC3, STAG1 (SA1) y STAG2 (SA2) (Peters *et al.*, 2008). Luego de la formación de una RDC, la cohesina se acumula sobre la cromatina rodeando el sitio de la ruptura para una eficiente reparación (Watrin y Peters, 2006). La estabilización de la cohesina en las RDC depende de la subunidad RAD21 (Heidinger-Pauli *et al.*, 2009). La proteína RAD21 (llamada también MCD1 o SCC1) está involucrada en la cohesión de las cromátidas hermanas desde la replicación del ADN en la fase S hasta la segregación apropiada de los cromosomas durante mitosis y se conserva evolutivamente desde las levaduras hasta los seres humanos. La expresión del ARNm de RAD21 está regulada durante el ciclo celular, aumentando en la fase S y alcanzando su máxima expresión en G2 (Cheng *et al.*, 2020). Además de ser requerida para el proceso de HR, RAD21 participa en el punto de control (*checkpoint*) G2/M en respuesta al daño inducido en el ADN (Litwin *et al.*, 2018).

La proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK) participa en la reparación de las RDC a través de c-NHEJ y consiste de una subunidad catalítica (DNA-PKcs) y de un heterodímero compuesto por las subunidades KU70/KU80 (Mohiuddin y Kang, 2019). La formación de este complejo quinasa activo causa la fosforilación de proteínas implicadas en esta vía, como así también la autofosforilación de DNA-PKcs. Ambos procesos influyen en la estabilización de la unión entre DNA-PKcs y los extremos del ADN.

Por último, la vía alt-EJ depende de la polimerasa poli-(ADP-ribosa)-1, PARP-1, la cual tiene afinidad por unirse a los extremos de ADN, alterar la estructura de la cromatina y atraer proteínas de reparación al sitio de daño (De Vos *et al.*, 2012). Esta vía contribuye escasamente en la reparación de las RDC en células normales (no malignas), sin embargo, existe un interés creciente en esta vía porque genera reordenamientos genómicos que son característicos de las células tumorales (Sallmyr y Tomkinson, 2018). En base a esto, se sugiere que alt-EJ no es una vía de reparación de las RDC funcionalmente optimizada y específica, sino un intento de último recurso de la célula para eliminar los extremos de ADN desprotegidos empleando actividades enzimáticas preexistentes cuando los dos mecanismos principales están afectados (Iliakis *et al.*, 2015). Así, en un comienzo se estableció que alt-EJ funcionaba como

respaldo (*backup*) de c-NHEJ; sin embargo, estudios posteriores demostraron que este mecanismo puede también participar en la reparación de las RDC cuando la vía HR no está presente (Ceccaldi *et al.*, 2016).

En presencia del ADN dañado, los puntos de control evitan la progresión del ciclo celular, dando tiempo para que la reparación ocurra y se eviten alteraciones cromosómicas capaces de manifestarse en las generaciones posteriores; y en el caso de la existencia de lesiones irreparables, se estimule la muerte celular. Los defectos en los puntos de control aumentan la inestabilidad genómica y contribuyen al desarrollo tumoral (Visconti *et al.*, 2016).

Nuestro objetivo fue analizar la participación de la vía alt-EJ y del punto de control G2/M en la progresión del daño en el ADN de células humanas tratadas con ETO en la fase G2 del ciclo celular, y establecer la posible contribución de alt-EJ en la inducción de rearrreglos cromosómicos típicos de las neoplasias secundarias asociadas al tratamiento con venenos de Top2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Agentes químicos

ETO (Sigma-Aldrich), NU7026 (Calbiochem), inhibidor de DNA-PKcs (DNA-PKi) y citocalasina B (Calbiochem) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Puromicina (Sigma-Aldrich) se disolvió en agua bidestilada.

Cultivos celulares y silenciamiento génico de RAD21 y PARP-1

Células humanas HeLa (carcinoma cérvico-uterino) se cultivaron en medio completo conteniendo RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina). Los cultivos se mantuvieron a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂. Las células se transfectaron con el plásmido pGIPZ conteniendo el shRNAmir (*microRNA-adapted short hairpin RNA*) específico contra el ARNm de los genes humanos RAD21 (Open Biosystems, clone id: V2LMM_16122) o PARP-1 (Open Biosystems, clone id: V2LHS_201984) para realizar su silenciamiento (*knock-down*). Se generaron las líneas HeLa RAD21kd y HeLa PARP-1kd, y como control negativo se utilizó un plásmido pGIPZ codificando una secuencia No-Silenciante (Open Biosystems, #RHS4346, HeLa NS). Las transfecciones se realizaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A las 48 h, las células se crecieron en medio completo en presencia de puromicina 1 µg/ml, con renovación de este medio cada tres días. El proceso de selección se realizó durante 3-4 semanas y se establecieron clones. El nivel

de silenciamiento de estos clones se evaluó mediante la retrotranscripción asociada a la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*qRT-PCR*).

Técnica qRT-PCR

Se extrajo el ARN de las células HeLa deficientes en RAD21 o en PARP-1 y de las células HeLa NS con el reactivo TRIReagent (Molecular Reagent Center) y se determinó su concentración por espectrofotometría. El ARN total (1 g/reacción) se retrotranscribió usando cebadores (*primers*) al azar (Biodynamics) y la enzima M-MLV (Promega). El análisis de PCR en tiempo real se realizó con “Mezcla Real” (Biodynamics) y la reacción se llevó a cabo en un termociclador CFX Connect (BioRad). Los *primers* para amplificar los genes humanos RAD21 (FW: 5'-GGATAAGAAGCTAACCAAGCCC-3', RV: 5'-CTCCCAGTAAGAGATGTCCTGAT-3'), PARP-1 (FW: 5'-CGGAGTCTTCGGATAAGCTCT-3', RV: 5'-TTTCCATCAAACATGGGCGAC-3') y β-2-Microglobulina (B2M) (FW: 5'-AAGATGAGTATGCCTGCCGTGTGA-3', RV: 5'-ACCTCTAAGTTGCCAGCCCTCCTA-3') se adquirieron en Genbiotech, siendo B2M el gen usado como referencia. Los porcentajes de reducción de los ARNm de RAD21 y de PARP-1 se estimaron en relación a la expresión relativa con B2M de acuerdo al método de Pfaffl (2004) en dos experimentos independientes.

Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) en células metafásicas

Las células HeLa NS y HeLa RAD21kd se sembraron en placas de 60 mm y se cultivaron en medio completo en presencia de 10 µg/ml de la base análoga de timidina, bromodeoxiuridina (BrdU). A las 40 h (dos ciclos de replicación), las células se expusieron a Colcemid 0,1 µg/ml durante los últimos 90 min de cultivo, luego se realizó la hipotonía con una solución de KCl 0,075 M y se fijaron en metanol: ácido acético glacial (3:1) para la obtención de metafases. Los extendidos cromosómicos se dejaron envejecer por lo menos durante una semana. Luego se colocaron en una solución de Hoechst 33258 1 µg/ml en agua destilada por 15 min en oscuridad, se activaron por exposición a la luz solar por 3-4 h y se incubaron en 2X SSC en baño a 56° C por 1 h. Finalmente, se colorearon con Giemsa 10% en buffer Sorensen durante 4 min. Se contaron los ICH/cromosoma en 25 metafases en dos experimentos independientes.

Ensayo clonogénico

Células HeLa NS y HeLa RAD21kd (8x10³/placa) se sembraron en placas de 60 mm y trataron con concentraciones crecientes de ETO (0,05; 0,1; 0,5 y 1 µg/

ml) durante 16 h. Las células se lavaron con solución de buffer fosfato (PBS) y se cultivaron en medio completo por 14 días. Luego, las células se fijaron con metanol 100% y se colorearon con violeta de cristal 1%. Se contaron las colonias conteniendo >50 células y la eficiencia de plaqueo se determinó como (número de colonias contadas/número de células sembradas) x 100, en los cultivos control sin tratamiento. La fracción de sobrevivida se estimó como la relación de colonias en cultivos tratados en relación con los cultivos controles y se expresó en porcentaje. Se realizaron tres-cuatro experimentos independientes.

Determinación de la concentración de ETO a ser utilizada mediante la evaluación de la progresión del ciclo celular

Células HeLa NS y HeLa RAD21kd se sembraron en placas de seis pocillos y se trataron con concentraciones crecientes de ETO (1; 2; 5 y 10 µg/ml) durante 2 h. Las células control se expusieron a DMSO 0,5% durante 2 h. Las células se lavaron con PBS, se cultivaron en medio completo durante 24 h y se cosecharon las células unidas al sustrato y aquellas presentes en el medio completo. Luego se fijaron en metanol 90% a -20° C durante al menos 2 h. Se lavaron en PBS y se resuspendieron en 300 µl de PBS conteniendo 3 µl de RNasa A (libre de DNAsas, 200 µg/ml) y 8 µl de Ioduro de Propidio (IP, 10 µg/ml) durante un mínimo de 20 min en oscuridad, a temperatura ambiente. La adquisición de 20.000 células por concentración se realizó mediante un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton-Dickinson). El análisis del ciclo celular se realizó utilizando el *software* FSC Express4. Se determinó el porcentaje de células presentes en la fase G2/M en tres experimentos independientes.

Detección de RDC (γH2AX) inducidas por ETO en la fase G2

Células HeLa NS y HeLa RAD21kd se sembraron en placas de 35 mm y se trataron con DMSO 0,5% o con ETO 2 µg/ml. A las 2 h se recogió el medio completo y se tripsinizaron y cosecharon las células. Luego de la centrifugación, las células se lavaron con PBS y se fijaron en metanol 90% a -20° C durante al menos 2 h. Las células se marcaron con el anticuerpo primario anti-γH2AX (1:200, Millipore clone JBW301) seguido con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 488 (1:250). Luego se trataron con RNasa A e IP. La adquisición de 20.000 células por tratamiento se realizó mediante el citómetro de flujo FACSCalibur usando el *software* Cell Quest. Se determinó el porcentaje de células γH2AX+ en la fase G2 en cuatro experimentos independientes.

Aberraciones cromosómicas estructurales

Células HeLa NS y HeLa RAD21kd se sembraron en placas de 60 mm y se trataron con DMSO 0,5% durante 2 h, con

el inhibidor de DNA-PKcs (DNA-PKi) NU7026 10 µM, durante todo el tiempo de cultivo, con ETO 2 µg/ml por 1 h, o una combinación de ambas drogas (pretratamiento con DNA-PKi durante 1 h, tratamiento con ETO durante 1 h y tratamiento con DNA-PKi durante el resto del tiempo de cultivo). Las células permanecieron en medio completo hasta alcanzar la primera (5-6 h) o la segunda (28 h) metafase postratamiento. A su vez, las células HeLa PARP-1kd se trataron con DMSO 0,5% durante 2 h o con ETO 2 µg/ml por 1 h y se mantuvieron en medio completo hasta la segunda metafase. Las células HeLa NS, RAD21kd y PARP-1kd se sometieron al procesado citogenético convencional: Colcemid, solución hipotónica con KCl 0,075 M, fijación en metanol: ácido acético glacial (3:1) y coloración con Giemsa 10% durante 4 min. Se evaluó la presencia de aberraciones cromosómicas de tipo cromatídico o cromosómico en un mínimo de 50 metafases por tratamiento. Además, a las 28 h postratamiento, se analizó el índice mitótico (IM) contando el número de metafases en 1.000 núcleos interfásicos y se expresó en porcentajes. El análisis se realizó mediante microscopio óptico en dos-cinco experimentos independientes.

Análisis del ciclo celular

Células HeLa NS y HeLa RAD21kd se sembraron en placas de 35 mm y se trataron con DMSO 0,5% durante 2 h, con DNA-PKi durante todo el tiempo de cultivo, con ETO 2 µg/ml por 1 h o una combinación DNA-PKi/ETO (pretratamiento con NU7026 durante 1 h, tratamiento con ETO durante 1 h y tratamiento con NU7026 durante el resto del tiempo de cultivo). Las células se dejaron en medio completo durante 8 y 16 h postratamiento. Se siguió el procedimiento descrito en *Determinación de la concentración de ETO a ser utilizada*. Las fases del ciclo celular se analizaron mediante el *software* FSC Express4 en cuatro experimentos independientes.

Focos de γH2AX en los núcleos de células binucleadas

Células HeLa NS y HeLa RAD21kd se sembraron sobre cubreobjetos en placas de 35 mm y se trataron con DMSO, DNA-PKi, ETO o una combinación de DNA-PKi/ETO y se mantuvieron en medio completo durante 10-11 h. Se agregó citocalasina B 3 µg/ml durante las últimas 4 h de cultivo. Las células se expusieron a la solución hipotónica KCl 0,075 M durante 8 min, se fijaron con paraformaldehído (PFA) 2% y se permeabilizaron con Tritón X-100 0,25%. Se realizó la marcación usando el anticuerpo primario anti-γH2AX (1:200) y el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 594 (1:300). El ADN se coloreó con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) y los cubreobjetos se colocaron sobre portaobjetos. En estos preparados se contaron los núcleos interfásicos que contenían ≥20 focos γH2AX en 500 células binucleadas

(BN) por tratamiento. Además, se evaluó el porcentaje de células BN en 1.000 células por tratamiento. Se realizaron dos-cuatro experimentos independientes.

Micronúcleos en células binucleadas en combinación con γ H2AX

Células HeLa NS y HeLa RAD21kd se sembraron y trataron según lo descrito en el punto anterior, manteniéndose en medio completo durante 96 h. Se adicionó citocalasina B 3 μ g/ml durante las últimas 12 h de cultivo y las células se expusieron a solución hipotónica, fijación con PFA y permeabilización con Tritón X-100. La inmunomarcación se efectuó usando el anti- γ H2AX y el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 594. El ADN se coloreó con DAPI. Los micronúcleos (MN) y la presencia o no de focos γ H2AX en los MN se contaron en 400 células BN por tratamiento. Se realizaron dos-tres experimentos independientes.

Análisis estadístico

Los datos se presentaron como media \pm error estándar de la media y el análisis estadístico se realizó mediante el test *t* de Student para evaluar la significancia entre los tratamientos en las líneas celulares empleadas usando el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., USA). La relación lineal dosis-respuesta se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (Primer of Biostatistics, Stanton A. Glantz, by McGraw-Hill, Inc, version 3.0, 1992). La significancia estadística se consideró cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

El nivel de expresión del gen *RAD21* en las líneas celulares generadas se evaluó mediante qRT-PCR (Figura 1a). Los porcentajes de expresión en las líneas celulares silenciadas fueron: HeLa shRAD21#1= 32,2 \pm 5,8%; HeLa shRAD21#2= 38,4 \pm 9,3% y HeLa shRAD21#3= 54,2 \pm 5,4% en relación a la línea control HeLa NS (100%). No existieron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de *RAD21* entre los clones generados. Se decidió utilizar como modelo experimental las células del clon HeLa shRAD21#1, a partir de ahora llamadas células HeLa RAD21kd, por presentar el nivel de expresión más bajo.

En primer lugar, se caracterizaron las células HeLa RAD21kd generadas. La subunidad del complejo cohesina *RAD21* mantiene las cromátidas hermanas unidas en el sitio de las RDC para permitir la reparación mediante HR y esta vía está asociada a la presencia de ICH en células de vertebrados. Por lo tanto, se examinó la frecuencia

espontánea de ICH/cromosoma en las células HeLa RAD21kd (Figura 1b). Los resultados mostraron valores menores en las células deficientes en *RAD21* que aquellos obtenidos en las células proficientes HeLa NS (0,09 \pm 0,01 vs. 0,13 \pm 0,01, $p=0,0001$).

Para determinar la sensibilidad de la línea celular HeLa RAD21kd, las células se expusieron a concentraciones crecientes de ETO durante 16 h (Figura 1c) y se evaluó la formación de colonias sobrevivientes a los 14 días. La eficiencia de plaqueo en células controles sin tratar se usó para normalizar el número de colonias en HeLa NS y RAD21kd. La eficiencia fue de 81,4 \pm 3,2% para HeLa NS y de 68,6 \pm 2,9% para HeLa RAD21kd. Ambas líneas celulares mostraron una relación lineal entre las colonias formadas y las concentraciones utilizadas de ETO (HeLa NS $r=0,986$, $p=0,002$ y HeLa RAD21kd $r=0,903$, $p=0,036$). Las células HeLa RAD21kd presentaron una mayor sensibilidad a ETO a partir de 0,05 μ g/ml ($p < 0,02$).

Luego se estableció la concentración de ETO a ser utilizada en los siguientes experimentos mediante el análisis de la progresión del ciclo celular. Las células HeLa NS y HeLa RAD21kd se expusieron a ETO desde 1 a 10 μ g/ml durante 2 h y se determinó el porcentaje de células en la fase G2/M a las 24 h (Figura 1d). Los datos obtenidos indicaron una mayor acumulación de células en la fase G2/M a medida que la concentración de ETO aumentaba (HeLa NS $r=0,993$, $p=0,0001$ y HeLa RAD21kd $r=0,980$, $p=0,003$). El arresto en G2/M con ETO 2 μ g/ml fue de 24,4 \pm 3,2% para HeLa NS y de 31,0 \pm 4,4% para HeLa RAD21kd, sin existir diferencias significativas entre ambos valores. A partir de esta concentración, el porcentaje de células arrestadas en G2/M fue del 50% para ETO 5 μ g/ml y superior al 65% para ETO 10 μ g/ml en las dos líneas celulares, produciendo una importante acumulación en esta fase. En base a estos resultados, se eligió la concentración subtóxica de 2 μ g/ml.

Por último, se analizó la formación de RDC mediante el biomarcador γ H2AX en la fase G2 de las células HeLa NS y RAD21kd (Figura 1e). La inducción de γ H2AX es uno de los primeros eventos detectados en las células luego de la exposición a agentes que dañan al ADN. El porcentaje de células HeLa NS γ H2AX+ tratadas con ETO fue de 88,2 \pm 2,0% y en las células HeLa RAD21kd de 92,2 \pm 1,9% en relación a los controles tratados con DMSO, 13,0 \pm 1,5% y 14,7 \pm 3,3%, respectivamente ($p=0,0001$). Este resultado permitió establecer que la inducción de RDC por ETO en la fase G2 fue similar en ambas líneas celulares.

Los estudios se realizaron tratando las células en la fase G2 debido a que en esta fase la isoforma α de Top2, blanco específico de ETO, alcanza su máxima expresión (Chen *et al.*, 2015) y los mecanismos de reparación c-NHEJ, alt-EJ y HR se encuentran todos funcionales en dicha fase (Mladenov *et al.*, 2016).

A partir de la elección de la concentración a utilizar, ETO 2 μ g/ml, el diseño experimental fue el siguiente: las células HeLa NS y HeLa RAD21kd en crecimiento

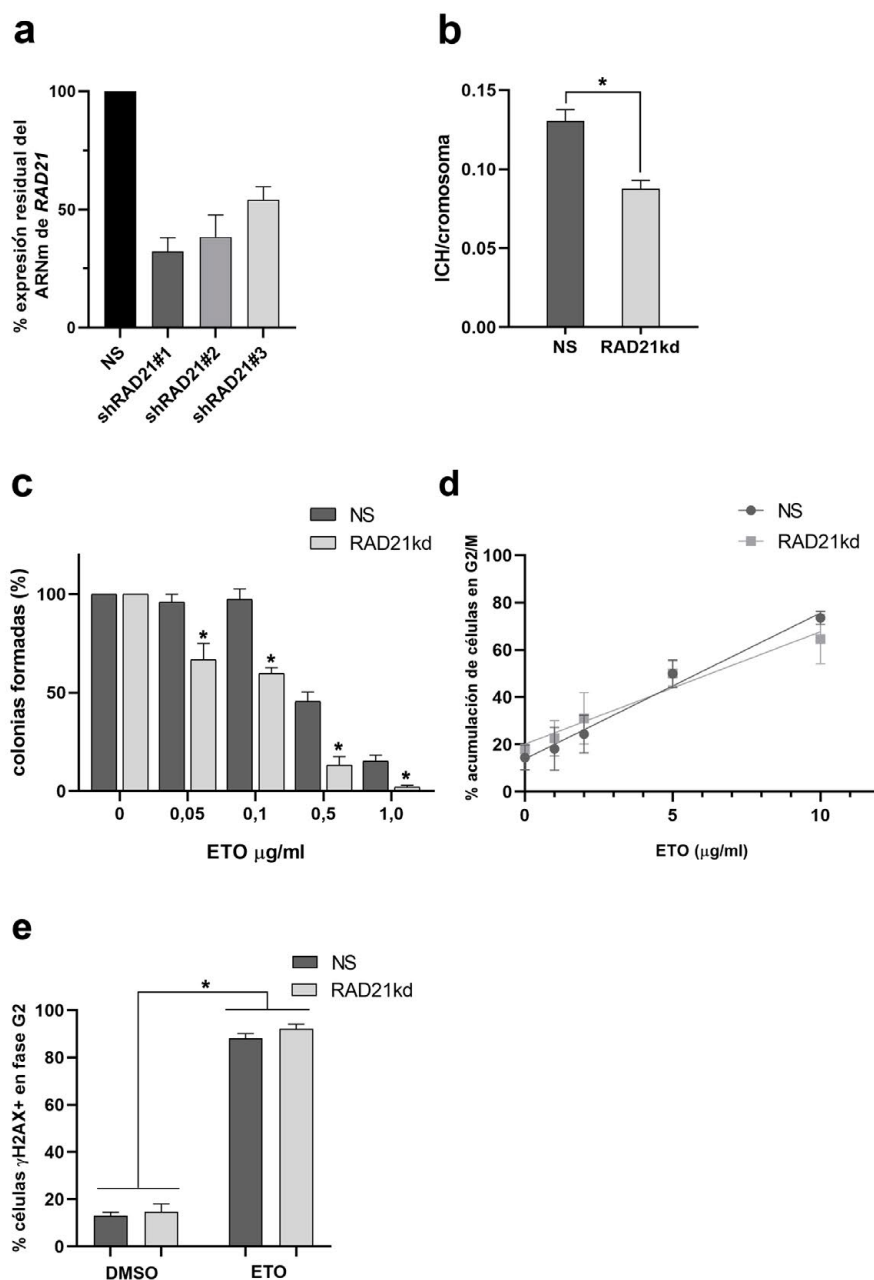


Figura 1. Caracterización de la línea tumoral humana HeLa deficiente en RAD21.

a. Porcentaje de expresión de RAD21 en los clones celulares deficientes, HeLa RAD21kd, en relación al control negativo, células HeLa NS (No-Silenciadas); **b.** Número de intercambios de cromátidas hermanas (ICH) por cromosoma, * $p=0,0001$; **c.** Porcentaje de colonias sobrevivientes de células HeLa RAD21kd y HeLa NS tratadas con concentraciones crecientes de ETO (0,05; 0,1; 0,5 y 1 µg/ml) durante 16 h, * $p<0,02$; **d.** Porcentaje de células HeLa RAD21kd y HeLa NS acumuladas en el punto de control G2/M luego del tratamiento con ETO 1; 2; 5 y 10 µg/ml durante 2 h; **e.** Inducción de rupturas de doble cadena (γ H2AX+) en la fase G2 de células RAD21kd y HeLa NS tratadas con DMSO 0,5% o con ETO 2 µg/ml, durante 2 h, * $p=0,0001$.

exponencial, se trataron con DMSO 0,5% por 2 h, o con DNA-PKi 10 µM durante todo el tiempo de cultivo, o con ETO 2 µg/ml por 1 h o con una combinación de ambas drogas, es decir, un pretratamiento con DNA-PKi por 1 h, luego un tratamiento con ETO 2 µg/ml por 1 h, y a continuación de dos lavados con PBS, un tratamiento con DNA-PKi durante el resto del tiempo de cultivo (DNA-PKi/ETO). Se analizaron las aberraciones cromosómicas

(AC) en la primera (a las 5–6 h) y en la segunda (a las 28 h) metafase, la presencia de focos γ H2AX en la fase G1 posmitótica (a las 10–11 h) y en los MN (a las 96 h) de células BN. Además, se evaluó el ciclo celular a las 8 y 16 h (Figuras 2–6).

Las RDC en el ADN cuando permanecen sin reparar o son mal reparadas, son lesiones decisivas para la formación de AC (Obe y Durante, 2010). La Figura 2

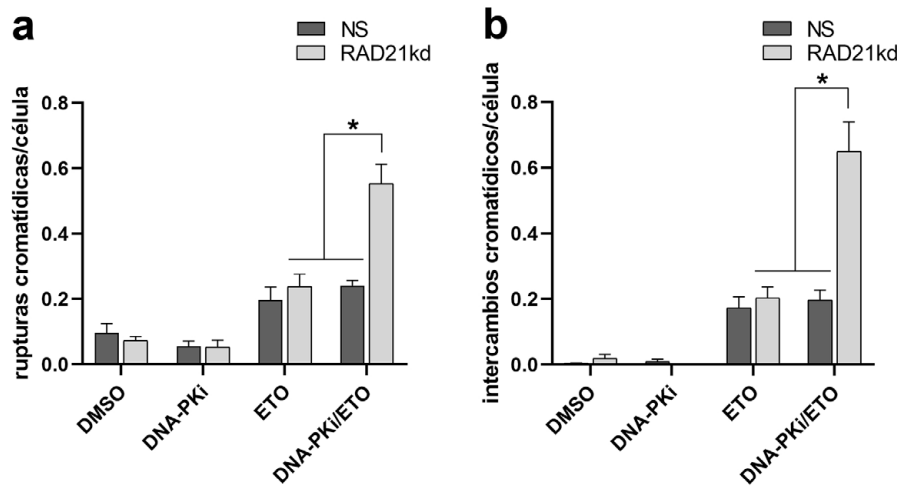


Figura 2. Frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales en la primera metafase (5-6 h) luego de los diferentes tratamientos.

a. Rupturas cromatídicas/célula; b. Intercambios de cromátidas/célula. * $p=0,0001$.

muestra las AC estructurales en las células HeLa NS y HeLa RAD21kd tratadas con DNA-PKi, con ETO o con la combinación de ambas drogas en la fase G2 y analizadas en la primera metafase, a las 5-6 h posteriores a los tratamientos.

En las células HeLa NS tratadas con DNA-PKi/ETO se observó una frecuencia de rupturas cromatídicas/célula de $0,24 \pm 0,02$ y en las células deficientes en RAD21 tratadas con ETO de $0,24 \pm 0,04$ (Figura 2a). Las células HeLa RAD21kd expuestas a DNA-PKi/ETO mostraron una frecuencia de $0,55 \pm 0,06$ ($p=0,0001$). Cuando se evaluaron las figuras de intercambio de cromátidas/célula, se observó un fenómeno similar (Figura 2b). Las células HeLa NS tratadas con la combinación de ambas drogas y las células HeLa RAD21kd tratadas con ETO mostraron una frecuencia de $0,20 \pm 0,03$. En el caso del tratamiento con DNA-PKi/ETO, las células HeLa RAD21kd exhibieron una frecuencia de figuras de intercambio de cromátidas de $0,65 \pm 0,09$ ($p=0,0001$). Los resultados obtenidos indicaron que la falta y/o incorrecta reparación de las RDC originaron un aumento sinérgico de rupturas e intercambios de cromátidas frente a ETO en un contexto deficiente en c-NHEJ, por inhibición química de DNA-PKcs y de HR por la deficiencia de RAD21, en comparación a la falta de cada factor en forma individual.

Con el propósito de analizar la progresión del daño a la fase G1 posmitótica, se examinó la presencia de núcleos con ≥ 20 focos γ H2AX en células BN a las 10-11 h (Figura 3). Este estudio se limitó a las células BN que llegaron a la fase G1 resultado del bloqueo de la citocinesis con citocalasina B. Además, el análisis se apoyó en estudios

previos de Deckbar *et al.* (2007), donde fibroblastos humanos irradiados entraban en mitosis sin ser arrestados en el punto de control G2/M, cuando aún tenían hasta ~ 20 focos γ H2AX.

En HeLa RAD21kd, el porcentaje de células BN con ≥ 20 focos fue $\sim 20\%$ en los controles tratados con DMSO o con DNA-PKi. En HeLa NS no se encontraron células con este número de focos. Los tratamientos con ETO y con DNA-PKi/ETO incrementaron los porcentajes de células BN con ≥ 20 focos γ H2AX, siendo este aumento de 5,4 y 3,8 veces en las células HeLa RAD21kd en comparación con las células HeLa NS, respectivamente (Figura 3a). Sin embargo, en ambas líneas celulares estos tratamientos disminuyeron en forma similar el porcentaje de células BN (Figura 3b).

Los porcentajes observados en las células BN de HeLa NS y HeLa RAD21kd reflejaron una acumulación similar en la fase G2/M a las 8 h. En HeLa NS, luego del tratamiento con ETO fue de $54,8 \pm 2,4\%$ y en HeLa RAD21kd, de $52,0 \pm 2,9\%$ mientras que, con la combinación DNA-PKi/ETO fue de $60,0 \pm 3,0\%$ en HeLa NS y de $59,3 \pm 4,7\%$ en HeLa RAD21kd (Figuras 4a y 4b). Sin embargo, el análisis de la proporción de células en G2/M entre aquellas tratadas con DNA-PKi, ETO o DNA-PKi/ETO y sus controles tratados con DMSO, mostró que esa proporción fue de 3,9-4,3 en HeLa NS y, en las células HeLa RAD21kd fue de $\sim 2,1$ luego de ETO y DNA-PKi/ETO. El tratamiento con DNA-PKi en HeLa NS fue de 1,2 y en HeLa RAD21kd fue de 0,95, en relación al control tratado con DMSO.

Por lo tanto, la inhibición química de DNA-PKcs y la deficiencia de RAD21 originaron un aumento de AC de

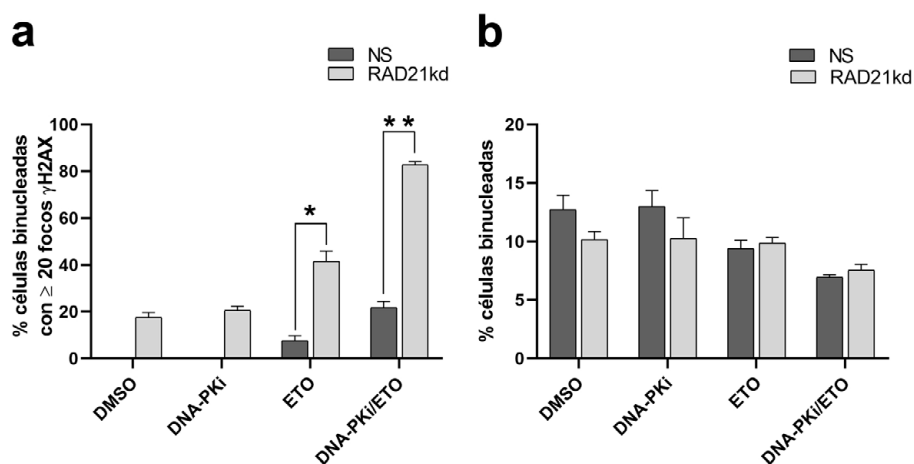


Figura 3. Progresión de las rupturas de doble cadena (γ H2AX) a la fase G1 posmitótica (10-11 h) luego de los diferentes tratamientos.

a. Porcentaje de células binucleadas con ≥ 20 focos γ H2AX en HeLa RAD21kd y HeLa NS, * $p=0,001$, ** $p=0,0001$; b. Porcentaje de células binucleadas en HeLa RAD21kd y HeLa NS.

tipo cromatídico en la primera metafase y de células BN con RDC (focos γ H2AX) persistentes en la fase G1 posmitótica luego del tratamiento con ETO. En cambio, la proporción de células acumuladas en G2/M fue mayor en HeLa NS en comparación con HeLa RAD21kd a las 8 h.

Alas 16 h, el porcentaje de células en G2/M fue de $\sim 36\%$, tanto en las células HeLa NS tratadas con DNA-PKi/ETO como en las células HeLa RAD21kd tratadas con ETO, evidenciando un ingreso al ciclo celular al compararlas con los porcentajes obtenidos a las 8 h (Figura 4c y 4d). A pesar de ello, en HeLa NS, la proporción de células en G2/M entre las tratadas con DNA-PKi/ETO y las tratadas con DMSO fue de 1,6, mientras que en las células HeLa RAD21kd esa proporción fue similar al obtenido a las 8 h (2,2) entre las células tratadas con ETO y aquellas tratadas con DMSO. A su vez, cuando las células HeLa RAD21kd se expusieron a la combinación DNA-PKi/ETO, se observó una acumulación celular en la fase G2/M de $53,3 \pm 2,5\%$ (Figura 4d). En consecuencia, la deficiencia de c-NHEJ y HR produjo un arresto en G2/M que iniciado a las 8 h se mantuvo a las 16 h luego del tratamiento con ETO.

En las metafases de la segunda división a las 28 h, las rupturas cromatídicas y cromosómicas/célula, esencialmente fragmentos acéntricos, evidenciaron un aumento aditivo, siendo en las células HeLa RAD21kd tratadas con la combinación DNA-PKi/ETO de $3,3 \pm 0,2$ ($p=0,0001$), en células HeLa NS con el mismo tratamiento de $1,8 \pm 0,2$ y en HeLa RAD21kd tratadas con ETO de $1,3 \pm 0,2$ (Figura 5a). Cuando se evaluaron los cromosomas dicéntricos/célula en HeLa NS en presencia de DNA-PKi/

ETO y en HeLa RAD21kd expuestas a ETO, el valor fue de $\sim 0,6$ (Figura 5b). Con el tratamiento combinado (DNA-PKi/ETO) las células HeLa RAD21kd mostraron una frecuencia de $1,90 \pm 0,13$ ($p=0,0001$). Ante la ausencia de las vías principales c-NHEJ y HR se produjo un aumento sinérgico de los cromosomas dicéntricos en relación a la frecuencia hallada por la falta individual de actividad de cada proteína, DNA-PKcs y RAD21.

Como se describió previamente, cuando c-NHEJ y HR no son funcionales, las RDC se reparan por una vía alternativa dependiente de la proteína PARP-1, alt-EJ, la cual origina rearrreglos cromosómicos. En base a los resultados obtenidos y para confirmar la participación de alt-EJ en las AC inducidas por ETO, se analizaron las rupturas cromatídicas y cromosómicas y los cromosomas dicéntricos en células deficientes en PARP-1 a las 28 h (Figuras 5c y 5d).

Con este propósito, se generó la línea deficiente en PARP-1 y se determinó el nivel de expresión del ARNm del gen PARP-1 mediante la técnica qRT-PCR. La expresión fue de $7,7 \pm 4,0\%$ en relación a la línea control HeLa NS (100%) y se obtuvo la línea celular HeLa PARP-1kd. En estas células, la frecuencia de rupturas cromatídicas y cromosómicas/célula fue de $0,45 \pm 0,06$ luego del tratamiento con ETO; mientras que en las células HeLa RAD21kd tratadas con DNA-PKi/ETO fue de $3,3 \pm 0,2$ ($p=0,0001$). En el caso de cromosomas dicéntricos/célula, en las células HeLa PARP-1kd tratadas con ETO fue de $0,26 \pm 0,05$ y en las células HeLa RAD21kd tratadas con DNA-PKi/ETO de $1,90 \pm 0,13$ ($p=0,0001$). El incremento de las AC observado frente a la falta de las vías de reparación

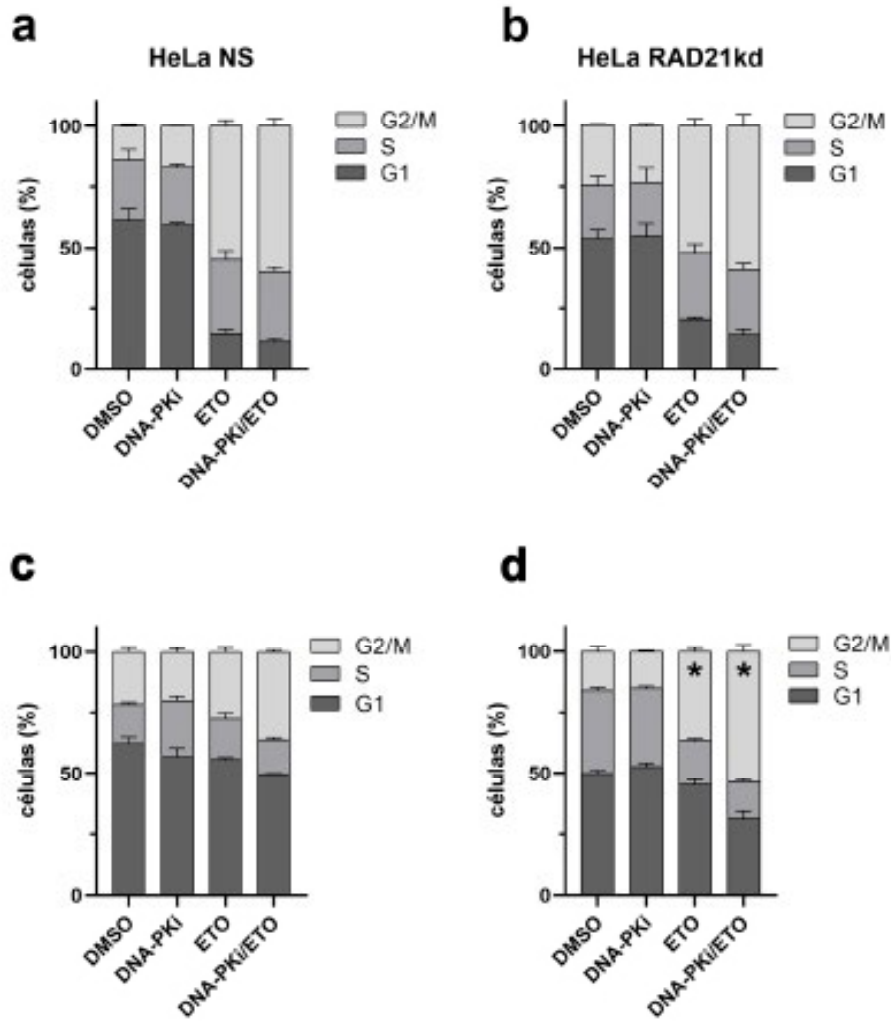


Figura 4. Distribución de las poblaciones celulares en las fases G1, S y G2/M a las 8 h (a y b) y a las 16 h (c y d) luego de los diferentes tratamientos.

* $p=0,005$, porcentaje de células en la fase G2/M entre ETO vs. DNA-PKI/ETO.

c-NHEJ y HR y su disminución en células deficientes en PARP-1, evidenciaron la contribución de alt-EJ en la formación de estas alteraciones cromosómicas obtenidas.

Además, se analizó el IM en las células HeLa NS, HeLa RAD21kd y HeLa PARP-1kd a las 28 h luego de los tratamientos (Figuras 5e y 5f). Los IM de las células HeLa NS tratadas con DMSO o con el inhibidor de DNA-PKcs fueron más altos que los observados en las células HeLa RAD21kd ($p<0,05$). Mientras que en HeLa NS, el tratamiento con DNA-PKI/ETO provocó una reducción significativa del IM en comparación con el valor obtenido con ETO ($p=0,0001$), estos tratamientos no causaron cambios notorios en el IM de las células HeLa RAD21kd (Figura 5e).

A su vez, como se muestra en la Figura 5f, los IM obtenidos en las células HeLa PARP-1kd expuestas a

DMSO o a ETO no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, la disminución de las AC en las células HeLa PARP-1kd no se debió a un descenso del número de metafases analizables.

Con el fin de evaluar la inestabilidad cromosómica originada por la participación de alt-EJ en la reparación de las RDC inducidas por ETO, se analizaron los MN presentes en células BN a las 96 h (a largo plazo). Los MN son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, que no son incorporados correctamente a las células hijas durante la división celular y surgen como resultado de un daño directo sobre el ADN (fragmentos acéntricos, clastogenicidad) o por el retraso de cromosomas enteros durante la segregación (aneugenicidad) (Chondrou *et al.*, 2018). La combinación del ensayo de MN con la detección de focos γ H2AX en ellos, permite discriminar su origen: los agentes clastogénicos producen MN que contienen

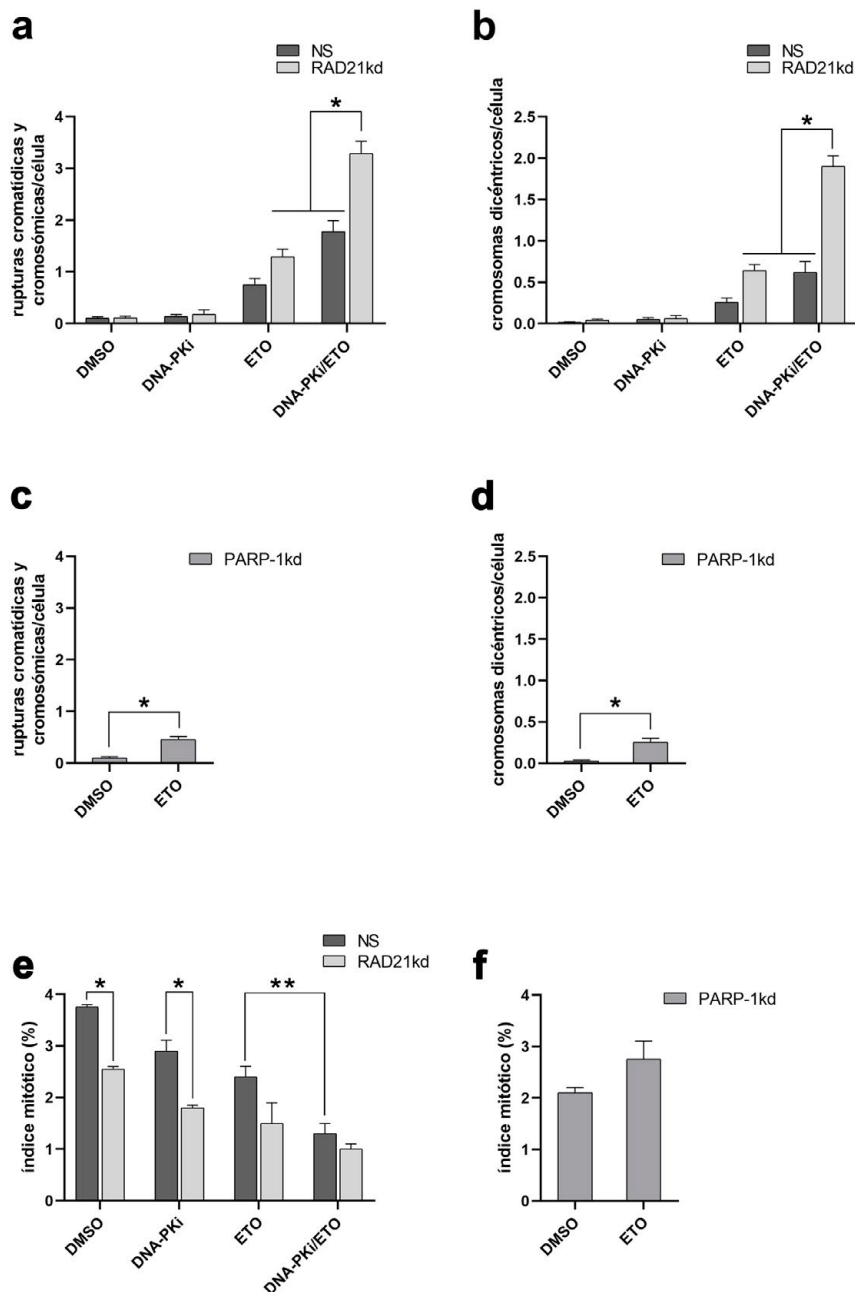


Figura 5. Aberraciones cromosómicas estructurales e índice mitótico en las células HeLa RAD21kd, HeLa PARP-1kd y HeLa NS en la segunda metafase (28 h) luego de los diferentes tratamientos.

a. Rupturas cromatídicas y cromosómicas/célula en células HeLa NS y HeLa RAD21kd; b. Cromosomas dicéntricos/célula en células HeLa NS y HeLa RAD21kd, * $p=0,0001$; c. Rupturas cromatídicas y cromosómicas/célula en células HeLa PARP-1kd; d. Cromosomas dicéntricos/célula en células HeLa PARP-1kd, * $p<0,05$; e. Índice mitótico en células HeLa NS y HeLa RAD21kd, * $p<0,05$, ** $p=0,0001$; f. Índice mitótico en células HeLa PARP-1kd.

focos γ H2AX (MN γ H2AX+) y los aneugénicos inducen MN que no los presentan (MN γ H2AX-). Los datos sobre la presencia de MN en las células HeLa NS y HeLa RAD21kd se muestran en la Figura 6. La mayoría de las células BN de ambas líneas celulares poseían un MN. La proporción entre los MN de las células BN tratadas y aquellos presentes en las células BN controles (tratadas con

DMSO) demostró un aumento significativo en las células BN HeLa RAD21kd ($p=0,001$, Figura 6a). Dentro de los MN obtenidos se observó un importante aumento de MN γ H2AX- en las células HeLa NS y HeLa RAD21kd tratadas con DMSO o con el inhibidor de DNA-PKcs (Figuras 6b y 6c). En cambio, el tratamiento con ETO produjo una disminución de MN γ H2AX-, incrementándose el

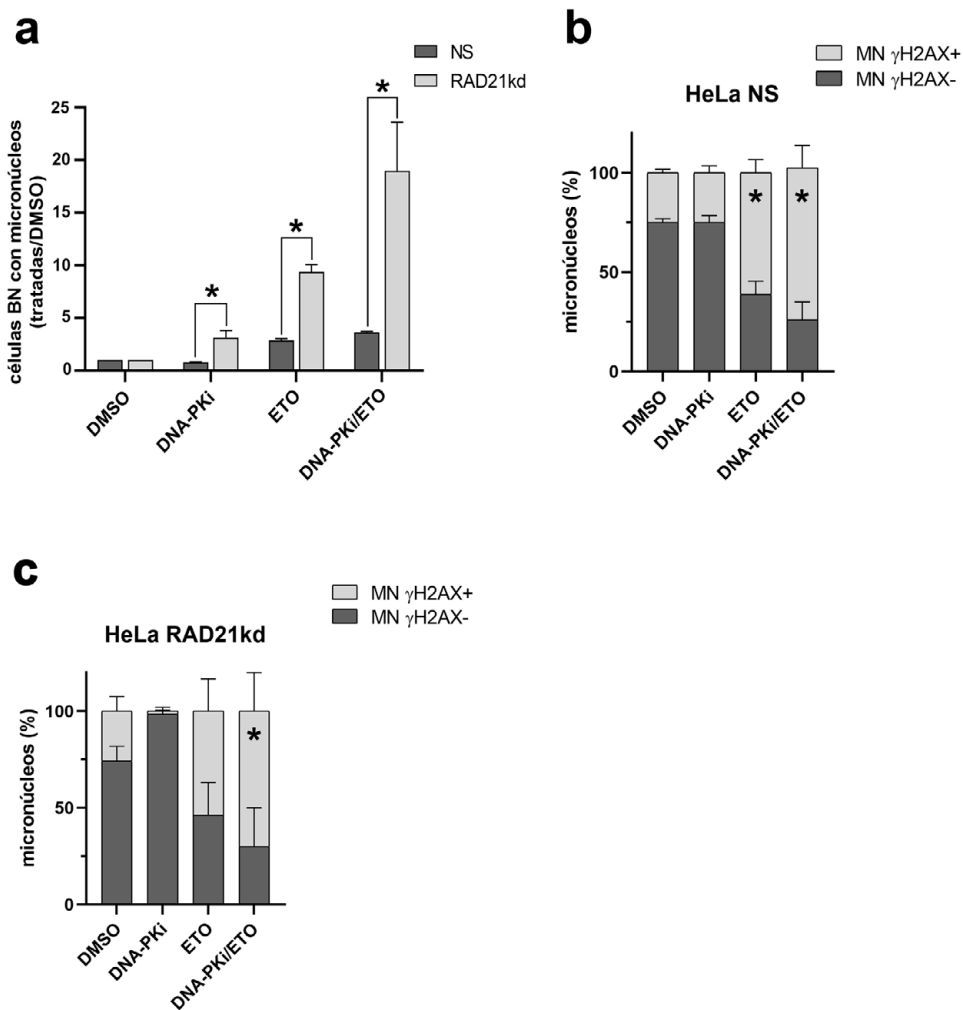


Figura 6. Células binucleadas (BN) con micronúcleos (MN) a las 96 h postratamientos.

a. Proporción entre las células BN con MN luego de los diferentes tratamientos y las células BN con MN tratadas con DMSO (control) en HeLa NS y HeLa RAD21kd, * $p=0,001$; **b** y **c.** Porcentajes de MN con (γ H2AX+) o sin (γ H2AX-) rupturas de doble cadena, * $p=0,0001$ tratados vs. sus respectivos controles en células HeLa NS y HeLa RAD21kd.

porcentaje de los MN γ H2AX+ ($61,2 \pm 6,6\%$ en HeLa NS vs. $53,6 \pm 16,8\%$ en HeLa RAD21kd). Los porcentajes de los MN γ H2AX+ alcanzaron sus valores más altos ($>70\%$) con el tratamiento combinado DNA-PKi/ETO en ambas líneas celulares. Las células RAD21kd tratadas con la combinación del inhibidor de DNA-PKcs y ETO mostraron un marcado aumento de MN, siendo la mayoría de ellos γ H2AX+, lo cual indicó que los fragmentos acéntricos y los cromosomas dicéntricos podrían contribuir a la formación de los MN obtenidos.

DISCUSIÓN

ETO es una droga utilizada en el tratamiento de

leucemias, linfomas y tumores sólidos. A pesar de su amplio y efectivo uso, los pacientes tratados con ETO presentan el riesgo potencial de desarrollar leucemias secundarias relacionadas a la terapia, las cuales suelen manifestarse luego de un periodo de latencia corto (Zhang *et al.*, 2021). La incidencia de estas leucemias se incrementó debido a una mayor tasa de supervivencia de los pacientes y al uso de regímenes quimioterapéuticos más intensos para tratar tumores primarios.

Los rearrreglos entre cromosomas como las translocaciones, representan las anomalías cariotípicas características de las leucemias (Roukos y Misteli, 2014). En este sentido, la vía de reparación alt-EJ remueve las RDC ante la ausencia de c-NHEJ y de HR, promoviendo un procesamiento incorrecto de estas lesiones, lo cual origina grandes alteraciones en los sitios de unión de los extremos

rotos y la formación de rearreglos cromosómicos (Iliakis *et al.*, 2015). En base a estas observaciones se analizó la presencia de daño cromosómico inducido por ETO en células humanas deficientes en c-NHEJ y HR y su progresión a lo largo de las divisiones celulares.

Las células HeLa deficientes en RAD21 (HeLa RAD21kd) se generaron mediante transfecciones estables con un shRNAmir específico. Nuestros resultados revelaron un porcentaje menor en la expresión de este gen en comparación al valor obtenido (~55-62%) por Xu *et al.* (2011) en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231 utilizando un sistema de silenciamiento génico similar.

La deficiencia en la subunidad RAD21 altera la reparación de las RDC mediante HR y la presencia de ICH es una medida de la activación de la recombinación en células de vertebrados (Sonoda *et al.*, 1999). Los niveles espontáneos de ICH/cromosoma en las células HeLa RAD21kd fueron menores en relación a las células HeLa NS. Similares resultados se obtuvieron en células embrionarias humanas 293/A658 deficientes en RAD21 (SCC1), donde la frecuencia de ICH/metafase fue la mitad de la hallada en células proficientes (Potts *et al.*, 2006).

Cuando se evaluó la sensibilidad de HeLa RAD21kd a ETO se observó que estas células fueron hipersensibles a partir de la concentración más baja empleada en relación a las células HeLa NS. Nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos por Atienza *et al.* (2005), quienes reportaron una mayor sensibilidad de las células de cáncer de mama MCF-7 deficientes en RAD21 cuando fueron tratadas con ETO.

Luego se determinó la presencia de células con RDC (γ H2AX+) en la fase G2 del ciclo celular en ambas líneas celulares expuestas a la concentración de ETO elegida, 2 μ g/ml. La marcación γ H2AX indica una respuesta celular temprana frente al daño inducido en el ADN y es un biomarcador sensible y específico para la detección de RDC (Takahashi y Ohnishi, 2005). En las células HeLa NS y HeLa RAD21kd se obtuvo un marcado aumento en el porcentaje de células con RDC (~90%). En estudios previos, hemos observado la inducción de estas lesiones en la fase G2 de fibroblastos humanos normales (de Campos Nebel *et al.*, 2010) y de células HeLa (Palmitelli *et al.*, 2015) luego del tratamiento con ETO.

La ausencia de la vía HR se consiguió mediante el silenciamiento de *RAD21* y la deficiencia de c-NHEJ se logró utilizando un potente inhibidor selectivo de DNA-PKcs, NU7026. Este inhibidor tiene una actividad 60 veces más alta contra DNA-PKcs en relación a otras fosfatidilinositidil 3-quinasas, como ataxia telangiectasia mutada (ATM) y ataxia telangiectasia y rad3-relacionada (ATR) (Willmore *et al.*, 2004). Los resultados exhibieron un aumento sinérgico de rupturas e intercambios de cromátidas frente a ETO en un contexto deficiente en c-NHEJ y en HR en la primera metafase postratamiento.

A su vez, el daño inducido se evaluó en la interfase

G1 posmitótica mediante la cuantificación de núcleos con ≥ 20 focos γ H2AX en células BN. Estos focos pueden ser el resultado de lesiones persistentes sin reparar o incorrectamente reparadas, y/o a las producidas durante la mitosis previa (Ricoul *et al.*, 2019). En consecuencia, los focos γ H2AX observados en la interfase G1 posmitótica reflejarían la presencia de rupturas cromatídicas (lesiones sin reparar), de figuras de intercambio de cromátidas (lesiones mal reparadas), y/o de las rupturas de estas figuras de intercambio ocasionadas durante la migración, hacia polos opuestos, de los centrómeros durante anafase. El tratamiento con ETO o con la combinación DNA-PKi/ETO causó un marcado aumento de células BN con ≥ 20 focos γ H2AX en HeLa RAD21kd en comparación a HeLa NS, sin una reducción importante en el porcentaje de células BN.

En las células tumorales HeLa no se observa una acumulación celular en la fase G1 en presencia de un ADN dañado debido a la falta o disminución de la expresión de la proteína p53 (Del Nagro *et al.*, 2014). Es por esto que el análisis del ciclo celular se focalizó en el punto de control G2/M.

A las 8 h se obtuvo una mayor proporción de células HeLa NS en la fase G2/M respecto a las células HeLa RAD21kd. Estos resultados indicaron que, a pesar del mayor daño cromosómico presente en RAD21kd, estas células continuaron su progresión durante el ciclo celular por poseer un punto de control G2/M defectuoso. En este sentido, Watrin y Peters (2006) reportaron que células HeLa deficientes en RAD21 (SCC1) pudieron entrar en mitosis a pesar de la presencia de cromosomas altamente fragmentados luego de la exposición a ETO 5 μ M (~3 μ g/ml) por 15 min durante la fase G2. Por lo tanto, la subunidad proteica RAD21 promovería la activación del punto de control G2/M frente al daño inducido.

A las 16 h, la acumulación en G2/M disminuyó en las células HeLa NS tratadas con DNA-PKi/ETO, lo cual indicaría el reinicio del ciclo celular. Por otro lado, HeLa RAD21kd presentó una proporción de células en la fase G2/M que se mantuvo desde las 8 h luego de los tratamientos con ETO y aún más con DNA-PKi/ETO. Según datos reportados, los fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en RAD21 (RAD21+/-) exhibieron un aumento de células en la fase G2/M a las 24 h luego de exponerlos a radiación ionizante al compararlos con los fibroblastos controles *wild-type* (Xu *et al.*, 2010).

Nuestros resultados junto a los antecedentes bibliográficos citados, indicarían que la falta de RAD21 llevaría a un arresto celular insuficiente en el punto de control G2/M a tiempos cortos, aunque el porcentaje de las células acumuladas podría mantenerse en el tiempo.

Asimismo, los inhibidores de DNA-PKcs influyen sobre la acumulación celular en G2/M. La distribución de las poblaciones celulares de HeLa NS y HeLa RAD21kd en las diferentes fases mostró un ligero incremento en G2/M en presencia del inhibidor de DNA-PKcs NU7026

en combinación con ETO. En el mismo sentido, las células de leucemia mieloide crónica K562 expuestas a ETO presentaron una mayor acumulación en G2/M en presencia de NU7026 (Willmore *et al.*, 2004). La adición de otro inhibidor de DNA-PKcs, NU7441 aumentó el número de células de carcinoma nasofaríngeo SUNE-1 en la fase G2/M luego de la exposición a radiación ionizante (Dong *et al.*, 2018).

A las 28 h, las metafases de la segunda división mitótica revelaron un mayor incremento de AC luego del tratamiento con ETO en un contexto deficiente en c-NHEJ y en HR, en comparación con los valores obtenidos en la primera metafase. Las células HeLa RAD21kd en presencia de DNA-PKi/ETO utilizaron la vía alt-EJ para reparar las RDC persistentes, llevando a un aumento sinérgico de cromosomas dicéntricos. Alt-EJ es una vía lenta que remueve los extremos libres del ADN, muy citotóxicos para el genoma, induciendo al mismo tiempo un aumento de rearrreglos cromosómicos (Iliakis *et al.*, 2015). Además, las deficiencias de RAD21 (Gelot *et al.*, 2016) o de DNA-PKcs (Gunn *et al.*, 2011) están asociadas a la aparición de rearrreglos al reunir en forma incorrecta los extremos del ADN.

La participación de la vía alt-EJ se confirmó con los valores obtenidos en las células HeLa PARP-1kd. En estas células deficientes en PARP-1, la frecuencia de rupturas cromatídicas y cromosómicas, y de cromosomas dicéntricos se redujo luego del tratamiento con ETO.

Los cromosomas dicéntricos son inductores de inestabilidad cromosómica a través del ciclo de ruptura-fusión-puente (*breakage-fusion-bridge*, *BFB cycle*). El ciclo BFB comienza con la formación de rupturas en el cromosoma que se fusionan originando cromosomas dicéntricos, o cromátidas hermanas unidas, y en anafase estas estructuras crean puentes cromatínicos al dirigirse los dos centrómeros hacia polos opuestos. Los puentes se rompen y los extremos rotos vuelven a fusionarse, repitiendo el ciclo BFB (Gisselsson *et al.*, 2000).

Los MN son estructuras nucleares pequeñas que pueden originarse por fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas dicéntricos, que se pueden incorporar en el genoma o ser excluidos de las células durante las subsecuentes divisiones celulares. Los MN son considerados indicadores de genotoxicidad y de inestabilidad cromosómica. La inestabilidad cromosómica es una característica de los cánceres humanos y está asociada a un pobre pronóstico, a metástasis y a resistencia terapéutica (Bakhoum y Cantley, 2018). Se han observado MN en tumores sólidos, en neoplasias hematológicas o en linfocitos de sangre periférica de pacientes durante la evolución de un cáncer (Tijhuis *et al.*, 2019; Siri *et al.*, 2021).

A las 96 h, se observó un aumento de la proporción de MN en las células BN HeLa RAD21kd, alcanzando el mayor valor en aquellas tratadas con DNA-PKi/ETO. A su vez, el 70% de estos MN presentó focos γ H2AX,

resultado de fragmentos acéntricos y/o cromosomas dicéntricos. Las líneas celulares linfoblastoides humanas delecionadas en RAD21 exhibieron un aumento de MN y de puentes nucleoplásmicos luego de la exposición a radiación ionizante (Deardorff *et al.*, 2012). Un importante incremento de MN espontáneos se observó luego del silenciamiento de RAD21 en células epiteliales de cáncer colorectal HCT116 y en fibroblastos humanos inmortalizados hTERT (Leylek *et al.*, 2020). Por otro lado, nuestros resultados previos han señalado un significativo aumento de MN en presencia de DNA-PKi/ETO en células HeLa (Palmitelli *et al.*, 2015).

Yamauchi *et al.* (2011) indicaron que los cromosomas dicéntricos y las translocaciones cromosómicas surgen por una reparación inadecuada de las RDC y que ambas aberraciones ocurren por mecanismos idénticos. El análisis de las uniones de los puntos de ruptura (*breakpoints*) de las translocaciones cromosómicas en tumores humanos reveló características típicas (microhomologías, extensa resección terminal) de la intervención de alt-EJ en la formación de translocaciones (Deriano y Roth, 2013; Patterson-Fortin y D'Andrea, 2020).

En presencia de ETO, alt-EJ generó rearrreglos cromosómicos y MN, eventos asociados con el fenotipo de inestabilidad cromosómica, la transformación celular y el posible inicio de un proceso tumorigénico. En base a esto, y a la reducción de cromosomas dicéntricos observada en células deficientes en PARP-1, la vía alt-EJ podría constituirse en un blanco terapéutico promisorio para evitar la aparición de leucemias secundarias en los pacientes tratados con ETO.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) PIP 0114/14, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) PICT 2015-3049 y Fundación A. J. Roemmers 2017.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar un especial agradecimiento a Mariana Gómez por su contribución en la compaginación de las figuras correspondientes al presente artículo.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Jacqueline Kramar (JK), Micaela Palmitelli (MP), Marcelo de Campos-Nebel (MCN), Marcela González-Cid (MGC) contribuyeron con la concepción y el diseño del estudio.

JK, MP, MCN y MGC prepararon el material y realizaron los diferentes experimentos (cultivos celulares, tratamientos químicos, técnicas empleadas para la observación en microscopio óptico o fluorescente, análisis mediante el citómetro de flujo e inmunomarcaciones); así mismo, participaron en la obtención de los resultados y su posterior análisis. Todos los autores contribuyeron en la elaboración del manuscrito, y leyeron y aprobaron la versión final. Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

BIBLIOGRAFÍA

- Atienza J.M., Roth R.B., Rosette C., Smylie K.J., Kammerer S., Rehbock J., Ekblom J., Radenisko M.F. (2005) Suppression of RAD21 gene expression decreases cell growth and enhances cytotoxicity of etoposide and bleomycin in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 4: 361-368.
- Bakhom S.F., Cantley L.C. (2018) The multifaceted role of chromosomal instability in cancer and its microenvironment. *Cell* 174: 1347-1360.
- Baldwin E.L., Osheroff N. (2005) Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5: 363-372.
- Ceccaldi R., Rondinelli B., D'Andrea A.D. (2016) Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol.* 26: 52-64.
- Chen T., Sun Y., Ji P., Kopetz S., Zhang W. (2015) Topoisomerase IIa in chromosome instability and personalized cancer therapy. *Oncogene* 34: 4019-4031.
- Cheng H., Zhanga N., Patia D. (2020) Cohesin subunit RAD21: From biology to disease. *Gene* 758: 144966
- Chondrou V., Trochoutsou K., Panayides A., Efthimiou M., Stephanou G., Demopoulos N.A. (2018) Combined study on clastogenic, aneugenic and apoptotic properties of doxorubicin in human cells in vitro. *J. Biol. Res. (Thessalon)* 25 (1): 1-13.
- Deardorff M.A., Wilde J.J., Albrecht M., Dickinson E., Tennstedt S., Braunholz D., Mönnich M., Yan Y., Xu W., Gil-Rodríguez M.C., Clark D., Hakonarson H., Halbach S., Michelis L.D., Rampuria A., Rossier E., Spranger S., Van Maldergem L., Lynch S.A., Gillesen-Kaesbach G., Lüdecke H.J., Ramsay R.G., McKay M.J., Krantz I.D., Xu H., Horsfield J.A., Kaiser F.J. (2012) RAD21 mutations cause a human cohesinopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 90: 1014-1027.
- de Campos-Nebel M., Larripa I., González-Cid M. (2010) Topoisomerase II-mediated DNA damage is differently repaired during the cell cycle by nonhomologous end joining and homologous recombination. *PLoS One* 5 (9): e12541.
- Deckbar D., Birraux J., Krempler A., Tchouandong L., Beucher A., Walker S., Stiff T., Jeggo P., Löbrich M. (2007) Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J. Cell Biol.* 176: 749-755.
- Del Nagro C.J., Choi J., Xiao Y., Rangell L., Mohan S., Pandita A., Zha J., Jackson P.K., O'Brien T. (2014) Chk1 inhibition in p53-deficient cell lines drives rapid chromosome fragmentation followed by caspase-independent cell death. *Cell Cycle* 13: 303-314.
- Deriano L., Roth D.B. (2013) Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu. Rev. Genet.* 47: 433-455.
- De Vos M., Schreiber V., Dantzer F. (2012) The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem. Pharmacol.* 84: 137-146.
- Dong J., Ren Y., Zhang T., Wang Z., Ling C.C., Li G.C., He F., Wang C., Wen B. (2018) Inactivation of DNA-PK by knockdown DNA-PKcs or NU7441 impairs non-homologous end-joining of radiation-induced double strand break repair. *Oncol. Rep.* 39: 912-920.
- GeLOT C., Guirouilh-Barbat J., Le Guen T., Dardillac E., Chailleux C., Canitrot Y., Lopez B.S. (2016) The cohesin complex prevents the end joining of distant DNA double-strand ends. *Mol. Cell* 61: 15-26.
- Gisselsson D., Louise Pettersson L., Höglund M., Heidenblad M., Gorunova L., Wiegant J., Mertens F., Dal Cin P., Mitelman F., Nils Mandahl N. (2000) Chromosomal breakage-fusion-bridge events cause genetic intratumor heterogeneity. *PNAS* 97: 5357-5362.
- Gunn A., Bennardo N., Cheng A., Stark J.M. (2011) Correct end use during end joining of multiple chromosomal double strand breaks is influenced by repair protein RAD50, DNA-dependent Protein Kinase DNA-PKcs, and transcription context. *J. Biol. Chem.* 286: 42470-42482.
- Heidinger-Pauli J.M., Unal E., Koshland D. (2009) Distinct targets of the Eco1 acetyltransferase modulate cohesion in S phase and in response to DNA damage. *Mol. Cell* 34: 311-321.
- Iliakis G., Murmann T., Soni A. (2015) Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 793: 166-175.
- Kopa P., Macieja A., Galita G., Witczak Z.J., Poplawski T. (2019) DNA double strand breaks repair inhibitors: Relevance as potential new anticancer therapeutics. *Curr. Med. Chem.* 26: 1483-1493.
- Leyk T.R., Jeusset L.M., Lichtensztejn Z., McManus K.J. (2020) Reduced expression of genes regulating cohesion induces chromosome instability that may promote cancer and impact patient outcomes. *Sci. Rep.* 10: 592.
- Litwin I., Pilarczyk E., Wysocki R. (2018) The emerging role of cohesin in the DNA damage response. *Genes* 9 (12): 581.
- McKie S.J., Neuman K.C., Maxwell A. (2021) DNA topoisomerases: Advances in understanding of cellular roles and multi-protein complexes via structure-function analysis. *BioEssays* 43: 2000286.
- Mladenov E., Magin S., Soni A., Iliakis G. (2016) DNA double-strand-break repair in higher eukaryotes and its role in genomic instability and cancer: Cell cycle and proliferation-dependent regulation. *Semin. Cancer Biol.* 37-38: 51-64.
- Mohiuddin I.S., Kang M.H. (2019) DNA-PK as an emerging therapeutic target in cancer. *Front. Oncol.* 9: 635.
- Montecucco A., Zanetta F., Biamonti G. (2015) Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J.* 14: 95-108.
- Obe G., Durante M. (2010) DNA double strand breaks and chromosomal aberrations. *Cytogenet. Genome Res.* 128: 8-16.
- Palmitelli M., de Campos-Nebel M., González-Cid M. (2015) Progression of chromosomal damage induced by etoposide in G2 phase in a DNA-PKcs deficient context. *Chromosome Res.* 23: 719-732.
- Patterson-Fortin J., D'Andrea A.D. (2020) Exploiting the microhomology-mediated end-joining pathway in cancer therapy. *Cancer Res.* 80: 4593-4600.
- Peters J.-M., Tedeschi A., Schmitz J. (2008) The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev.* 22: 3089-3114.
- Pfaffl M.W. (2004) Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin S. A. (Ed.) A-Z of quantitative PCR. International University Line, La Jolla, CA pp. 87-112.
- Pierce A.J., Stark J.M., Araujo F.D., Moynahan M.E., Berwick M., Jasin M. (2001) Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* 11: S52-S59.
- Potts P.R., Porteus M.H., Yu H. (2006) Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks. *EMBO J.* 25: 3377-3388.
- Ranjha L., Howard S.M., Cejka P. (2018) Main

- steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma* 127: 187-214.
- Ricoul M., Gnana Sekaran T.S., Brochard P., Herate C., Sabatier L. (2019) γ -H2AX foci persistence at chromosome break suggests slow and faithful repair phases restoring chromosome integrity. *Cancers* 11: 1397.
- Roukos V., Misteli T. (2014) The biogenesis of chromosome translocations. *Nat. Cell Biol.* 16: 293-300.
- Sallmyr A., Tomkinson A.E. (2018) Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *J. Biol. Chem.* 293: 10536-10546.
- Scully R., Panday A., Elango R., Willis N. A. (2019) DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20: 698-714.
- Siri S.O., Martino J., Gottifredi V. (2021) Structural chromosome instability: Types, origins, consequences, and therapeutic opportunities. *Cancers* 13: 3056.
- Sonoda E., Sasaki M.S., Morrison C., Yamaguchi-Iwai Y., Takata M., Takeda S. (1999) Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol. Cell Biol.* 19: 5166-5169.
- Takahashi A., Ohnishi T. (2005) Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett.* 229: 171-179.
- Tijhuis A.E., Johnson S.C., McClelland S.E. (2019) The emerging links between chromosomal instability (CIN), metastasis, inflammation and tumour immunity. *Mol. Cytogenet.* 12: 17.
- Visconti R., Della Monica R., Grieco D. (2016) Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35: 153.
- Vítor A.C., Huertas P., Legube G., de Almeida S.F. (2020) Studying DNA double-strand break repair: An ever-growing toolbox. *Front. Mol. Biosci.* 7: 24.
- Wang H., Xu X. (2017) Microhomology-mediated end joining: new players join the team. *Cell Biosci.* 7: 6.
- Watrin E., Peters J.M. (2006) The cohesin complex is required for the DNA damage-induced G2/M checkpoint in mammalian cells. *The EMBO J.* 28: 2625-2635.
- Willmore E., de Caux S., Sunter N.J., Tilby M.J., Jackson G.H., Austin C.A., Durkacz B.W. (2004) A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* 103: 4659-4665.
- Xu H., Balakrishnan K., Malaterre J., Beasley M., Yan Y., Essers J., Appeldoorn E., Thomaszewski J.M., Vazquez M., Verschoor S., Lavin M.F., Bertonchello I., Ramsay R.G., McKay M.J. (2010) Rad21-cohesin haploinsufficiency impedes DNA repair and enhances gastrointestinal radiosensitivity in mice. *PLoS One* 5: e12112.
- Xu H., Yan M., Patra J., Natrajan R., Yan Y., Swagemakers S., Tomaszewski J.M., Verschoor S., Millar E.K., van der Spek P., Reis-Filho J.S., Ramsay R.G., O'Toole S.A., McNeil C.M., Sutherland R.L., McKay M.J., Fox S.B. (2011) Enhanced RAD21 cohesin expression confers poor prognosis and resistance to chemotherapy in high grade luminal, basal and HER2 breast cancers. *Breast Cancer Res.* 13: R9.
- Yamauchi M., Suzuki K., Oka Y., Suzuki M., Kondo H., Yamashita S. (2011) Mode of ATM-dependent suppression of chromosome translocation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 416: 111-118.
- Zhang W., Gou P., Dupret J.-M., Chomienne C., Rodrigues-Lima F. (2021) Etoposide, an anticancer drug involved in therapy-related secondary leukemia: Enzymes at play. *Transl. Oncol.* 14: 101169.

PRENATALLY DIAGNOSED PARTIAL TRISOMY 3Q22.2→3QTER, PARTIAL MONOSOMY 11Q25→11QTER AND INTERSTITIAL DELETION 10Q25.1-10Q25.2: A CASE REPORT AND REVIEW OF LITERATURE



DIAGNÓSTICO PRENATAL DE TRISOMÍA PARCIAL 3Q22.2→3QTER, MONOSOMÍA PARCIAL 11Q25→11QTER Y DELECIÓN INTERSTICIAL 10Q25.1-10Q25.2: REPORTE DE UN CASO Y REVISIÓN DE LA LITERATURA

Della Vedova M.C.^{1,2}, Gancia M.D.¹, Mendoza G.V.^{1,2}, Barrasa N.F.³, Bravo R.³, Losada D.³, Siewert S.¹, Marsá S.M.^{2*}

ABSTRACT

A 19-year-old pregnant woman was admitted to our ultrasound department at 20.4 weeks of gestation. Prenatal sonography identified a fetus with trigonocephaly, an omphalocele protruding out of the abdominal wall, on the right side of the umbilical cord, that contained the liver and bowel, claw hand and bot foot. Amniocentesis revealed an unbalanced chromosome constitution 46,XX,der(11)t(3,11)(q22.2,q24.3) resulting in a deletion of 11q24.3 to 11qter and a duplication of 3q22.2 to 3qter product of a “de novo imbalanced translocation”; the parents’ karyotypes were normal. The chromosome microarray results for the proband revealed a 63.07 Mb duplication in the chromosome 3 located at 3q22.2 to terminal 3q29; a 4.08 Mb deletion in the chromosome 11 located at 11q25, and a 5.66 Mb loss in the chromosome 10 located at 10q25.1 to 10q25.2. To the best of our knowledge, this is the first report of this combination of chromosomal abnormalities.

Key words: amniocentesis, chromosome microarray, deletion 10q, deletion 11q, duplication 3q.

RESUMEN

Una embarazada de 19 años ingresó en nuestro servicio de ultrasonido a las 20,4 semanas de gestación. La ecografía prenatal identificó un feto con trigonocefalia, un onfalocele que sobresalía de la pared abdominal, en el lado derecho del cordón umbilical, que contenía el hígado y el intestino, una mano en garra y un pie bot. La amniocentesis reveló una constitución cromosómica desequilibrada 46,XX,der(11)t(3,11)(q22.2,q24.3) que resultó en una deleción de 11q24.3 a 11qter y una duplicación de 3q22.2 a 3qter producto de una “translocación desequilibrada de novo”; los cariotipos de los padres eran normales. Los resultados del microarreglo cromosómico para el probando revelaron una duplicación de 63,07 Mb en el cromosoma 3 ubicado en 3q22.2 a terminal 3q29; una deleción de 4,08 Mb en el cromosoma 11 ubicado en 11q25 y una pérdida de 5,66 Mb en el cromosoma 10 ubicado en 10q25.1 a 10q25.2. Hasta donde sabemos, este es el primer informe de esta combinación de anomalías cromosómicas.

Palabras clave: amniocentesis, *microarray* cromosómico, deleción 10q, deleción 11q, duplicación 3q.

¹National University of San Luis, San Luis, Argentina.

²Private Laboratory of Genetics –Genes, San Luis, Argentina.

³GALO SRL. Sonographic images, San Luis, Argentina

Corresponding author:
Silvana Mariel Marsá
smarsa@gmail.com

 ORCID 0000-0001-6835-3441

Cite this article as:

Della Vedova M.C., Gancia M.D., Mendoza G.V., Barrasa N.F., Bravo R., Losada D., Siewert S., Marsá S.M. 2023. PRENATALLY DIAGNOSED PARTIAL TRISOMY 3Q22.2→3QTER, PARTIAL MONOSOMY 11Q25→11QTER AND INTERSTITIAL DELETION. 10Q25.1-10Q25.2: A CASE REPORT AND REVIEW OF LITERATURE. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXIV (2): 25-32.

Received: 04/06/2023

Accepted: 10/10/2023

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2023.34.02.02

ISSN online version: 1852-6233

INTRODUCTION

Trisomy 3q is a very rarely reported chromosomal disorder. In most cases, a duplication of the segment 3q21-qter is included; these duplications being the result of unbalanced segregations of balanced parental translocations involving chromosome 3 (Chen, 2007). Duplication of part of the long arm of the human chromosome 3 causes a distinct and severe syndrome that leads to multiple congenital abnormalities such as growth delay, dysmorphic facial features, microcephaly, intellectual disability, heart defects and structural brain anomalies.

Partial monosomy of the long arm of chromosome 10 is an uncommon chromosomal abnormality accompanied by microcephaly, characteristic facial features and mental retardation. Some cases of this chromosomal defect have been reported to occur with other chromosomal abnormalities (Shapiro *et al.*, 1985; Tsukuda *et al.*, 1996).

Deletions of terminal 11q region are found in individuals with Jacobsen syndrome -JBS- (Sheth *et al.*, 2014). The phenotype may vary with deletion size but the most common features include mild-to-moderate intellectual disability, speech delay, psychomotor delay, congenital heart disease, trigonocephaly, thrombocytopenia, and characteristic facial features.

A 19-year-old pregnant woman was admitted to the ultrasound department in San Luis, Argentina, for pregnancy follow-up. The unborn baby was the firstborn of a non-consanguineous and healthy couple. In the fetal karyotype, an unbalanced translocation between the long arm of chromosomes 3 and 11 was observed, leading to partial monosomy of the long arm of chromosome 11 (11q24.3-11qter); partial trisomy of the long arm of chromosome 3 (3q22.2-3qter) as a result of a “de novo” unbalanced translocation, and interstitial deletion in the long arm of chromosome 10 (10q25.1-10q25.2); parental chromosomes were normal. In the literature, no report of this combination of chromosomal abnormalities was found. The aim of our study was to compare the conventional karyotype with the molecular karyotype at the time of diagnosis, in cases of abnormalities interpreted by classical cytogenetics.

Case report

The present study was carried out in accordance with the guidelines of the Helsinki Declaration. The protocol for the present study was approved by the local Institutional Review Board and written informed consent was obtained from the proband's parents to be enrolled.

MATERIALS AND METHODS

Chromosome preparation and conventional karyotyping

The fetal karyotyping study was performed from amniotic fluid using cell culture with Amnio Max Medium (Gibco, Gaithersburg, MD USA). The cells were incubated for 15 days at 37° C in a humid atmosphere with 5% CO₂, and then treated with colchicine (Aldrich-Sigma, St. Louis, MO, USA). To further identify the chromosomal anomalies, blood from the proband's parents was obtained for karyotyping. Peripheral mononuclear cells were cultured for 72 h at 37° C in RPMI medium 1640 (Gibco, Gaithersburg, MD USA) and stimulated with phytohemagglutinin (Solarbio, Beijing, China) containing fetal bovine serum (Gibco) and then treated with colchicine (Aldrich-Sigma, St. Louis, MO, USA). The ISCN2020 nomenclature was used to describe the karyotype (McGowan-Jordan *et al.*, 2020). Cytogenetic analysis was performed on GTG-banded metaphases from the patients at a resolution of 450 bands according to standard lab protocol. For each patient, the numbers of chromosomes in 30 metaphase mitotic figures were counted and the karyotypes of twenty cells in mitotic metaphase were analyzed by optical microscopy (ZEISS, Germany).

Chromosome microarray

Chromosome microarray was performed in accordance with the manufacturer's protocol. The procedure included genomic DNA extraction, digestion and ligation, PCR amplification, PCR product purification, quantification and fragmentation, labeling, array hybridization, washing and scanning. The array was designed specifically for cytogenetic research to detect the gain or loss of DNA copies associated with chromosomal imbalances. It allows the detection of aneuploidies, deletions and duplications of the loci represented in the microarray. It does not detect balanced alterations (reciprocal translocations, Robertsonian translocations, inversions and balanced insertions) or imbalances of regions not represented in the microarray. Thresholds for genome-wide screening were set at ≥100 kb for gains and ≥50 kb for losses. The platform used was Agilent 180K CGH + SNP.

The detected copy number gains or losses were systematically evaluated for clinical significance by comparing them with values reported in the scientific literature and the following databases: i) Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>), ii) DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk/>), iii) ISCA (<https://www.iscaconsortium.org/>), iv) ECARUCA (<http://www.ecaruca.net>), v) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM; <http://www.ncbi.nlm.nih>).

gov/omim) and vi) Clinical Genome Resource (<https://www.clinicalgenome.org/>).

RESULTS

There was no positive family history. Prenatal sonography at 20.4 weeks revealed trigonocephaly with apparently normal brain structures (Figure 1a), omphalocele protruding out of the abdominal wall on the right side of the umbilical cord that contained the liver and bowel (Figure 1b), claw hand, a condition that causes the fingers to curve in a sustained manner (Figure 1c), and an inwards and downwards deviation of the axis of the foot with respect to the leg, defect known as bot or equinovarus foot (Figure 1d). Counseling was given and amniocentesis was performed after written informed consent form had been obtained.

The results of the cytogenetic examination were shown by chromosome G-banding and karyotype analysis. The

fetus presented an unbalanced translocation between the long arm of chromosome 3 and the long arm of chromosome 11, leading to partial monosomy of the long arm of chromosome 11 (11q24.3-11qter) and partial trisomy of the long arm of chromosome 3 (3q22.2-3qter): 46,XX,der(11)t(3,11)(q22.2, q24.3) (Figure 2). The parent's karyotypes were normal; therefore, it was a "de novo" translocation.

Chromosome microarray analysis using a whole genome oligonucleotide array detected three abnormalities in the DNA of this fetus (Figure 3A). Based on microarray analysis, the first abnormality is characterized by a 63.07 Mb copy gain from 3q22.2 through terminal 3q29 (134701427_197771082) (Figure 3B). The second copy change was a 4.08 Mb copy loss from terminal 11q25 (130850244_134928849) (Figure 3c) and the third copy change was a 5.66 Mb copy loss from 10q25.1 to 10q25.2 (107936097_113596588) (Figure 3d).



Figure 1. Ultrasonographic view of a) trigonocephaly, b) omphalocele, c) claw hand and d) bot or equinovarus foot.

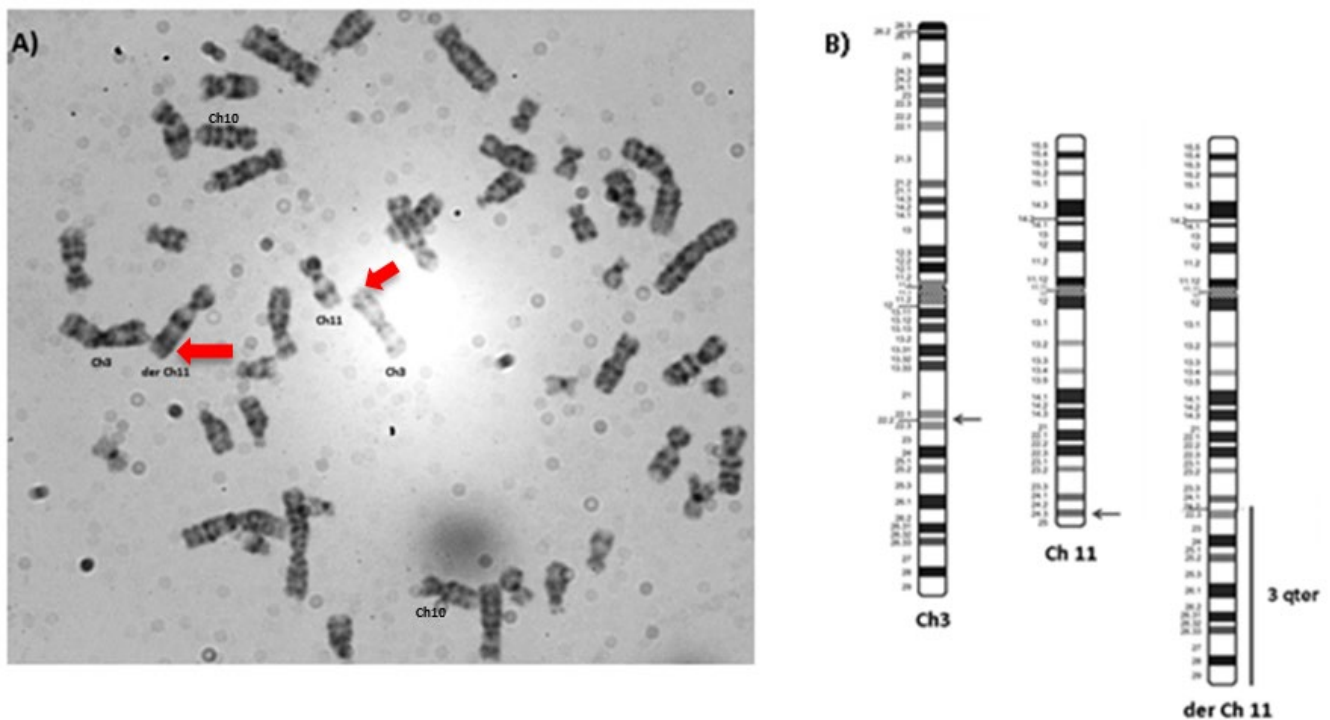


Figure 2. Unbalanced karyotype of the fetus, showing a) partial monosomy 11 and a partial trisomy 3: 46, XX, der (11)t (3,11) (q22.2, q24.3). b) Partial ideogram showing the derivative chromosome 11 resulting from a translocation between chromosomes 3 and 11, and leading to a partial monosomy of the long arm of chromosome 11 (11q24.3-11qter) and a partial trisomy of the long arm of chromosome 3 (3q22.2-3qter). Arrows indicate the breakpoints.

DISCUSSION

In the present case, we report a female fetus karyotype with an unbalanced chromosome resulting in a 11q24.3 to 11qter deletion and a 3q22.2 to 3qter duplication. No reports of this combination of chromosomal abnormalities were found in the literature.

Prenatal sonography revealed trigonocephaly with apparently normal brain structures, omphalocele protruding out of the abdominal wall, on the right side of the umbilical cord, that contained the liver and bowel, claw hand, and an inwards and downwards deviation of the axis of the foot with respect to the leg, defect known as bot or equinovarus foot.

The chromosome microarray results for the proband revealed three copy number changes. First, there is a large copy gain from the long arm of chromosome 3, from 3q22.2 through terminal 3q29. This copy gain is approximately 63.07 Mb in size and contains at least 496 genes which included 262 OMIM genes. Many of the reported 3q copy gains are associated with unbalanced translocations where the corresponding copy loss impacts the phenotype. Copy gains of 3q have been identified in individuals with growth delays, dysmorphic facial features, microcephaly, intellectual disability, heart defects, and structural brain anomalies (de Azevedo Moreira *et al.*, 2005; Grossmann *et al.*, 2009;

Dundar *et al.*, 2011; Abreu-González *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2013; Lurie, 2016; Dworschak *et al.*, 2017).

The present results not only underline the importance of trisomy 3q22.2→3qter but also uncover certain unprecedented clinical features which expand on the current knowledge of the clinical phenotypes of this trisomy syndrome. The limited number of relevant previous studies put a restriction on the clear delineation of the phenotype-karyotype correlation of trisomy 3q22.2→qter.

The second copy number change was a 4.08 Mb deletion of the terminal long arm of chromosome 11, which contains at least 23 genes, including 10 OMIM genes. Deletions of this terminal 11q region are found in individuals with JBS also known as terminal 11q deletion syndrome. JBS is a rare genetic disorder associated with multiple dysmorphic features and occurs in 1 in 100,000 live births with a female predominance of 2:1 (Jacobsen *et al.*, 1973; Penny *et al.*, 1995; Pivnick *et al.*, 1996; Grossfeld *et al.*, 2004). JBS occurs due to the loss of contiguous set of genes present at 11q23 with deletion size varying from 7 to 20 Mb but could be as small as 2.9 Mb in some cases (Penny *et al.*, 1995; Grossfeld *et al.*, 2004; Guerin *et al.*, 2012).

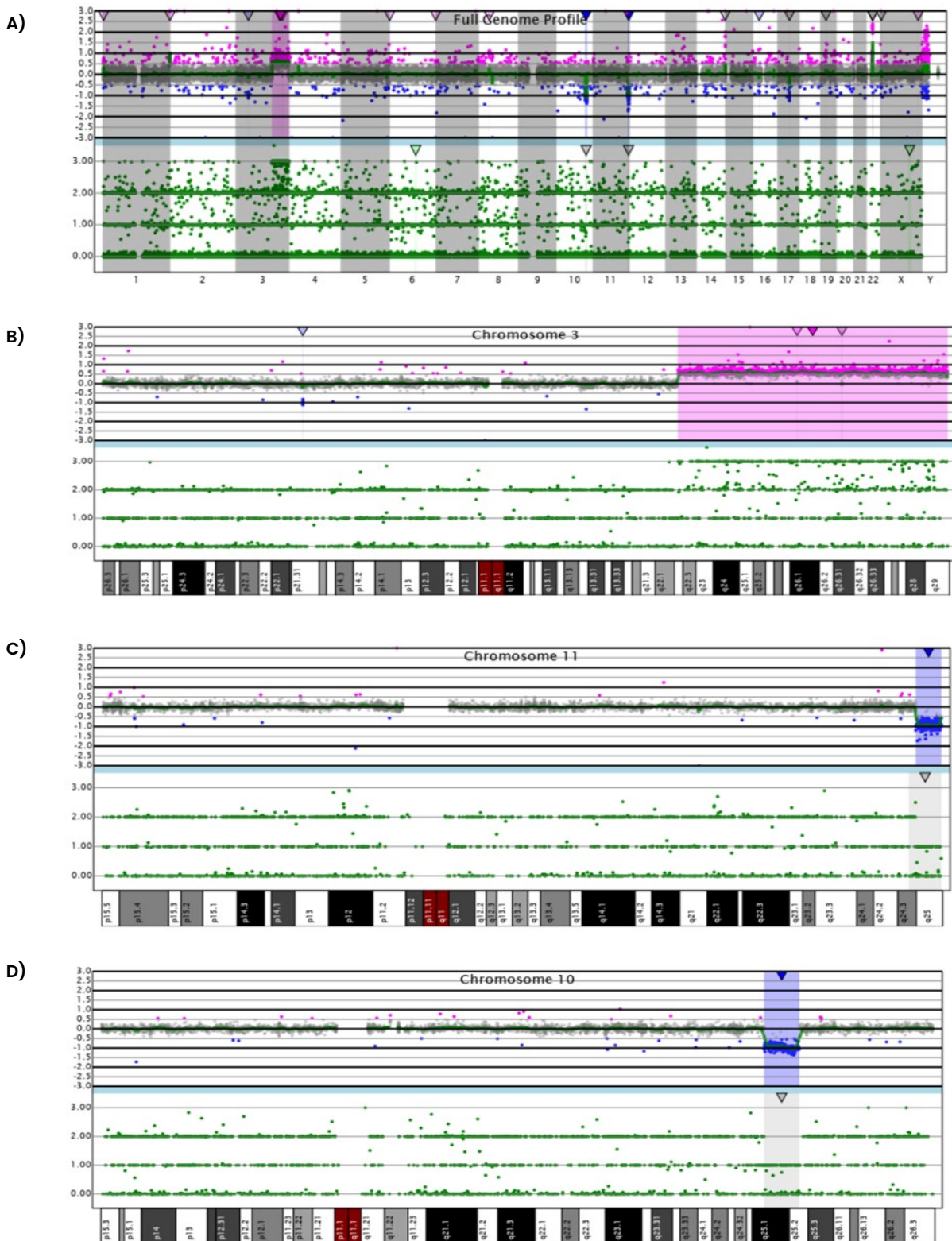


Figure 3. Chromosome microarray showing a) Wole genome data (copy number and SNP data), b) Copy gain from 3q22.2-3qter (associated with unbalanced translocation), c) Copy loss from 11q25-11qter (associated with unbalanced translocation), d) Interstitial 10q deletion. The whole genome plot shows, from chromosome 1 on the left to X/Y chromosomes on the right. Data for each chromosome is plotted from pter-→qter. For copy number analysis, the scale is log₁₀, with a normal copy number at zero. Copy losses have a log ratio of approximately -1.0 (a 1:2 ratio between patient and control), with gains of approximately 0.6 (a 3:2 ratio). In blue are shown the deleted regions and in pink the copy gains. The gray probes are normal and the green line shows the moving average of the copy number. Triangles at the top of the graph indicate abnormal regions. The SNP data shows three separate lines, at 0.00, 1.00, and 2.00, displaying the AA, AB, and BB genotypes. A gain of one genotype (due to a gain in copy number) will show data on a fourth line (the 3.00 line), whereas a loss of one genotype (due to a deletion) will show only one genotype, either one allele A or B.

A “de novo” deletion is observed in 85% of patients with JBS, and 15% cases arise as a result of parental translocations (Van Zutven *et al.*, 2009). The phenotype may vary with deletion size, but the most common features include mild-to-moderate intellectual disability, speech delay, psychomotor delay, congenital heart disease, trigonocephaly, thrombocytopenia and characteristic facial features. Occasionally, immunologic and hormonal problems may be present (Bernaciak *et al.*, 2008; Tyson *et al.*, 2008; Mattina *et al.*, 2009; Favier *et al.*, 2015). The implementation of array technology in the clinics has permitted precise characterization of the deletions and detailed genotype–phenotype correlation in cases with JBS.

The last copy number change is a 5.66 Mb deletion of interstitial 10q. There are at least 18 genes in this region including 12 OMIM genes. Partial deletion of the long arm of chromosome 10 is a relatively frequent cytogenetic finding. There are over 100 patients described in the literature (Wilkie *et al.*, 1993; Ogata *et al.*, 2000; Lukusa *et al.*, 2002; Irving *et al.*, 2003; Yatsenko *et al.*, 2009). Most cases of terminal 10q deletion have a breakpoint around 10q26 occurring either as “de novo” or as familial translocation with variable phenotypic features (Irving *et al.*, 2003).

The most striking phenotypic features in patients with the 10q terminal deletions include facial dysmorphism (microcephaly with prominent forehead, triangular face, down slanting palpebral fissures, coarse facial features, bilateral esotropia, epicanthic folds, synophrys, prominent nasal bridge, short philtrum, and small mouth), growth failure and developmental delay, intellectual disability, ophthalmoplegia, syndactyly, congenital cardiac, urinary and anogenital anomalies; however, there is significant heterogeneity in the clinical presentation (Lukusa *et al.*, 2002; Irving *et al.*, 2003; Yatsenko *et al.*, 2009). Cerebral nervous system anomalies such as agenesis of the corpus callosum are reported in partial monosomy 10q. In regard to the visceral anomalies, one third to half of the patients with the partial monosomy 10q syndrome have congenital heart disease such as ventricular septal defect, patent ductus arteriosus, pulmonary stenosis or a coarctation of the aorta (Tanabe *et al.*, 1999; Waggoner *et al.*, 1999).

Interstitial deletions of 10q region similar to the deletion identified in this fetus are relatively rare. Patients with overlapping deletions noted in the DECIPHER database have phenotypes which include developmental delays, behavior abnormalities and facial dysmorphisms. One of the genes in this 10q region is *SMC3*. Deletions and mutations of *SMC3* are found in individuals with Cornelia de Lange syndrome 3 characterized by dysmorphic facial features, intellectual disability, developmental delay, and occasionally limb

malformations (McCandless *et al.*, 2000; Kehrer-Sawatzki *et al.*, 2005; Deardorff *et al.*, 2007; Hillman *et al.*, 2013; Bragin *et al.*, 2014; Gil-Rodríguez *et al.*, 2015;).

The resolution of karyotype analysis in prenatal diagnosis has historically been considered sufficient to detect chromosomal abnormalities in the 5–10 Mb range. In our case, the 10q deletion was 5.66 Mb and had seemingly normal G-banding patterns (Figure 2). In prenatal diagnosis, microarray analysis can unambiguously detect chromosomal imbalances and has substantial advantages by overcoming the limitations of resolution and banding quality that are inherent in conventional karyotype analysis (Wapner *et al.*, 2012; Yatsenko *et al.*, 2013).

In summary, we described the prenatal diagnosis and molecular cytogenetic characterization of a “de novo” partial trisomy 3q22.2→3qter, partial monosomy 11q25→11qter and an interstitial deletion 10q25.1–10q25.2. We demonstrated the usefulness of chromosome microarray in the prenatal identification of a “de novo” chromosome aberration and that the information acquired by molecular cytogenetic analyses was very helpful in genetic counseling.

CONCLUSIONS

Concomitant partial trisomy 3q22.2→3qter, partial monosomy 11q25→11qter and interstitial deletion 10q25.1–10q25.2 is unusual in a clinical context. The coexistence of three copy number changes complicates the clinical symptoms and creates a chimeric disorder marked by characteristics of three chromosomal abnormalities. The use of chromosome microarray in prenatal diagnosis can elucidate the genetic etiology in fetuses with ultrasound abnormalities as well as enable proper genetic counseling management of prenatal care and informed decision making. The differences that can be observed in pre and postnatal phenotypes are important for counseling and further studies regarding phenotypic variability and genotype. Moreover, there is a distinct lack of genotype–phenotype correlation between individual microarray findings; thus, this case report should add useful information to the emerging atlas of chromosomal abnormalities associated with specific prenatal ultrasound findings.

BIBLIOGRAPHY

Abreu-González M., Garcia-Delgado C., Cervantes A., Aparicio-Onofre A., Guevara-Yanez R., Sanchez-Urbina R., Gallegos-Arreola M.P., *et al.* (2013) Clinical, Cytogenetic, and Biochemical Analyses of a Family with a t(3;13)(q26.2;p11.2): Further Delineation of 3q Duplication Syndrome. *Case Rep. Genet.* 2013; 895259.

- Bernaciak J., Szczaluba K., Derwinska K., Wisniowiecka-Kowalnik B., Bocian E., Sasiadek M.M., Makowska I., Stankiewicz P., Smigiel R. (2008) Clinical and Molecular-Cytogenetic Evaluation of a Family with Partial Jacobsen Syndrome without Thrombocytopenia Caused by an Approximately 5 Mb Deletion Del(11)(q24.3). *Am. J. Med. Genet. A*, 146(19): 2449-2454.
- Bragin E., Chatzimichali E.A., Wright C.F., Hurles M.E., Firth H.V., Bevan A.P., Swaminathan G.J. (2014) Decipher: Database for the Interpretation of Phenotype-Linked Plausibly Pathogenic Sequence and Copy-Number Variation. *Nucleic Acids Res.* 42(D1): D993-D1000.
- Chen C.P. (2007) Chromosomal Abnormalities Associated with Omphalocele. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 46(1): 1-8.
- Chen C.P., Lin C.J., Chen Y.Y., Wang L.K., Chern S.R., Wu P.S., Su J.W., *et al.* (2013) 3q26.31-q29 Duplication and 9q34.3 Microdeletion Associated with Omphalocele, Ventricular Septal Defect, Abnormal First-Trimester Maternal Serum Screening and Increased Nuchal Translucency: Prenatal Diagnosis and ACGH Characterization. *Gene*, 532(1): 80-86.
- de Azevedo Moreira L.M., Neri F.B., de Quadros Uzeda S., de Carvalho A.F., Santana G.C., Souza F.R., Rollemberg J.C. (2005) Multiple Congenital Malformations Including Severe Eye Anomalies and Abnormal Cerebellar Development with Dandy-Walker Malformation in a Girl with Partial Trisomy 3q. *Ophthalmic Genet.* 26(1): 37-43.
- Deardorff M.A., Kaur M., Yaeger D., Rampuria A., Korolev S., Pie J., Gil-Rodriguez C., *et al.* (2007) Mutations in Cohesin Complex Members Smc3 and Smc1a Cause a Mild Variant of Cornelia De Lange Syndrome with Predominant Mental Retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 80(3): 485-494.
- Dundar M., Uzak A., Erdogan M., Saatci C., Akdeniz S., Luleci G., Keser I., Karauzum S. (2011) Partial Trisomy 3q in a Child with Sacrococcygeal Teratoma and Cornelia De Lange Syndrome Phenotype. *Genet. Couns.* 22(2): 199-205.
- Dworschak G.C., Cretolle C., Hilger A., Engels H., Korsch E., Reutter H., Ludwig M. (2017) Comprehensive Review of the Duplication 3q Syndrome and Report of a Patient with Currarino Syndrome and De Novo Duplication 3q26.32-q27.2. *Clin. Genet.* 91(5): 661-671.
- Favier R., Akshoomoff N., Mattson S., Grossfeld P. (2015) Jacobsen Syndrome: Advances in Our Knowledge of Phenotype and Genotype. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 169(3): 239-250.
- Gil-Rodriguez M.C., Deardorff M.A., Ansari M., Tan C.A., Parenti I., Baquero-Montoya C., Ousager L.B., *et al.* (2015) De Novo Heterozygous Mutations in Smc3 Cause a Range of Cornelia De Lange Syndrome-Overlapping Phenotypes. *Hum. Mutat.* 36(4): 454-462.
- Grossfeld P.D., Mattina T., Lai Z., Favier R., Jones K.L., Cotter F., Jones C. (2004) The 11q Terminal Deletion Disorder: A Prospective Study of 110 Cases. *Am. J. Med. Genet. A*, 129(1): 51-61.
- Grossmann V., Muller D., Muller W., Fresser F., Erdel M., Janecke A.R., Zschocke J., Utermann G., Kotzot D. (2009) "Essentially" Pure Trisomy 3q27 --> Qter: Further Delineation of the Partial Trisomy 3q Phenotype. *Am. J. Med. Genet. A*, 149(11): 2522-2526.
- Guerin A., Stavropoulos D.J., Diab Y., Chenier S., Christensen H., Kahr W.H., Babul-Hirji R., Chitayat D. (2012) Interstitial Deletion of 11q-Implicating the Kirrel3 Gene in the Neurocognitive Delay Associated with Jacobsen Syndrome. *Am. J. Med. Genet. A*, 158(10): 2551-2556.
- Hillman S.C., McMullan D.J., Hall G., Togneri F.S., James N., Maher E.J., Meller C. H., *et al.* (2013) Use of Prenatal Chromosomal Microarray: Prospective Cohort Study and Systematic Review and Meta-Analysis. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 41(6): 610-620.
- Irving M., Hanson H., Turnpenny P., Brewer C., Ogilvie C.M., Davies A., Berg J. (2003) Deletion of the Distal Long Arm of Chromosome 10; Is There a Characteristic Phenotype? A Report of 15 De Novo and Familial Cases. *Am. J. Med. Genet. A*, 123(2): 153-163.
- Jacobsen P., Hauge M., Henningsen K., Hobolth N., Mikkelsen M., Philip J. (1973) An (11;21) Translocation in Four Generations with Chromosome 11 Abnormalities in the Offspring. A Clinical, Cytogenetical, and Gene Marker Study. *Hum. Hered.* 23(6): 568-585.
- Kehrer-Sawatzki H., Daumiller E., Muller-Navia J., Kendziorra H., Rossier E., du Bois G., Barbi G. (2005) Interstitial Deletion Del(10)(q25.2q25.3 Approximately 26.11)--Case Report and Review of the Literature. *Prenat. Diagn.* 25(10): 954-959.
- Lukusa T., Smeets E., Vermeesch J.R., Fryns J.P. (2002) Small Terminal 10q26 Deletion in a Male Patient with Noonan-Like Stigmata: Diagnosis by Cytogenetic and Fish Analysis. *Genet. Couns.* 13(4): 417-425.
- Lurie I. (2016) Distal Trisomy 3q as a Risk Factor for Neural Tube Defects. *Taiwan J. Obstet. Gynecol.* 55(5): 769-770.
- Mattina T., Perrotta C.S., Grossfeld P. (2009) Jacobsen Syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* 4: 1-10.
- McCandless S.E., Schwartz S., Morrison S., Garlapati K., Robin N.H. (2000) Adult with an Interstitial Deletion of Chromosome 10 [Del(10)(q25.1q25.3)]: Overlap with Coffin-Lowry Syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 95(2): 93-98.
- McGowan-Jordan J., Hastings R.J., Moore S. (2020) *ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature*. Basel: S. Karger; 2020. <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-06867-2>
- Ogata T., Muroya K., Sasagawa I., Kosho T., Wakui K., Sakazume S., Ito K., *et al.* (2000) Genetic Evidence for a Novel Gene(S) Involved in Urogenital Development on 10q26. *Kidney Int.* 58(6): 2281-2290.
- Penny L.A., Dell'Aquila M., Jones M.C., Bergoffen J., Cunniff C., Fryns J.P., Grace E., *et al.* (1995) Clinical and Molecular Characterization of Patients with Distal 11q Deletions. *Am. J. Hum. Genet.* 56(3): 676-683.
- Pivnick E.K., Velagaleti G.V., Wilroy R.S., Smith M.E., Rose S.R., Tipton R.E., Tharapel A.T. (1996) Jacobsen Syndrome: Report of a Patient with Severe Eye Anomalies, Growth Hormone Deficiency, and Hypothyroidism Associated with Deletion 11 (q23q25) and Review of 52 Cases. *J. Med. Genet.* 33(9): 772-778.
- Shapiro S.D., Hansen K.L., Pasztor L.M., DiLiberti J.H., Jorgenson R.J., Young R.S., Moore C.M. (1985) Deletions of the Long Arm of Chromosome 10. *Am. J. Med. Genet.* 20(1): 181-96.
- Sheth F.J., Datar C., Andrieux J., Pandit A., Nayak D., Rahman M., Sheth J.J. (2014) Distal Deletion of Chromosome 11q Encompassing Jacobsen Syndrome without Platelet Abnormality. *Clin. Med. Insights Pediatr.* 8: CMPed.S18121.
- Tanabe S., Akiba T., Katoh M., Satoh T. (1999) Terminal Deletion of Chromosome 10q: Clinical Features and Literature Review. *Pediatr. Int.* 41(5): 565-567.
- Tsukuda T., Nagata I., Sawada H., Murakami J., Hanaki K., Urashima H., Kaneda T., *et al.* (1996) Partial Monosomy 10q and Partial Trisomy 9q with Anal Atresia Due to Maternal Translocation: t(9;10)(q32;q26). *Clin. Genet.* 50(4): 220-222.
- Tyson C., Qiao Y., Harvard C., Liu X., Bernier F.P., McGillivray B., Farrell S.A., *et al.* (2008) Submicroscopic Deletions of 11q24-25 in Individuals without Jacobsen Syndrome: Re-Examination of the Critical Region by High-Resolution Array-Cgh. *Mol. Cytogenet.* 1: 1-9.
- Van Zutven L.J., van Bever Y., Van Nieuwland C.C., Huijbregts G.C., Van Opstal D., von Bergh A.R., Corel L.J., *et al.* (2009) Interstitial 11q Deletion Derived from a Maternal Ins(4;11)(p14;q24.2q25): A Patient Report and Review. *Am. J. Med. Genet. A*, 149(7): 1468-1475.
- Waggoner D.J., Chow C.K., Dowton S.B., Watson M.S. (1999) Partial Monosomy of Distal 10q: Three New Cases and a Review. *Am. J. Med. Genet.* 86(1): 1-5.
- Wapner R.J., Martin C.L., Levy B., Ballif B.C.,

- Eng C.M., Zachary J.M., Savage M., *et al.* (2012) Chromosomal Microarray Versus Karyotyping for Prenatal Diagnosis. *N. Engl. J. Med.* 367(23): 2175-2184.
- Wilkie A.O., Campbell F.M., Daubeney P., Grant D.B., Daniels R.J., Mullarkey M., Affara N.A., Fitchett M., Huson S.M. (1993) Complete and Partial Xy Sex Reversal Associated with Terminal Deletion of 10q: Report of 2 Cases and Literature Review. *Am. J. Med. Genet.* 46(5): 597-600.
- Yatsenko S.A., Davis S., Hendrix N. W., Surti U., Emery S., Canavan T., Speer P., *et al.* (2013) Application of Chromosomal Microarray in the Evaluation of Abnormal Prenatal Findings. *Clin. Genet.* 84(1): 47-54.
- Yatsenko S.A., Kruer M.C., Bader P.I., Corzo D., Schuette J., Keegan C.E., Nowakowska B., *et al.* (2009) Identification of Critical Regions for Clinical Features of Distal 10q Deletion Syndrome. *Clin. Genet.* 76(1): 54-62.
- Zhu H., Hu Y., Zhu R., Yang Y., Zhu X., Wang W. (2013) A Boy with Partial Trisomy of Chromosome 3q24-Q28 from Paternal Balanced Insertion and Multiple Congenital Anomalies. *Am. J. Med. Genet. A* 161(2): 327-330.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the propositus family for their support of this study.

FUNDING STATEMENT

Private Laboratory of Genetics
-Genes.5700, San Luis, Argentina;
GALOS SRL, 5700, San Luis,
Argentina

—

MICROSOMÍA CRANEOFACIAL, UN RECuento ACTUALIZADO



CRANEOFACIAL MICROSOMIA, AN UPDATED REVIEW

Valencia-Pérez A.^{1,*}, Quintero-Orozco M.¹

¹Pontificia Universidad Javeriana Cali,
Cali, Colombia

Corresponding author:
Alexandra Valencia Pérez.
alexandravp@javerianacali.edu.co

 ORCID 0000-0002-5900-0633

Cite this article as:

Valencia-Pérez A, Quintero-Orozco M. 2023. CRANEOFACIAL MICROSOMIA, AN UPDATED REVIEW. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXIV (2): 33-40.

Received: 05/07/2023

Revised version received: 11/18/2023

Accepted: 12/05/2023

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2023.34.02.03

ISSN online version: 1852-6233

ABSTRACT

La microsomía craneofacial (CFM) es una malformación congénita compleja que afecta aproximadamente a uno de cada 5.000 nacidos vivos. En 1881, la CFM fue descrita por primera vez por Carl Ferdinand Von Arlt. A lo largo de la historia, han surgido términos sinónimos que han descrito esta malformación dentro del gran espectro clínico que abarca. El eje central de la fisiopatología es la alteración del desarrollo embrionario de las estructuras craneofaciales derivadas del primer y segundo arco faríngeos. El desarrollo del oído y la mandíbula se ve afectado por factores no genéticos y genéticos, los cuales son: variantes de los factores de transcripción implicados en la migración y el patrón de las células de la cresta neural, modificadores de la cromatina, factores de crecimiento y sus receptores, complejos de pre-replicación de ADN, ensamblaje de ribosomas y el spliceosoma. Aunque actualmente existe una mejor comprensión de la fisiopatología de esta entidad, aún es necesario continuar con investigaciones más específicas sobre los factores etiológicos relacionados. El objetivo de esta revisión es realizar un recuento de los factores genéticos más relevantes relacionados con la microsomía craneofacial reportados en los últimos 10 años.

Key words: arco faríngeo, CFM, factores genéticos, microsomía craneofacial, microsomía hemifacial.

RESUMEN

Craniofacial microsomnia (CFM) is a complex congenital condition that affects approximately one in 5,000 live births. It was initially described by Carl Ferdinand Von Arlt in 1881, and over time, various synonymous terms have been used to refer to this condition. The pathophysiology of CFM revolves around the disruption of embryonic craniofacial development, primarily stemming from abnormalities in the first and second pharyngeal arches. Both genetic and non-genetic factors play a role in impacting the development of the ear and jaw. These factors encompass a range of elements, including: variants of transcription factors responsible for neural crest cell migration and patterning, chromatin modifiers, growth factors and their receptors, DNA pre-replication complexes, ribosome assembly, and the spliceosome. Although there is currently a better understanding of the pathophysiology of this entity, it is still necessary to continue with more specific research on the related etiological factors. The aim of this review is to compile the most pertinent genetic factors associated with craniofacial microsomnia as reported in the last decade.

Palabras clave: Craneofacial Microsomial, CFM, Genetic Factors, Hemifacial Microsomnia, Pharyngeal Arch

INTRODUCCIÓN

La microsomía craneofacial (CFM; OMIM # 164210) es una malformación congénita compleja, que afecta aproximadamente a uno de cada 5.000 nacidos vivos, sin embargo, se han descrito prevalencias de 1:3.000 hasta 1:26.000 nacidos vivos (Heike *et al.*, 2013; Birgfeld y Heike, 2019; Renkema *et al.*, 2022). Este amplio rango se considera de forma reiterativa en la literatura como probable consecuencia de la variabilidad en el fenotipo. Esto ha hecho difícil establecer una descripción concisa del espectro clínico y se refleja en la diversidad de denominaciones que se reportan en la literatura y en el ambiente clínico (Heike *et al.*, 2016). Los siguientes son algunos términos empleados de forma indistinta: microsomía hemifacial, espectro óculo-auricular-vertebral (OAVS), síndrome de Goldenhar, displasia oculoauriculovertebral (displasia OAV) o secuencia facio aurículo vertebral (secuencia FAV) (Caron *et al.*, 2017; OMIM, 2023). La principal característica es la hipoplasia asimétrica unilateral o bilateral de las estructuras craneofaciales, que con mayor frecuencia afectan la mandíbula y la oreja (Beleza-Meireles, 2015; Birgfeld y Heike, 2019).

En 1986, fue publicado un artículo con las tasas de prevalencia de microtia en Sudamérica. En este, se evidenció una alta prevalencia en la región andina, siendo esta de dos a cuatro veces más alta que en el resto de la región (8-18 de cada 10.000 nacimientos) (Castilla y Orioli, 1986; Villalba, 2015). Con los resultados de la secuenciación genómica, se han podido identificar algunos componentes genéticos implicados en la fisiopatología como *MYT1*, *SF3B4* y *SF3B2*, entre otros (Luquetti *et al.*, 2020; Timberlake *et al.*, 2021). Así mismo, existen otras causas a tener en cuenta como la exposición prenatal a factores ambientales o epigenéticos de los que se desconoce si afectan otras cascadas moleculares o las ya descritas hasta el momento. Sin embargo, aún es necesario seguir investigando para conocer no solo cada componente sino los roles que desempeñan y cómo su interacción conlleva a un fenotipo tan variado. El objetivo de esta revisión es realizar un recuento de los factores genéticos más relevantes relacionados con la microsomía craneofacial reportados en los últimos 10 años.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para esta revisión de la literatura, se acordó el uso de las siguientes bases de datos: Clinical Key, Wiley Online Library y Pubmed. Se emplearon las palabras clave: “craniofacial microsomía” “genomic” “genetics”. Se hizo revisión de la literatura en inglés

y con un intervalo de tiempo que abarcó desde el 1 enero de 2012 hasta el 19 de noviembre de 2022. Se obtuvieron 13 artículos en Clinical Key, 92 artículos y capítulos en Wiley Online Library y 36 artículos en Pubmed, en total 141 artículos. Se hizo una revisión manual de título y resumen de todos estos en donde se descartaron los duplicados y las publicaciones que no cumplían con los objetivos de la revisión. Adicionalmente, se incluyeron 14 artículos relevantes que a pesar de no aparecer en los motores de búsqueda, se juzgó que eran necesarios para la comprensión y redacción de este artículo. En total se incluyeron 38 artículos.

RESULTADOS

Microsomía craneofacial y epidemiología

La CFM fue descrita por primera vez por el médico alemán Carl Ferdinand Von Arlt en 1881 (Chhabra y Chhabra, 2017). Como mencionamos previamente, a lo largo de la historia han surgido términos sinónimos que han descrito esta malformación dentro del gran espectro clínico que abarca. Las denominaciones en el transcurso de los años han sido de esta forma: síndrome de Goldenhar -1952-, displasia óculo-aurículo-ventricular -1963-, microsomía hemifacial por Gorlin y Pindborg (1960-1964) y síndrome facio-aurículo-ventricular -1990- (Gorlin *et al.*, 2001; Lawson *et al.*, 2002; Camacho *et al.*, 2017; Berraquero *et al.*, 2018).

Existe en la literatura revisada un amplio rango de prevalencia, con cifras desde 1:3.000 a 1:45.000 nacidos vivos. Este es un estimado ya que en distintas fuentes se enuncian datos de 1:5.600, 1:26.370 e incluso 1:35.000 nacidos vivos. En Europa se han reportado 3,8 por cada 100.000 nacidos vivos y se estima que en los casos que tienen componente familiar, la prevalencia abarca del 9,5% al 31% (Beleza-Meireles, 2015).

Clasificaciones

Al igual que con las denominaciones, las clasificaciones empleadas en los pacientes con CFM han variado con la historia y descripción de la patología. Esta evolución en las clasificaciones empezó desde la inclusión de algunos hallazgos elementales de dicha condición, hasta ser más detalladas debido al empleo de nueva tecnología como la tomografía axial computarizada. Entre estas clasificaciones, se encuentra, en 1969, el sistema de clasificación de Pruzansky, que describe hipoplasia mandibular (Pruzansky, 1969). Luego, en 1988, Kaban *et al.* realizaron la modificación de ese sistema, en la que se incluyen las deformidades en la articulación temporomandibular. En 1991 se describió la clasificación OMENS; el significado de sus siglas es O: asimetría de

la órbita (*Orbit*), M: hipoplasia mandibular (*Mandible*), E: deformidad en el oído externo (*Ear*), N: compromiso de los nervios (*Nerve*) y S: deficiencia en tejido blando (*Soft Tissue*). Esta clasificación incluía 3 grados de compromiso para cada componente. Este último sistema fue modificado en 1995 para incluir manifestaciones extracraneales. En 2007 se anexó una representación pictográfica y en 2011, se modificó para estandarizar su uso y comprensión en la práctica clínica; OMENS (Véliz *et al.*, 2016; Renkema *et al.*, 2022).

Fisiopatología

La evidencia científica recopilada hasta la actualidad respecto a CFM, nos ha permitido dilucidar algunos puntos de la vía molecular implicada en esta malformación. Sin embargo, la comprensión de todo el panorama aún es desconocida. Se ha establecido que hay factores de riesgo genéticos y no genéticos que hacen compleja la determinación etiológica (Castilla y Orioli, 1986). Estos factores de riesgo se resumen en tres componentes: la disrupción vascular, el defecto del cartílago de Meckel y la anomalía de las células de la cresta neural craneal. Se plantea que estos factores de riesgo inician afectando un solo componente, pero terminan afectando a todos dada la intrincada relación entre estos. En cuanto a los factores no genéticos que desencadenan la disrupción vascular, se han enumerado los siguientes: la diabetes mellitus, las regiones geográficas de gran altitud, el uso de talidomida, primidona y ácido retinoico (Timberlake *et al.*, 2021; Luo *et al.*, 2023). Específicamente, en el caso de la talidomida y sus derivados con propiedades antiangiogénicas, se da una inhibición del VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular). Dicho factor juega un rol fundamental en el desarrollo de los vasos sanguíneos que rodean el cartílago de Meckel (Kowalski *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2023). Independientemente de los mecanismos moleculares afectados, la exposición a factores teratogénicos provocará una cadena de eventos celulares que altera la expresión genética, y esta, a su vez, traerá cambios en el fenotipo y la funcionalidad de las estructuras (Kowalski *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2023).

Los factores ambientales que tienen efecto en las malformaciones genéticas o incluso que llegan a causar muertes fetales, presentan un reto en su identificación. Esto es debido a que un factor individual puede no ser deletéreo, pero si se combina con otros, puede llegar a causar disrupción en los procesos de desarrollo embrionario (Cuny *et al.*, 2020; Mark, 2022). Un ejemplo de estas interacciones es el nuevo modelo de pleiotropía en la deficiencia de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido). La obtención de esta molécula ocurre gracias al metabolismo del L-triptófano a través

de la vía de la quinurenina. Existe la hipótesis de que la deficiencia de NAD⁺ es un mecanismo pleiotrópico para múltiples condiciones de malformación, como lo es el complejo extremidad-pared abdominal (LBWC), la pentalogía de Cantrell (POC), el complejo onfalocelo, la extrofia de la cloaca, el ano imperforado y anomalías de la columna vertebral (OEIS), la asociación VACTERL (malformaciones Vertebrales, atresia Anal, anomalías Cardiovasculares, fístula Traqueoesofágica, atresia Esofágica, malformaciones Renales y displasia de las extremidades), el espectro óculo-aurículo-vertebral (OAVS), entre otros (Cuny *et al.*, 2020; Mark, 2022).

Se considera que los posibles mecanismos etiológicos afectan al embrión entre los 30-45 días de gestación. El fenotipo variable está relacionado con la edad embrionaria, la cantidad de procesos celulares implicados y la alteración en la calidad de los componentes afectados (Véliz *et al.*, 2016).

Los factores genéticos implicados en el desarrollo del oído y la mandíbula descritos hasta el momento son: factores de transcripción implicados en la migración y el patrón de las células de la cresta neural (*TFAP2A*, *SIX1*, *SIX5*, *EYA1*, *HOXA10*, *HOXA2*), modificadores de la cromatina (*CHD7*, *KMT2D*, *KDM6A*), factores de crecimiento y sus receptores (*GDF6*, *FGF3*, *FGF10*, *FGFR2*, *FGFR3*), genes que codifican los complejos de pre-replicación de ADN (*ORC1*, *ORC4*, *ORC6*, *CDC6*, *CDT1*), genes implicados en el ensamblaje de ribosomas (*TCOF1*, *POL1RC*, *POL1RD*) y los elementos involucrados en la transcripción del spliceosoma (*EFTUD2*, *TXNL4A*, *SF3B4*, *SF3B*) (Timberlake *et al.*, 2021).

Los grupos de genes y factores ambientales descritos previamente, afectan el desarrollo de las estructuras faciales en diferentes niveles. Para poder tener una mejor perspectiva sobre la disrupción de estos procesos, describiremos a continuación el desarrollo embrionario de las estructuras craneofaciales derivadas del primer y segundo arco faríngeos. La base de la formación embrionaria son las tres capas germinales primarias: ectodermo, mesodermo y endodermo, en el disco trilaminar. A este disco se le denomina de forma diferente debido a su posición anatómica; se llama placa precordial en el extremo craneal y placa cloacal en el extremo caudal. Debido al tema de la revisión, nos enfocaremos en la placa precordial, la cual está formada por la invaginación de la membrana orofaríngea. Esto crea una concavidad en la región central para una estructura clave en la formación de la cara que es el estomodeo. La prominencia frontal se origina por encima del estomodeo en la cuarta semana postovulación y da lugar a las porciones superior y media de la cara. Estas comprenden las áreas entre el labio superior y la frente. Las protuberancias maxilares y nasales se forman debajo de la prominencia frontal y se unen formando una sola

Tabla 1. Estructuras embrionarias y craneofaciales desarrolladas. Extraído de Johnson *et al.*, 2011b.

Estructura embrionaria	Desarrollo de componentes craneofaciales
<i>Primer surco faríngeo</i>	Conducto auditivo externo
<i>I Arco faríngeo (AF)</i>	Mandíbula
	Músculos de la masticación
	V par craneal (V2 y V3)
	Martillo y yunque
<i>Bolsa de I arco faríngeo</i>	Trompa de Eustaquio
	Cavidad timpánica
	Celdillas mastoideas
<i>Segundo surco faríngeo</i>	Seno cervical de his
<i>II arco faríngeo</i>	Músculos de la expresión facial
	Cuerpo y cuernos menores del hioides
	Estribo
	VII y VIII par craneal
<i>Bolsa del II arco faríngeo</i>	Amígdala palatina

estructura. De esta proceden los seis arcos mesodérmicos que están separados entre sí, en la parte externa, por hendiduras branquiales revestidas por endodermo (surcos) y, en la parte interna, por bolsas faríngeas revestidas por ectodermo (Johnson *et al.*, 2011).

El primer surco faríngeo da origen al conducto auditivo externo, el primer arco faríngeo a la mandíbula, los músculos de la masticación, el V par craneal (V2 y V3) y al martillo y el yunque. La bolsa del primer arco faríngeo da lugar a la trompa de Eustaquio, la cavidad timpánica y las celdillas mastoideas. El segundo surco faríngeo forma el seno cervical de his, el segundo arco faríngeo forma a los músculos de la expresión facial, cuerpo y cuernos menores del hioides, el estribo, el VII y VIII par craneal y la bolsa a la amígdala palatina (Johnson *et al.*, 2011) (Tabla 1).

La segregación de células de la cresta neural es fundamental para evitar fusiones de los elementos ectodérmicos y mesenquimales. Así mismo, esta separación también se da para impedir la mezcla de células de la cresta neural con diferentes elementos estructurales. Este aislamiento migratorio hace que cada arco faríngeo esté constituido en el centro por tejido mesenquimatoso específico el cual tendrá en su parte externa, ectodermo superficial y en su parte

interna, tejido del endodermo. El núcleo de cada arco faríngeo contiene células de la cresta neural que migran a lo largo de los otros arcos, ayudando así a formar los componentes musculares, arteriales y nervios craneales, característicos de cada arco (Passos-Bueno *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2011).

A continuación, se hará un desglose de los componentes genéticos relacionados con la fisiopatología que fueron mencionados anteriormente. Para comenzar, expondremos los fenómenos genéticos implicados en la inducción del desarrollo del oído. Estos están mediados por la notocorda, el mesodermo paraxial y el romboencéfalo. Este último presenta un engrosamiento denominado placoda ótica. El gen *TFAP2A*, está implicado en las vías de señalización de *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) y Wnt. Estas vías afectan el eje anteroposterior, induciendo la formación de diversas estructuras, entre ellas, el romboencéfalo. Variaciones en *TFAP2A* pueden influir en la expresión de genes de la vía BMP, alterando la señalización y llevando a malformaciones en la cresta neural. Aquí también hay relación con el gen *EYA1* y este interviene en la formación de la placoda ótica. Mutaciones en *EYA1*, que es regulado por la vía Wnt, podrían afectar la diferenciación y migración celular en la placoda ótica (Polevoy *et al.*, 2019).

La vía BMP tiene varios reguladores en su cascada de señalización, es por esto que el fenotipo puede ser variable. Por ejemplo, en el caso de verse comprometido el gen *HOXA2*, la formación del paladar puede verse afectada. La regulación de BMP por genes como *HOXA2* puede ser crítica. (Lyyanar *et al.*, 2017; Polevoy *et al.*, 2019).

El gen *ORC1* se vería implicado en el proceso de hipoplasia, ya que su deficiencia se relaciona con la dificultad en la entrada en la fase S del ciclo celular y su progresión en el mismo. La afectación sucede en la replicación del ADN y el crecimiento celular. Al pasar esto último, se impide el crecimiento de las estructuras en una etapa de rápida proliferación celular como lo es el desarrollo embrionario. Debido a su papel en los procesos mencionados anteriormente, la deficiencia de *ORC1* tiene impacto en la variabilidad fenotípica de la CFM ya que perjudica a diversos componentes craneofaciales en distintas etapas de su formación. El acoplamiento adecuado entre este gen y otras vías es esencial para conservar el balance en la intrincada red de regulación de los procesos de desarrollo (Stiff *et al.*, 2013).

Los genes *CDC6* y *CDT1* forman un complejo que se torna vital para el inicio del proceso de replicación del ADN y el ensamblaje de las ADN helicasas en el complejo de replicación. Si existen daños en su regulación y expresión, el ADN se torna inestable y puede producir mutaciones que se verán reflejadas en el fenotipo. Dichas mutaciones pueden darse en genes clave para el desarrollo propicio de las estructuras faciales y sus anexos, provocando así los cambios fenotípicos vistos en la CFM (Pozo y Cook, 2016).

Por otro lado, *FTCHD7* es fundamental para la activación del circuito transcripcional de la cresta neural que hace parte de la migración. Al verse esta última comprometida, se afectan estructuras mesenquimatosas como cartílagos y huesos faciales (OMIM, 2022a).

Para continuar, es también de importancia resaltar el papel de los factores epigenéticos que se ven implicados en el proceso de empaquetamiento del ADN. Por ejemplo, los genes *KMT2D* y *KDM6A* se encuentran implicados en los procesos de metilación y desmetilación, respectivamente. Esto quiere decir que afectan la represión o favorecen la expresión génica relacionada al control de la histona H3. Las modificaciones en la regulación de esta histona impactan la configuración de la cromatina y la expresión o supresión de genes relacionados con las estructuras faciales (OMIM, 2022b, OMIM, 2022c).

En la gama de genes implicados en el ensamblaje de ribosomas, *POL1RCy* *POL1RD* se encargan de codificar las RNA polimerasas I y III. Estas enzimas se encargan del proceso de transcripción del ARN y su posterior traducción a proteínas. Debido a que la síntesis de estas

estructuras es de vital importancia para la diferenciación y proliferación celular, si hay anomalías en el ensamblaje ribosomal, puede haber deficiencias parciales o totales en el crecimiento de los componentes craneofaciales en la etapa embrionaria (OMIM, 2022d).

El gen *GDF6* es parte de la familia del factor transformante beta, el cual se ve involucrado en el desarrollo coclear. Su rol ayuda en la diferenciación de las células indispensables de la audición. De la misma manera, el *FGF3* es parte de otra gran familia de factores de crecimiento que se ven implicados en la formación de estructuras de oído interno. Esto se logra ya que dicho gen participa tanto en la diferenciación como en la proliferación de las células auditivas. Si alguno de estos genes mencionados se ve afectado, puede verse comprometido el fenotipo de dichas estructuras craneofaciales (Bademci *et al.*, 2020; OMIM, 2022e).

Como se logra observar, hay varios genes implicados en la formación del oído y sus estructuras. Sin embargo, hay tres roles principales en los cuales se pueden agrupar. Primero, la replicación y crecimiento celular, segundo, la variabilidad fenotípica y, por último, la interdependencia y regulación entre las vías y los genes. Esto muestra por qué es uno de los componentes faciales más afectados en la clínica de CFM y por lo cual existe mayor evidencia.

Con respecto al papel del spliceosoma en la fisiopatología, se ha visto que, en modelos murinos, si se altera la expresión de genes como *SF3B2* y *SF3B4*, hay disrupción del desarrollo de la cresta neural. Cuando este proceso se ve alterado, principalmente afecta el primer y segundo arcos faríngeos, se evidencia compromiso en el desarrollo adecuado de estructuras como el oído externo y la mandíbula (Stiff *et al.*, 2013; Timberlake *et al.*, 2021).

El complejo SF3B está conformado por el spliceosoma principal que a su vez se compone de U1 y U2. Estos son componentes fundamentales del ensamblaje y desensamblaje del complejo SF3B. El primer paso es la interacción entre U1, U2 y el preARN mensajero (pre-ARNm). U1 y U2 son cada uno un complejo de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP) y la interacción con pre-ARNm conlleva a la formación del complejo A o pre-spliceosoma. Posteriormente, se une el tri-snRNP (U4/U5/U6), dando lugar al complejo B o spliceosoma pre catalítico. Una vez se escinden los componentes U4 y U1, el spliceosoma se activa y ocurren otros cambios hasta la conformación del complejo C o spliceosoma catalítico. Esto finalmente, lleva a la consolidación del pos spliceosoma, dando lugar al corte y empalme con la obtención del intrón y RNPm (Lee y Rio, 2015; OMIM, 2022d).

Como resultado del proyecto de caracterización de microsomía hemifacial en la región andina, desde 2021 se postula la necesidad de incluir a *SF3B2* en los paneles

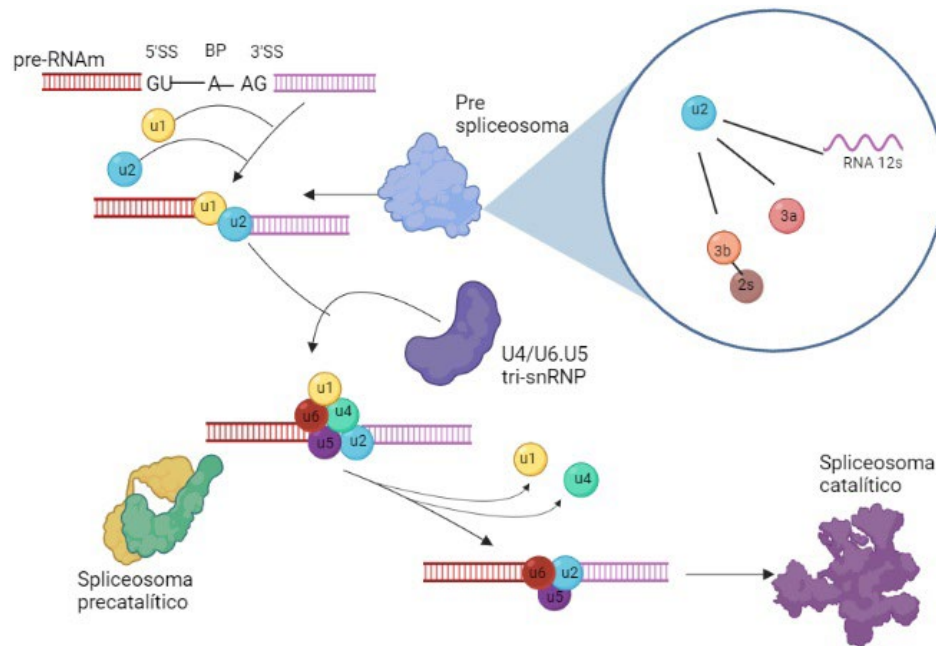


Figura 1. Formación del spliceosoma, Extraído de Lee y Rio, 2015.

El primer paso es la interacción entre U1, U2 y el preARN mensajero (pre-ARNm). U1 y U2 son cada uno un complejo de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNP) y la interacción con pre-ARNm conlleva a la formación del complejo A o pre-spliceosoma. Posteriormente, se une el tri-snrNP (U4/U5.U6), dando lugar al complejo B o spliceosoma pre catalítico. Una vez se escinden los componentes U4 y U1, el spliceosoma se activa y ocurren otros cambios hasta la conformación del complejo C o spliceosoma catalítico. Leyenda: U: subunidad, BP: pares de bases, RNA 12S: subunidad ribosomal 12S; 2s, 3a, 3b: componente de U2.

genéticos de pacientes afectados con CFM (Timberlake *et al.*, 2021). La explicación fisiopatológica es la siguiente. En caso de haploinsuficiencia de *SF3B2*, se verá afectado el primer paso del ensamblaje del complejo A o pre spliceosoma. La alteración se ve concretamente en U2 ya que el gen *SF3B2* codifica para la subunidad dos del complejo proteico del factor de *splicing* 3b. Este último es uno de los tres componentes de U2, los otros componentes son el factor de *splicing* 3a y la unidad de RNA 12S. Al no conformarse en cantidades suficientes, como fisiológicamente se espera, no puede interactuar con el complejo U1 y pre-ARNm, conocido como pre-spliceosoma o complejo B, viéndose considerablemente afectada la producción de proteínas funcionales (Lee y Rio, 2015; NIH, 2022) (Figura 1).

Como consecuencia de lo mencionado anteriormente, hay exones aberrantes que usualmente se eliminan antes del *splicing* (ie. se consideran aberrantes porque tienen codones de terminación prematura). Si se conservan estos exones, se vería afectada la producción proteica y, por lo tanto, se termina comprometiendo la expresión génica de tejidos específicos y en este caso el oído externo y mandíbula (Lee y Rio, 2015; NIH, 2022).

DISCUSIÓN

Una vez realizada esta revisión y teniendo en cuenta los componentes estudiados hasta el momento en la fisiopatología de la CFM, se dilucida la complejidad del proceso de formación de las estructuras originadas de la placa precordial.

Los componentes genéticos y no genéticos terminan afectando el desarrollo del primer y segundo arcos faríngeos y, por ende, las diferentes estructuras faciales (Tabla 1). Con respecto a la alteración del genotipo, esto también depende de factores ambientales externos como la diabetes mellitus, el uso de talidomida y ácido retinoico, etc. Si bien aún se desconoce el porcentaje exacto de la contribución al proceso fisiopatológico, se considera que se debe de ahondar más sobre este tema. Al ser estos factores mencionados considerados como modificables, tanto pacientes como profesionales pueden estar más sensibilizados y conocerlos (Johnson *et al.*, 2011; Timberlake *et al.*, 2021).

Las estructuras mesenquimatosas del oído y la mandíbula se ven perjudicadas en diversas formas y grados. El nivel de afección cambia según lo temprano

o tarde que haya ocurrido la injuria en el desarrollo embrionario y varía según el número de factores genéticos implicados. Los factores que se pueden ver alterados son: las variantes de los factores de transcripción implicados en la migración y el patrón de las células de la cresta neural, los modificadores de la cromatina, los factores de crecimiento y sus receptores, genes que codifican los complejos de pre-replicación de ADN, genes implicados en el ensamblaje de ribosomas y los elementos involucrados en la transcripción del spliceosoma. Dichos factores tendrán un papel determinante en la severidad del fenotipo y el espectro clínico (Johnson *et al.*, 2011; Lee y Rio, 2015; Pozo y Cook, 2016; Polevoy *et al.*, 2019; Bademci *et al.*, 2020; Timberlake *et al.*, 2021; NIH, 2022; OMIM, 2022b; OMIM, 2022c; OMIM, 2022d; OMIM, 2022e).

En conclusión, en los últimos años se han visto resultados de investigaciones iniciadas hace más de 10 años. Aunque aún no se comprende en la totalidad la fisiopatología, gracias a los aportes de cada investigador se ha logrado avanzar hacia una formulación parcial de los eventos. Se debe continuar investigando para comprender la totalidad de este intrincado proceso patológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Bademci G., Abad C., Cengiz F.B., Seyhan S., Incesulu A., Guo S., Fitoz S., Atli E.I., Gosstola N.C., Demir S., Colbert B.M., Seyhan G.C., Sineni C.J., Duman D., Gurkan H., Morton C.C., Dykxhoorn D.M., Walz K., Tekin M. (2020) Long-range cis-regulatory elements controlling GDF6 expression are essential for ear development. *J. Clin. Invest.* 130: 4213-4217.
- Beleza-Meireles A., Hart R., Clayton-Smith J., Oliveira R., Falcão Reis C., Venâncio M., Ramos F., Sá J., Ramos L., Cunha E., Pires L.M., Marques Carreira I., Scholey R., Wright R., Urquhart J.E., Briggs T.A., Kerr B., Kingston H., Metcalfe K., Donnai D., Newman W.G., Saraiva J.M., Tassabehji M. (2015) Oculo-auriculo-vertebral spectrum: Clinical and molecular analysis of 51 patients. *Eur. J. Med. Genet.* 58: 455-465.
- Berraquero D., Redondo M., Romance A.L., Wucherpfening B., Zarco A. (2018) Microsomía craneofacial: diagnóstico, clasificación clínica y planificación terapéutica. *Ortod. Esp.* 56: 49-61.
- Birgfeld C., Heike C. (2019) Craniofacial Microsomia. *Clin. Plast. Surg.* 46: 207-221.
- Camacho S.M., Pabón A.M., Hernández J.A. (2017) Dentofacial characteristics of patients with hemifacial microsomia. A literature review. *Rev. Estomatol.* 22: 46-50.
- Caron C.J.J.M., Pluijmers B.I., Wolvius E.B., Looman C.W.N., Bulstrode N., Evans R.D., Ayliffe P., Mulliken J.B., Dunaway D., Padwa B., Koudstaal M.J. (2017) Craniofacial and extracraniofacial anomalies in Craniofacial Microsomia: A multicenter study of 755 patients. *J. Craniomaxillofac. Surg.* 45: 1302-1310.
- Castilla E.E., Orioli I.M. (1986) Prevalence rates of microtia in South America. *Int. J. Epidemiol.* 15: 364-368.
- Chhabra N., Chhabra A. (2017) Hemifacial Microsomia: Clinicoradiological Insight and report of a case. *Ethiop. J. Health Sci.* 27: 91-94.
- Cuny H., Rapadas M., Gereis J., Martin E.M.M.A., Kirk R.B., Shi H., Dunwoodie S.L. (2020) NAD deficiency due to environmental factors or gene-environment interactions causes congenital malformations and miscarriage in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 117: 3738-3747.
- Gorlin R.J., Cohen M.M., Hennekam R.C. (2001) *Syndromes of the head and Neck.* Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.
- Heike C.L., Hing A.V., Aspinall C.A., Bartlett S.P., Birgfeld C.B., Drake A.F., Pimenta L.A., Sie K.C., Urata M.M., Vivaldi D., Luquetti D.V. (2013) Clinical care in craniofacial microsomia: A review of current management recommendations and opportunities to advance research. *AJMG.* 163: 271-282.
- Heike C., Wallace E., Speltz M., Siebold B., Werler M., Hing A., Birgfeld C., Collett B., Leroux B., Luquetti D. (2016) Characterizing facial features in individuals with Craniofacial Microsomia: A systematic approach for clinical research. Part A *Clin. Mol. Teratol.* 106: 915-926.
- Johnson J.M., Moonis G., Green G.E., Carmody R., Burbank H.N. (2011a) Syndromes of the first and second branchial arches, part 2: syndromes. *AJNR Am J Neuroradiol.* 32: 230-237.
- Johnson J.M., Moonis G., Green G.E., Carmody R., Burbank H.N. (2011b) Syndromes of the first and second branchial arches, part 1: embryology and characteristic defects. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 32: 14-19.
- Kaban L.B., Moses M.H., Mulliken J.B., (1988) Surgical correction of hemifacial microsomia in the growing child. *Plast Reconstr Surg.* 82(1):9-19.
- Kowalski T.W., Gomes J.D.A., Garcia G.B.C., Fraga L.R., Paixao-Cortes V.R., Recamonde-Mendoza M., Sanseverino M.T.V., Schuler-Faccini L., Vianna F.S.L. (2020) CRL4-Cereblon complex in Thalidomide Embryopathy: a translational investigation. *Sci. Rep.* 10: 851.
- Lawson K., Waterhouse N., Gault, D.T., Ng R., Calvert M.L. (2002) Is hemifacial microsomia linked to multiple maternities? *BJPS.* 55: 474-478.
- Lee Y., Rio D.C. (2015) Mechanisms and regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 84: 291-323.
- Luo S., Sun H., Bian Q., Liu Z., Wang X. (2023) The etiology, clinical features, and treatment options of hemifacial microsomia. *Oral Dis.* 29: 2449-2462.
- Luquetti D.V., Heike C.L., Zarante I., Timms A.E., Gustafson J., Pachajoa H., Porrás-Hurtado G.L., Ayala-Ramírez P., Duenas-Roque M.M., Jiménez N., Ibanez L.M., Hurtado-Villa P. (2020) myt1 role in the microtia-Craniofacial Microsomia Spectrum. *Mol. Genet. Genomic Med.* 8: e1401.
- Lyayanar P.P.R., Nazarali A.J. (2017) Hoxa2 Inhibits Bone Morphogenetic Protein Signaling during Osteogenic Differentiation of the Palatal Mesenchyme. *Front. Physiol.* 8: 929.
- Mark P.R. (2022) NAD+ deficiency in human congenital malformations and miscarriage: A new model of pleiotropy. *Am. J. Med. Genet. A.* 188: 2834-2849.
- NIH (2022) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10992> (Accessed November 2022)
- OMIM (2023) <https://www.omim.org/entry/164210> (Accessed January 2023)
- OMIM (2022a) <https://www.omim.org/entry/608892> (Accessed November 2022)
- OMIM (2022b) <https://www.omim.org/entry/602113> (Accessed November 2022)
- OMIM (2022c) <https://omim.org/entry/300128> (Accessed November 2022)

- OMIM (2022d) <https://www.omim.org/entry/610060> (Accessed November 2022)
- OMIM (2022e) <https://omim.org/entry/164950> (Accessed November 2022)
- Passos-Bueno M.R., Ornelas C.C., Fanganiello R.D. (2009) Syndromes of the first and second pharyngeal arches: A review. *Am. J. Med. Genet. Part A.* 149A: 1853–1859.
- Polevoy H., Gutkovich Y.E., Michaelov A., Volovik Y., Elkouby Y.M., Frank D. (2019) New roles for Wnt and BMP signaling in neural anteroposterior patterning. *EMBO Rep.* 20: e45842.
- Pozo P., Cook J. (2016) Regulation and function of CDT1; a key factor in cell proliferation and genome stability. *Genes.* 8: 2.
- Pruzansky S., (1969) Not all dwarfed mandibles are alike. *Birth Defects Orig Artic Ser* 5:120–9.
- Renkema R.W., Caron C.J.J.M., Heike C.L., Koudstaal M.J. (2022) A decade of clinical research on clinical characteristics, medical treatments, and surgical treatments for individuals with craniofacial microsomia: What have we learned? *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 75: 1781–1792.
- Stiff T., Alagoz M., Alcantara D., Outwin E., Brunner H.G., Bongers E.M., O'Driscoll M., Jeggo P.A. (2013) Deficiency in origin licensing proteins impairs cilia formation: implications for the aetiology of Meier-Gorlin syndrome. *PLoS Genet.* 9:e1003360.
- Timberlake A.T., Griffin C., Heike C.L., Hing A.V., Cunningham M.L., Chitayat D., Davis M.R., Doust S.J., Drake A.F., Duenas-Roque M.M., Goldblatt J., Gustafson J.A., Hurtado-Villa P., Johns A., Karp N., Laing N.G., Magee L., Mullegama S.V., Pachajoa H., Luquetti D.V. (2021) Haploinsufficiency of SF3B2 causes Craniofacial Microsomia. *Nat. Commun.* 12: 1–11.
- Véliz MS., Agurto VP., Leiva VN. (2016) Microsomía hemifacial. Revisión de la Literatura. *Revista Facultad De Odontología,* 27(2): 404-425.
- Villalba M.I., Campaña H., Scala S.C., Pawluk M.S., López-Camelo J.S. (2015) Riesgo de anomalías congénitas en Grupos étnicos De Sudamérica. *RAAB.* 17: 1514-7991.

OMICS: A NEW VISION FOR BREAST CANCER TREATMENT



OMICS: UNA NUEVA VISIÓN DEL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA


Salvatierra A.^{1,2*}, Díaz-Baena D.², Güven Ö.², Ruiz-Serrano E.²

¹Departamento de Salud Pública,
Facultad de Medicina, Universidad
Nacional Autónoma de México, México.

²Facultad de Medicina, Universidad
Autónoma de Barcelona, España.

Corresponding author:

Juan Andreé Salvatierra
Baldeón
4andree4@gmail.com

 ORCID 0000-0002-0638-563X

Cite this article as:

Salvatierra A., Díaz-Baena D., Güven Ö., Ruiz-Serrano E. 2023. OMICS: A NEW VISION FOR BREAST CANCER TREATMENT. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXIV (2): 41-49.

Received: 02/23/2023

Revised version received: 05/04/2023

Accepted: 10/27/2023

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2023.34.02.04

ISSN online version: 1852-6233

ABSTRACT

Breast cancer is an extremely heterogeneous disease with diverse morphologies, molecular characteristics, and clinical behaviour whose causes include interactions of both genetic and environmental factors. Currently, more than 2,261,419 cases and 684,996 deaths are reported each year worldwide and although great strides have been made, available treatments are inadequate for its most intractable forms. Therefore, knowing the associated molecular bases is essential to improve the prognosis and survival. The omics are high performance technologies utilized to quantify cellular components at a large scale. In this regard, this article presents genomic, epigenomic, transcriptomic, and proteomic research on breast cancer, in an attempt to understand and identify potential therapeutic molecular targets.

Key words: breast cancer, genomics, epigenomics, nutrigenomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics.

RESUMEN

El cáncer de mama es una enfermedad extremadamente heterogénea con diversas morfologías, características moleculares, y comportamiento clínico, cuyas causas incluyen interacciones tanto de factores genéticos como ambientales. Actualmente, se reportan más de 2,261,419 casos y 684,996 muertes cada año en todo el mundo y, aunque se han realizado grandes avances, los tratamientos disponibles son inadecuados para sus formas más intratables. Por tanto, conocer las bases moleculares asociadas es imprescindible para mejorar el pronóstico y la supervivencia. Las ómicas son tecnologías de alto rendimiento, utilizadas para cuantificar componentes celulares a gran escala. En ese sentido, este artículo expone investigaciones genómicas, epigenómicas, transcriptómicas, y proteómicas sobre el cáncer de mama, en un intento por comprender e identificar posibles blancos moleculares terapéuticos.

Palabras clave: cáncer de mama, genómica, epigenómica, nutrigenómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica.

INTRODUCTION

Breast cancer is one of the most common women's cancers with more than 2,261,419 cases and 684,996 deaths each year worldwide, representing 15.5% of all female deaths (Global Cancer Observatory, 2023). The incidence of breast cancer is increasing in the developing world due to increased life expectancy, increased urbanization and the adoption of western lifestyles (Sauter, 2018).

This disease is categorized into three basic therapeutic groups: the estrogen receptor (ER) positive group, HER2 (also called ERBB2) group, and the basal-like breast cancer which is characterized by the lack of expression of ER, progesterone receptor and HER2 (Koboldt *et al.*, 2012). It is an extremely heterogeneous disease with diverse morphologies, molecular characteristics and clinical behavior caused by the interaction of both genetic and environmental risk factors (Guo *et al.*, 2018). Although advances in the understanding of this disease have been made in the last decade, the available treatments remain inadequate, particularly for the most intractable forms of breast cancer.

Omics are technologies used to quantify cellular components on a large scale. The potential benefit in cancer research is promising, since they offer an unmatched opportunity to define cancer at both pathological and molecular levels (Orsini *et al.*, 2023). This article aims to present research based on the gene (genomics)-DNA (epigenomics)-RNA (transcriptomics)-protein (proteomics) dogma (Figure 1), which allows us to understand the molecular mechanisms associated with the pathogenesis of breast cancer, in order to identify new molecular targets for therapeutic intervention.

METHODS

In this article, required information was collected through literature review and keyword query (breast cancer, cancer, biomarkers, genomic, personalized medicine, pharmacogenomic, epigenomic, nutrigenomic, personalized diet, carcinogenic food, transcriptomic and proteomic) in credible scientific websites such as, Google Scholar, Scientific Electronic Library Online (SciELO), Medline, and the search engine for electronic journals and books of Universidad Nacional de Colombia and Universidad Autónoma de Barcelona.

Genomics

Genomics is the comprehensive analysis of genes, their DNA structure and their function. Genome analysis has

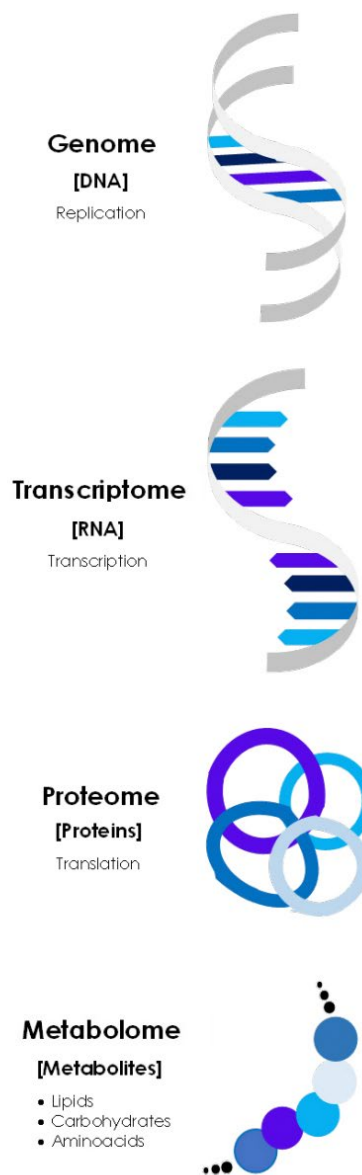


Figure 1. Omics family.

improved our understanding of the mechanisms of breast cancer, thanks to the rapid progress in molecular biology and genome sciences in the past decades, expanding our knowledge at the cellular, molecular and genomic levels (Feng *et al.*, 2018).

The main goal of cancer sequencing studies is to identify genes that have undergone somatic mutations, contributing to malignant transformation (Goncalves *et al.*, 2014). The Cancer Genome Atlas researchers obtained tumor and germline DNA samples from 825 patients who presented breast cancer and found 30,626 somatic mutations which included 28,319 point mutations, four dinucleotide mutations, and 2,302 insertions/deletions (Koboldt *et al.*, 2012). These researchers identified all

genes previously found to be implicated in breast cancer (*PIK3CA*, *PTEN*, *AKT1*, *TP53*, *GATA3*, *CDH1*, *RB1*, *MLL3*, *MAP3K1* and *CDKN1B*) and, furthermore, they found 26 novel significant mutated genes. Also, germline variants were identified in *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *NBN*, *PTEN*, *RAD51C* and *TP53* genes (Koboldt *et al.*, 2012) which could be potential biomarkers in breast cancer. Of these genes, *BRCA1* and *BRCA2* are likely to be the main genes involved breast cancer. Impairment or loss of function of one of these two genes is involved in substantial genome instability, including increased number of mutations, DNA breakage and chromatid exchanges, increased sensitivity to DNA damage, and defects in cell cycle checkpoint functions (Barh, 2014).

Currently, there are a variety of risk assessment tools that provide information on breast cancer gene mutation status, prior to the development of the disease. These findings allow the implementation of prevention strategies, such as the use of chemoprevention medications (tamoxifen and raloxifene) (Abreu *et al.*, 2014; Sauter, 2018), or mastectomy which is a reasonable approach for women without breast cancer who have a known deleterious mutation in *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PALB2*, *CDH1*, or *PTEN* (Bertier *et al.*, 2016).

On the other hand, the identification of those mutated genes, which are not present in the normal cells of the organism, would allow the pharmaceutical industry to find potential therapeutic targets for cancer cells, reducing the incidence of adverse reactions and thus improving the adherence to treatments.

Through pharmacogenomic studies it has been possible to identify that gene variation in drug metabolizing enzymes, drug transporters and drug targets alter the therapeutic outcome of the anti-cancer drugs (Hossain *et al.*, 2017). For example, tamoxifen is required to be metabolized into endoxifen via *CYP2D6* before it can exhibit its effects, for this reason individuals with polymorphism in *CYP2D6* exhibit considerable variability in the effect of this medication (Chan *et al.*, 2017). On the other hand, Irinotecan is also a pro-drug and should be converted to its active metabolite, SN-38, which is then metabolized by the *UGT1A1* enzyme for further excretion, however patients with *UGT1A1**28 genotype have a risk factor for severe neutropenia due to accumulation of this metabolite (Hossain *et al.*, 2017).

Finally, the study of mutations associated with therapy resistance has been another important application of genomics. For example, Razavi *et al.* (2018) investigated associations between genomic aberrations and response to therapy in 1,501 breast tissue samples (HR+HER2) and they found that *ESR1*, *ERBB2* and *NF1* were the genes most commonly associated with endocrine resistant tumors.

Epigenomics

Epigenetics refers to the study of gene function and regulation alterations without changes in the DNA sequence of the genome. The main epigenetic modifications are DNA methylation, histone modifications and small noncoding RNAs (Ornellas *et al.*, 2017). Epigenomics is the study of the complete set of epigenetic modifications.

DNA methylation is the first epigenetic modification to be associated with cancer and the most widely studied. A methyl group is transferred by enzyme DNA-methyltransferase to the 5-position of cytosine. CpG islands are regions of DNA and constitute approximately 60% of the promoters of mammalian genes. In these regions there is a high concentration of cytosine and guanine pairs. Hypermethylation of CpG islands induces gene silencing as a result of blocking the binding site of transcription factors and the transcription machinery, it also functions as a binding site for repressive transcription complexes (Zhu *et al.*, 2005).

A family of proteins with a methyl-CpG-binding domain (MBDs) are strongly involved in the interpretation of information encoded by DNA methylation and recruitment of enzymes responsible for establishing a silence state of chromatin (Hendrich, 1998). For example, López-Serra and Esteller (2008) found in an *in vitro* assay that removal of MBDs results in a release of gene silencing associated with a loss of MBD occupancy in 5'-CpG islands, without any change in the DNA methylation pattern (Ballestar *et al.*, 2008).

In cancer, the promoter CpG islands of many tumor suppressor genes become hypermethylated affecting cell cycle, apoptosis, cell adherence and DNA repair (López-Serra and Esteller, 2008). For example, genes such as *p16*, *ink4a*, *hMLH1* and *BRCA1* are silenced in many types of cancer. Specifically, hypermethylation of the *BRCA1* CpG island occurs mainly in breast and ovarian cancer (Esteller, 2008).

Histones are nuclear proteins associated with DNA molecules which are positively charged at physiological pH (Pasculli *et al.*, 2018). Histone acetylation is a reversible reaction consisting in addition of an acetyl group to an amino acid residue. The enzymes which catalyse these reactions are the histone acetyltransferases (HAT) and the histone deacetylase (HDAC). The acetylation of histones by HAT neutralizes their positive charge, reducing the affinity of the histone tail with negatively charged DNA. As a result, chromatin adopts a more relaxed structure, enabling the recruitment of the transcriptional machinery. This reaction is reversed by HDACs (Hyun-Jung and Suk-Chul, 2011).

The role of histone acetylation in breast cancer has been strongly studied and it has been found that it

promotes the expression of certain genes, which can cause breast cancer. P300 is a HAT which leads to some gene activation including several oncogenic. Heightened *p300* expression has been observed in primary human breast cancers (Guo *et al.*, 2018). On the other hand, it has been found that in normal breast tissue, the expression of some HDAC, such as SIRT1, is significantly lower than in breast cancer tissue and, for this reason, this enzyme has been associated with the development of breast cancer (Guo *et al.*, 2018).

Another important histone modification is methylation, which takes place at lysine and arginine residues and is carried out by histone methyltransferases (HMTs) which transfer a methyl group to these amino acids (Tryndyak *et al.*, 2006). This epigenetic modification plays an important role in chromatin remodeling and transcriptional activity, with activation or repression of transcription, depending on the position of methylation (Dumitrescu, 2012).

Changes in histone marks have been associated with malignant transformation and metastatic behavior in *in vitro* studies. For example, an increase in histones H3K9me3 (associated with compacted chromatin) was observed in the triple negative breast cancer, suggesting that it may be linked to an increased metastatic potential. In addition, LSD1 (Lysine-specific histone demethylase) is highly expressed in estrogen receptor negative breast cancer and was associated with a more aggressive behavior (Pasculli *et al.*, 2018).

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs which usually have 20–25 nucleotides. They are transcribed by RNA polymerase II and act by repressing gene expression by binding to regions of a target messenger RNA. Recent studies show that some miRNAs regulate cell proliferation and apoptosis processes that are important in cancer formation. Furthermore, overexpressed miRNAs in cancers may function as oncogenes and promote cancer development by negatively regulating tumor suppressor genes that control cell differentiation or apoptosis (Rufino-Palomares *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017). Several investigations regarding to miRNA profiling has led to the identification of changes in miRNAs expression levels in human breast cancer (Zhang *et al.*, 2017).

The extensive and frequent hypermethylation of miRNA genes in human breast cancer supports the concept that epigenetic instability is an important early event in human tumorigenesis. Considering the presence of miRNA gene hypermethylation in breast cancer, it could serve as an epigenetic marker (Saito *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2017).

Nutrigenomics

Nutrigenomics relates the genomic and nutrition of a person. Thereby, ingested food can modify the gene expression patterns, resulting in potential benefits or adverse effects in the health of individuals (Kohlmeier *et al.*, 2016).

Inherited cancers through a germinal line represent 5% of the total cases, the remaining 95% originate sporadically from exposure to environmental factors. In breast cancer only between 5 and 10% of the cases correspond to some inherited susceptibility, thus food habits are considered a potential constituent within environmental factors (Mathers, 2004).

There are several studies that relate breast cancer with nutrition, but these are not conclusive due to the molecular complexity involved and the large number of components contained in diets. Moreover, bioactive food compounds can interact with genes affecting transcription factors, protein expression and metabolite production (García *et al.*, 2010). Research supports the fact that the absence of intake of natural protective components may be associated with carcinogenic diseases (Ross, 2007; Bissoondath *et al.*, 2018).

Studies on sporadic breast cancers have shown that bioactive components present in fruits and vegetables can prevent carcinogenesis by several mechanisms, such as blocking metabolic activation by increasing detoxification. Some examples of these natural compounds with inhibitory effects on tumorigenesis include isothiocyanates, catechins, resveratrol, curcuminoids, procyanidins, isoflavones and antioxidant vitamins (Keum *et al.*, 2004). On the other hand, it has also been reported that the high consumption of meats and saturated fatty acids is associated with an increased breast cancer risk (Ross, 2007; Bissonauth *et al.*, 2008).

These studies also stand out benefits of vitamin E, which presents chemopreventive effects on breast epithelial cells, including inhibition of growth, differentiation and protection against various cellular stresses. Soy intake has shown a lower risk of cancer in women who have consumed it during puberty, compared to women living in Western and Asian low-consumption countries (Lee *et al.*, 2009).

In the same sense, daidzein (isoflavone present in soy) has been shown to inhibit the growth of cancer cells, inhibiting cell migration and invasion induced by TNF- α (tumor necrosis factor) in human breast cancer cells (Ramasamy *et al.*, 2017). Another isoflavone, genistein, is associated with increased expression of breast tumor suppressors PTEN and E-cadherin, thus genistein treatment for BRCA1 succeeds in silencing breast cancer cells. Additionally, its inhibitory action on estrogen receptors and its associated vascular endothelial growth

factor (VEGFR) has also been reported (Bhat *et al.*, 2021).

HER-2 is expressed in breast cancer, receiving much attention from anti-HER-2 monoclonal antibodies (trastuzumab). The accessibility of its extracellular domain makes it ideal for the delivery of antitumor drugs, which is why several artificial ligands targeting HER-2 have been developed (Tai *et al.*, 2010). In addition, gamma linolenic acid (GLA) is an essential type of omega-6 fat that can inhibit the action of the HER-2 cancer gene. Therefore, it is proposed as a valuable therapy against breast cancer, especially for its selective antitumor properties (Kenny *et al.*, 2000).

On the other hand, there is enough scientific evidence that alcoholic drinks are a carcinogenic agent and have been classified as group 1 (highly carcinogenic) by the International Agency for Research on Cancer. Furthermore, they have been responsible of, among many other diseases, breast cancer in women (Carcinogenic Risks to Humans, 2007).

Finally, it is necessary to mention that several bioactive compounds of food can control the patterns of gene expression and that their influence on the transcription and translation of genes depends not only on the concentration but also on the time of consumption.

Transcriptomics

Transcription is the process of converting DNA to RNA. This RNA can follow different paths, such as being translated into peptides to be used as a guide for protein synthesis or assist in gene regulation and enzymatic activity of cells. Transcriptome, by definition, is the collection of all RNA in a cell, and transcriptomics is the examination of these RNA. Transcriptome has various types of RNA, such as mRNA, non-coding RNA (which became a hot spot for breast cancer research in the past) (Shi *et al.*, 2017) and small RNA. Long non-coding RNAs are also thought to be involved in many diseases, including breast cancer (Liu *et al.*, 2016). Transcriptomic techniques help to profile, localize, and process transcriptomes, as well as to perform post-transcriptional modifications and decode RNA.

An important element for transcriptomic analysis of cancer is gene expression. This is the study of gene activity, going from DNA to proteins. Especially, the oncogene analysis is very useful in understanding the processes that drive cancer. Generally, the use of cDNA libraries and oligonucleotide microarrays allow the study of oncogenes.

cDNA is a type of DNA obtained using extracted mRNA as a template. This process requires reverse transcriptase enzymes (Hawkins *et al.*, 2003). These DNA are complementary to mRNA fragments and are

used to study gene expression through a solid surface, in a process called hybridization. This process involves attachment of cDNA to specific locations that match with their respective mRNA. If mRNA is fluorescently labeled, it is possible to measure different intensities from each location. cDNA sequencing is used in obtaining quantitative gene expression, which in turn helps to identify 'malfunctioning' genes in various pathological states (Wanling *et al.* 2009).

Oligonucleotide microarrays are utilized to obtain better hybridization results, by using synthetically created DNA. With this process, it was determined that there are two overexpressed genes related to breast cancer: histone *H2AFJ*, that makes up the nucleosome and plays a central role in the control of DNA transcription (Rendon *et al.*, 2021) and epidermal growth factor receptor kinase substrate 8 (*EPS8*), that participates in the signaling pathway of the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) (Chen *et al.*, 2015). As the results show, cDNA arrays are useful to identify any possible problem related to breast cancer.

In addition, with genomic techniques such as microarrays, next-generation sequencing and whole-exome sequencing, breast cancer diagnosis is going through a significant evolution. Molecular diagnostic assays, such as MammaPrint® or Oncotype DX®, allow to identify genetic mutations (Abreu *et al.*, 2014). Companies such as Exact Sciences (2018) offer the Oncotype DX breast cancer test which examines the activity of 21 genes in the patient's breast tumor tissue in order to provide an accurately diagnosis. Once the mutations in the patient's tumor genome have been identified, the next step is to find those that are targetable by a therapeutic agent (Sauter, 2018; Abreu *et al.*, 2014). This information could be obtained with the use of pharmGKB, an online resource that provides a list of most, if not all, pharmacogenomics agents approved or under consideration by the FDA, EMA, and others (Bertier *et al.*, 2016). On the other hand, Mamma Print examines the expression of 70 genes linked to different pathways of control of apoptosis, being recommended as a predictive tool for chemotherapy by the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) and the American Society of Clinical Oncology (ASCO) (Zeng and Zhang, 2022).

Furthermore, RNA-sequencing is one of the next generation sequencing techniques. This process involves creating cDNA libraries from known RNA sequences. These cDNA are studied and classified. According to Kuo-Hua *et al.* (2018), this method can have advantages over microarrays, as it has an expansive coverage, which allows study of novel coding and non-coding transcripts. These cDNA fragments can be either compared with reference sequences or reassembled to find out the

whole RNA sequence.

On the other hand, gene expression profile has been useful for classifying breast cancers into subgroups. After analyzing 85 tissue samples, Sorlie *et al.* (2001) suggested that breast cancer could be subdivided into: (1) luminal and its subtypes: A estrogen receptors, B progesterone receptors, C the type of treatment that corresponds will depend on the luminal subtype, and (2) estrogen receptor positive group (ER+), HER2 positive (Her2+) and Triple-negative breast cancer (TNBC). The latter is subdivided into six subtypes, displaying unique gene expression and ontologies, including two basal-like (BL1 and BL2), one immunomodulatory (IM), one mesenchymal (M), one mesenchymal stem-like (MSL), and one luminal androgen receptor (LAR) subtype (Lehmann *et al.*, 2011). However, there are other TNBC classifications: luminal androgen receptor (AR; LAR), mesenchymal (MES), basal-like immunosuppressed (BLIS), and basal-like immune-activated (BLIA) (Burstein *et al.*, 2015). This has made the classification of breast cancer more complex, but it has also opened up new lines of research and treatment.

Proteomics

Cells contain the same genome, but they express different proteins responding to a specific micro-environment. The function of proteins depends on their correct amino acid sequence, their post-translational modifications, their three-dimensional structure, their concentration, their interactions with other proteins and the extracellular environment. These characteristics make their experimental analysis difficult (Pando-Robles and Lanz-Mendoza, 2009). Cancer-relevant proteomics is based on finding differentially expressed protein markers in tumors and new therapeutic targets.

Different methodologies can be combined in proteomic studies. The most commonly used methods involve protein extraction from the sample, separation by one-dimensional (1-D) or two-dimensional (2-D) electrophoresis or liquid chromatography, ionization through Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization or Electrospray Ionization (Barbosa *et al.*, 2012), fragmentation, peptide analysis and detection through techniques such as mass spectrometry or nuclear magnetic resonance (Qingjun *et al.*, 2016), and data analysis.

In a recent study, researchers quantified by high-resolution mass spectrometry more than 12,000 proteins and 33,000 phosphorylation sites and performed an atypical analysis of the phosphorylation states of the kinase enzyme. They found aberrantly activated kinases in breast cancer samples, such as HER2, CDK12, PAK1, PTK2, RIPK2, and TLK2. With these results, scientists

hope to identify more druggable kinase proteins, in addition to HER2, which can be targeted with trastuzumab (National Cancer Institute, 2018).

Other researchers analyzed the proteome of triple-negative breast cancer and found six kinases that, when inhibited by drug combinations, achieved a survival rate greater than 93% (Zagorac *et al.*, 2018). In this way it is evident that through the methods of proteomics it is possible to identify potential therapeutic targets in the treatment of breast cancer.

In addition, through proteomic methods it is possible to find novel biomarkers for risk assessment, screening, early diagnosis and monitoring breast cancer progression. For example, it is possible to identify proteins secreted from cancer cells in response to the tumorigenic process in serum or plasma (Mardamshina and Geiger, 2017). The risk of breast cancer recurrence can be tested through the use of serum tumor markers such as carcinoembryonic antigen (CEA) and Ca 15.3 (MUC-1 mucin glycoproteins) (Drake *et al.*, 2011) which are increased before symptoms or clinical signs appear. Particularly, CEA is a non-specific serum biomarker that is elevated in various malignancies such as breast cancer (Kankanala and Mukkamalla, 2023)

In general, through proteogenomic analysis of breast cancer it is possible to elucidate the functional consequences of somatic mutations, to narrow candidate nominations for driver genes within large deletions and amplified regions, and to identify therapeutic targets (Mertins *et al.*, 2016).

Metabolomics

The message in an organism's DNA (genome) is transcribed into RNA (transcriptome), which is translated into proteins (proteome), participating in the formation of small molecules known as metabolites. Therefore, alterations in the genes could cause changes in the metabolic profile, which can facilitate the development of cancer (Subramani, 2022).

Thus, metabolomics studies focused on the analysis of metabolites, offer information on the changes that occur during the development and progression of cancer, through the identification of biomarkers, that can even be used as therapeutic targets (Hart *et al.*, 2016).

The assessment of metabolites can be carried out using techniques such as: gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) (Alakwaa *et al.*, 2018). These techniques are used to identify metabolites, which will be correlated with a certain phenotype (physiological or alteration). In this task it is feasible to use databases that allow a better correlation.

The metabolome of cancer is made up of both oncological metabolites and those that arise from the body's systemic response. In particular, cancer cells need abnormal growth and proliferation rates, which require supplements of metabolic precursors for proliferation, angiogenesis, epithelial transition to mesenchyma and even mitochondrial metabolism (Subramani, 2022).

In breast cancer, more than 30 endogenous metabolites are identified in the breast tissue, which include: elevated choline, glycerophosphocholine, low glucose and lactate increase (Aboud and Weiss, 2013), as well as alterations in glutamine levels (Alakwaa *et al.*, 2018), lipids and serine (Mikó *et al.*, 2019).

Particularities are also found in (1) carbohydrates: metabolites such as ATP, acetyl-coA and NAD regulate post-translational modifications that negatively affect protein activity and counteract normal biological pathways (Fuchinoue *et al.*, 2015). (2) lipids: increased cell growth and tumor formation require increased lipid synthesis and absorption, so lipogenesis is essential in tumor growth (Eghlimi *et al.*, 2020). (3) amino acids: the metabolism of glutamine (its derivatives: citrate, fumarate and malate), Na⁺-dependent transporters, the amino acid transport system (alanine, serine and cysteine), are associated with oxidative damage and overproduction of free radicals associated with genetic diseases (Subramani, 2022). In sum, the consumption and use of carbohydrates, lipids and amino acids help to maintain the growth of cancer cells.

Metabolomics provides knowledge of the dynamic changes that occur in cancer cells, in order to identify early biomarkers that can allow sensitive and specific detection for breast cancer diagnosis (Jasbi *et al.*, 2019). However, there are numerous challenges in the extraction and identification of metabolites, so it is still an emerging field.

CONCLUSIONS

Omics are high-throughput technologies which, given its versatility and integrity, have allowed to offer a new perspective in the understanding of the molecular mechanisms that govern the susceptibility, occurrence and progression of breast cancer. Among the most important applications of these technologies is the identification of potential biomarkers, which could be aberrant genes, modified proteins, epigenetic alterations or oligonucleotide RNA chains that are expressed in cancer cells but not in normal cells. Using these biomarkers, we can implement prevention strategies, making an early diagnosis of the disease, identifying potential therapeutic targets in order to achieve more effective treatments than conventional therapies and studying the mutations involved in drug

resistance. Finally, using these technologies we can study the contribution of external factors (such as diet) in epigenetic modifications which could increase our susceptibility to develop breast cancer. In any case, much of the treatment is based on specific molecular targets and inhibitors of DNA signaling or repair pathways, with chemotherapy being a conventional complementary treatment.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All the authors listed above have made substantial, direct, and intellectual contributions to the work and have approved it for publication.

FINANCING

Self-financed.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare not to have any conflict of interest.

REFERENCES

- Aboud O., Weiss R. (2013) New opportunities from the cancer metabolome. *Clin. Chem.* 59(1): 138–146. DOI:10.1373/clinchem.2012.184598
- Abreu F., Schwartz G., Wells W., Tsongalis G. (2014) Personalized therapy for breast cancer. *Clin. Genet.* 86(1): 62–67. DOI:10.1111/cge.12381
- Alakwaa F., Chaudhary K., Garmire L. (2018) Deep learning accurately predicts estrogen receptor status in breast cancer metabolomics data. *J. Proteome Res.* 17(1): 337–347. DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00595
- Ballestar E., Ropero S., Setien F., Billard L., Fraga M., Alaminos M. (2008) Unmasking of epigenetically silenced candidate tumor suppressor genes by removal of methyl-CpG-binding domain proteins. *Oncogene*, 27(1): 3556–3566. DOI: 10.1038/sj.onc.1211022
- Barbosa B, Vidotto A, Mussi G, Henrique T, Trono A, Tajara E. (2012) Proteomics: methodologies and applications to the study of human disease. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 58(3): 366–375. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22735231/>
- Barh D. (2014) Next-generation T. Omics Approaches in Breast Cancer. Springer.
- Bhat S., Prasad S., Shivamallu C., Prasad K, Syed A., Reddy P., Cull C., Amachawadi R. (2021) Genistein: A Potent Anti-Breast Cancer Agent. *CIMB*, 43(3): 1502–1517. DOI:10.3390/cimb43030106
- Bertier G., Carrot-Zhang J., Ragoussis V., Joly Y. (2016) Integrating precision cancer medicine into healthcare-policy, practice, and research challenges. *Genome Med.* 8(1): 108. DOI:10.1186/s13073-016-0362-4
- Bissonauth V., Shatenstein B., Ghadirian P. (2008) Nutrition and breast cancer among sporadic cases and gene mutation carriers: an overview. *Cancer Detection and Prevention*, 32: 52–64. DOI:10.1016/j.cdp.2008.01.005
- Burstein M., Tsimelzon A., Poage G., Covington K., Contreras A., Fuqua S., Savage M., Osborne C., Hilsenbeck S., Chang J., Mills G., Lau C., Brown

- P. (2015) Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 21(7): 1688–1698. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-14-0432
- Carcinogenic Risks to Humans (2007). Alcohol consumption and ethyl carbamate. *International Agency for Research on Cancer*, 96(1): 31–33.
- Chan C., Law B., So W., Chow K., Wayne M. (2017) Novel strategies on personalized medicine for breast cancer treatment: An update. *Int. J. Mol. Sci.* 18(11): 2423. DOI:10.3390/ijms18112423
- Chen C., Liang Z., Huang W., Li X., Zhou F., Hu X., Han M., Ding X., Xiang S. (2015) Eps8 regulates cellular proliferation and migration of breast cancer. *Int. J. Oncol.* 46(1): 205–214. DOI: 10.3892/ijo.2014.2710
- Drake R., Cazares L., Jones E., Fuller T., Semmes O., Laronga C. (2011) Challenges to Developing Proteomic-Based Breast Cancer Diagnostics. *OMICS A Journal of Integrative Biology*, 15(5): 251–259. DOI:10.1089/omi.2010.0120
- Dumitrescu R. (2012) DNA methylation and histone modifications in breast cancer. *Cancer Epigenetics: Methods and protocols*, 863: 35–45. DOI:10.1007/978-1-61779-612-8_3.
- Eghlimi R., Shi X., Hrovat J., Xi B., Gu H. (2020) Triple Negative Breast Cancer Detection Using LC-MS/MS Lipidomic Profiling. *J. Proteome Res.* 19(6): 2367–2378. DOI:10.1021/acs.jproteome.0c00038
- Esteller M. (2008) Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 358(11): 1148–1159. DOI:10.1056/NEJMra072067
- Exact Sciences (2018), accessed November 23, 2023. <https://www.exactsciences.com/>
- Feng Y., Spezia M., Huang S., Yuan C., Zeng Z., Zhang L., Ji X., Liu W., Huang B., Luo W., Liu B., Lei Y., Du S., Vuppapapati A., Luu H., Haydon R., He T.C., Ren G. (2018) Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* 5(2): 77–106. DOI:10.1016/j.gendis.2018.05.001
- Fuchinoue F., Hirotani Y., Nakanishi Y., Yamaguchi H., Nishimaki H., Noda H., Tang X.Y., Iizuka M., Amano S., Sugitani M., Nemoto N., Masuda S. (2015) PGC1 α and p62 in apocrine carcinoma. *Pathol. Int.* 65(1): 19–26. DOI:10.1111/pin.12235
- García V., Simó C., León C., Cifuentes A. (2010) Advances in Nutrigenomics research: Novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51(2): 290–304. DOI:10.1016/j.jpba.2009.04.019
- Global Cancer Observatory (2023). International agency for research on cancer. <https://gco.iarc.fr/>
- Goncalves R., Warner W., Luo J., Ellis M. (2014) New concepts in breast cancer genomics and genetics. *Breast Cancer Research*, 16(5):460. DOI:10.1186/s13058-014-0460-4
- Guo P., Chen W., Li H., Li M., Li L. (2018) The Histone Acetylation Modifications of Breast Cancer and their Therapeutic Implications. *Pathol. Oncol. Res.* 24(4): 807–813. DOI:10.1007/s12253-018-0433-5
- Hart C., Tenori L., Luchinat C., Di-Leo A. (2016) Metabolomics in Breast Cancer: Current Status and Perspectives. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 882: 217–234. DOI:10.1007/978-3-319-22909-6_9
- Hawkins P., Jin P., Fu G. (2003) Full-Length cDNA Synthesis for Long-Distance RT-PCR of Large mRNA Transcripts. *BioTechniques*, 34(4): 768–773. DOI:10.2144/03344st06
- Hendrich B. (1998) Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl- CpG Binding Proteins. *JCB.* 18(11): 6538–6547. DOI: 10.1128/MCB.18.11.6538
- Hossain A., Siddique A.B., Aunig R.B.Z. (2017) Pharmacogenetics: Focus on Breast Cancer Treatment. *J. Neoplasm*, 2(2): 1–3. DOI:10.217672576-3903.100013
- Hyun-Jung K., Suk-Chul B. (2011) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am. J. Transl. Res.* 3(2): 166–179. PMC3056563
- Jasbi P., Wang D., Cheng S., Fei Q., Cui J., Liu L., Wei Y., Raftery D., Gu H. (2019) Breast cancer detection using targeted plasma metabolomics. *Journal of chromatography B*, 1105: 26–37. DOI:10.1016/j.jchromb.2018.11.029
- Kankanala V., Mukkamalla S. (2023) Carcinoembryonic Antigen. *StatPearls. Treasure Island*, accessed November 23, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK578172/>
- Kenny F., Pinder S., Ellis I., Gee J., Nicholson R., Bryce R., Robertson J. (2000) Gamma linolenic acid with tamoxifen as primary therapy in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 85(5): 643–648. DOI:10.1016/S0959-8049(98)80070-1
- Keum Y., Jeong W., Kong A. (2004) Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat. Res.* 555(1-2): 191–202. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.05.024
- Koboldt D., Fulton R., McLellan M., Schmidt H., Kalicki-Veizer J., McMichael J. (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 490(1): 61–70. DOI:10.1038/nature11412
- Kohlmeier M., Robin L., Prasad C., Ferreira F. (2016) Guide and Position of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics on Personalized Nutrition: Part 2 - Ethics, Challenges and Endeavors of Precision Nutrition. *J. Nutrigenet Nutrigenomics*, 9(1): 28–46. DOI:10.1159/000446347
- Kuo-Hua M., Wei-Chung C., Shu-ChiW., Shih-Hua F., Hung-Pin T., Chia-Cheng S., Yung-Li H., Po-Len L., Chi-Shuo C., Yu-Ting W., Chia-Yang L. (2018) RNA-Seq Transcriptome Analysis of Breast Cancer Cell Lines under Shikonin Treatment. *Sci. Rep.* 8(1): 1–11. DOI:10.1038/s41598-018-21065x
- Lee S., Shu X., Li H., Yang G., Cai H., Wen W., Ji B.T., Gao J., Gao Y.T., Zheng W. (2009) Adolescent and adult soy food intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Women's Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 89(6): 1920–1926. DOI:10.3945/ajcn.2008.27361
- Lehmann B.D., Bauer J.A., Chen X., Sanders M.E., Chakravarthy A.B., Shyr Y., Pietenpol J.A. (2011) Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Investig.* 121(7): 2750–2767. DOI:10.1172/JCI45014
- Liu Y., Jiang Y., Xu X., Zuo W., Yu K., Jin X., Hu X., Wu J., Liu G., Di G., Shao Z. (2016) Abstract P6-04-04: Comprehensive Transcriptome Analysis Identifies Novel Molecular Subtypes and Subtype-Specific lncRNAs of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* 76(4). DOI:10.1158/1538-7445.sabcs15-p6-04-04
- López-Serra L., Esteller M. (2008) Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br. J. Cancer*, 98(12): 1881–1885. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604374
- Mardamshina M., Geiger T. (2017) Next-Generation Proteomics and Its Application to Clinical Breast Cancer Research. *Am. J. Pathol.* 187(10): 2175–2184. DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.07.003
- Mathers J. (2004) The biological revolution – towards a mechanistic understanding of the impact of diet on cancer risk. *Mutat. Res.* 551(1-2): 43–49. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.01.011
- Mertins P., Mani D., Ruggles K., Gillette M., Clauser K., Wang P., Wang X., Qiao J., Song C., Petralia F., Kawaler E., Mundt F., Krug K., Tu Z., Lei J., Gatza M., Wilkerson M., Perou C., Yellapantula V., Huang K., Lin C., McLellan M., Yan P., Davies S. (2016) Proteogenomics connects somatic mutations to signaling in breast cancer. *Nature*, 534(1): 55–62. DOI:10.1038/nature18003
- Mikó E., Kovács T., Sebő É., Tóth J., Csonka T., Ujlaki G., Sipos A., Szabó J., Méhes G., Bai P. (2019) Microbiome—microbial metabolome—cancer cell interactions in breast cancer—familiar, but unexplored. *Cells*, 8(4): 293. DOI:10.3390/cells8040293

- National Cancer Institute (2018), accessed November 23, 2023 https://proteomics.cancer.gov/news_and_announcements/first-large-scale-proteogenomic-study-breast-cancer-provides-insight
- Ornellas F., Carapeto P., Mandarim-de-lacerda C., Aguila M. (2017) Obese fathers lead to an altered metabolism and obesity in their children in adulthood: review of experimental and human studies. *J. Pediatr.* 93(6): 551-559. DOI:10.1016/j.jpeds.2017.02.004
- Orsini A., Diquigiovanni C., Bonora E. (2023) Omics Technologies Improving Breast Cancer Research and Diagnostics. *Int. J. Mol. Sci.* 24(16): 12690. DOI: 10.3390/ijms241612690
- Pando-Robles R., Lanz-Mendoza H. (2009) La importancia de la proteómica en la salud pública. *Salud Publ. Mex.* 51(3): 386-394. DOI:10.1590/S0036-36342009000900004
- Pasculli B., Barbano R., Parrella P. (2018) Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Semin. Cancer Biol.* 51(1): 22-35. DOI:10.1016/j.semcancer.2018.01.007
- Qingjun W., Tao S., Yunfeng C., Peng G., Jun D., Yanhua F., Zhongze F., Xiaoyu S., Zhitu Z. (2016) A dried blood spot mass spectrometry metabolomic approach for rapid breast cancer detection. *Onco Targets Ther.* 11(9): 1389-1398. DOI: 10.2147/OTT.S95862
- Ramasamy K., Samayoa C., Krishnegowda N., Tekmal R.R. (2017) Therapeutic use of estrogen receptor α agonists in prevention and treatment of endocrine therapy resistant breast cancers: Observations from preclinical models. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 151: 177-194. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.08.002
- Razavi P., Chang M.T., Xu G., Bandlamudi C., Ross D.S., Vasani N., Cai Y., Bielski C. M., Donoghue M.T.A., Jonsson P., Penson A., Shen R., Pareja F., Kundra R., Middha S., Cheng M.L., Zehir A., Kandoth C., Patel R., Huberman K., Baselga J. (2018) The Genomic Landscape of endocrine-resistant advanced breast cancers. *Cancer Cell*, 34: 427-438. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.08.008
- Redon C., Schmal Z., Tewary G., Mangelinck A., Courbeyrette R., Thuret J.Y., Aladjem M.I., Bonner W.M., Rube C.E., Mann C. (2021) Histone Variant H2A.J Is Enriched in Luminal Epithelial Gland Cells. *Genes*, 12(11): 1665. DOI: 10.3390/genes12111665
- Ross S. (2007) Nutritional genomic approaches to cancer prevention research. *Exp. Oncol.* 29(4): 250-256. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18199978/>
- Rufino-Palomares E., Reyes-Zurita F., Lupiáñez J., Medina P. (2013) MicroRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors. In: Lawrie C.H. (Ed.) *MicroRNAs in Medicine*. Wiley-Blackwell, pp. 223-243.
- Saito Y., Liang G., Egger G., Friedman J., Chuang J., Coetzee G. (2006) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human. *Cancer cells*, 9(6): 435-443. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.04.020

HUMAN X-CROMOSOME NON-CODING VARIATION IN LATIN AMERICAN POPULATIONS: A REVIEW



VARIACIÓN NO CODIFICANTE DEL CROMOSOMA X HUMANO EN POBLACIONES LATINOAMERICANAS: UNA REVISIÓN

Catanesi C.I.^{1,2*}, Hohl D.M.¹, Bolzán A.D.^{2,3}

ABSTRACT

The human X-chromosome non-coding markers, such as short tandem repeats (STRs), single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertion-deletions (INDELs) and *Alu* insertions, are useful for revealing relationships among populations and for the identification of individuals. In the last decades, a number of studies have been performed to determine the genetic structure of Latin American populations by using X-chromosome markers. These studies provided useful information regarding the genetic composition of these populations and their relationship with Native American, Asian and European populations. One of the most interesting findings achieved by X-chromosome studies is the bias in the sex ratio of individuals that gave rise to the current Latin American populations, as it was previously observed through the analysis of uniparental markers, and which is undoubtedly evidenced in the differential inheritance of X-chromosome in comparison to autosomes. Besides, the genetic drift process that affected Native American populations is more pronounced in X-chromosome markers than in autosomes. The present review summarizes our current knowledge concerning X-chromosome non-coding polymorphisms studied in Latin American populations.

Key words: genetic diversity, INDEL, SNP, STR, *Alu* insertion

RESUMEN

Los marcadores no codificantes del cromosoma X humano, como las repeticiones cortas en tándem (STR), los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), las inserciones-delecciones (INDEL) y las inserciones *Alu*, son útiles para revelar la relación existente entre poblaciones, y también para la identificación de personas. En las últimas décadas, se han realizado una serie de estudios para determinar la estructura genética de las poblaciones latinoamericanas, utilizando marcadores de cromosoma X. Estos estudios proporcionaron información útil sobre la composición genética de estas poblaciones y su relación con las poblaciones nativas americanas, asiáticas y europeas. Uno de los hallazgos más interesantes logrados en estos estudios es el sesgo en la proporción de sexos de los individuos que originaron las poblaciones latinoamericanas actuales, tal como se observó previamente a través del análisis de marcadores uniparentales, y que queda evidenciado por la herencia diferencial del cromosoma X en comparación con los autosomas. Además, el proceso de deriva genética que afectó a las poblaciones nativas americanas actuó de manera más pronunciada en los marcadores del cromosoma X que en los autosomas. La presente revisión resume nuestro conocimiento actual sobre los polimorfismos no codificantes del cromosoma X estudiados en poblaciones latinoamericanas.

Palabras clave: diversidad genética, INDEL, SNP, STR, inserción *Alu*


¹Laboratorio de Diversidad Genética, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), CONICET-UNLP-CIC, La Plata, Argentina

²Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, La Plata, Argentina

³Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE), CONICET-UNLP-CIC, La Plata, Argentina

Corresponding author:

Cecilia Inés Catanesi
ccatanesi@imbice.gov.ar

 ORCID 0000-0002-5970-5027

Cite this article as:

Catanesi C.I., Hohl D.M., Bolzán A.D. 2023. HUMAN X-CROMOSOME NON-CODING VARIATION IN LATIN AMERICAN POPULATIONS: A REVIEW. Journal of Basic and Applied Genetics XXXIV (2): 51-65.

Received: 02/16/2023

Accepted: 10/22/2023

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2023.34.02.05

ISSN online version: 1852-6233

INTRODUCTION

In the last decade, the human X-chromosome gained significant importance in the study of population and forensic genetics. This is due to the intrinsic properties of this chromosome, such as haplotype accessibility in males (because of its hemizyosity), lower mutation and recombination rates, and faster genetic drift due to smaller effective population size (intermediate between autosomes and Y-chromosomes) (Schaffner, 2004). For this reason, the non-coding regions of the X-chromosome exhibit a more important differentiation among populations than autosomes (Ramachandran *et al.*, 2004). Moreover, X-chromosome markers are disproportionately influenced by sex, giving an excellent opportunity for analyzing demographic differences between men and women (Casto *et al.*, 2010). In this sense, the X-chromosome helps to understand a sex bias which occurred in the past in South American populations, as Native and African components are revealed in X chromosome in a higher amount than autosome chromosomes (Wang *et al.*, 2008; Hedrick, 2017; Resano and Moral, 2018; Ongaro *et al.*, 2021).

The X-chromosome contains several types of non-coding polymorphisms distributed along its sequence. The combination of different markers can be a useful tool for analyzing microevolutionary processes that occurred in populations in the past (Pereira *et al.*, 2006; Santos-Lopes *et al.*, 2007; Di Santo Meztler *et al.*, 2018, among other reports). The most important types of X-chromosome polymorphisms are short tandem repeats (STRs), single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertion-deletions (INDELs) and *Alu* insertions. STRs -also called microsatellites- are a type of repetitive DNA markers usually comprising tandem repeats of di-, tri-, tetra- or pentanucleotide units (less than 10 bp long). They are considered hypervariable markers because they usually present a high number of alleles within populations. Their high variability makes STRs very suitable for paternity and identity tests. Therefore, several efforts have been made for generating databases of validated X-STRs with high discriminatory power and low internal variation of the repetitive sequence (Willems *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2020).

SNPs are changes of only one nucleotide in a particular position in the genome (e.g., cytosine or guanine, alternatively). They originate as biallelic markers when a point mutation occurs in a genome, converting one nucleotide into another, but tri- and tetra-allelic SNPs can also be found. A block of a few tens of kilobases in the X-chromosome can carry around 50 to 100 SNPs, therefore they are very informative markers, and easy to genotype, even from degraded DNA samples, given the short length of amplicons (Schaffner, 2004; Kidd *et al.*, 2006).

INDELs are positions in an alignment between two DNA sequences where an insertion or deletion has occurred. SNPs and INDELs offer many advantages for population studies: they are widely spread throughout the genome (including the X-chromosome), most of them derive from a single mutation event, mutation rates in both types of markers are much lower than those of repetitive markers, and they can show significant differences in allele frequencies among geographically distant populations (Li *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009; Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2009; Casto *et al.*, 2010; Ali *et al.* 2022).

Alu insertions are fragments of DNA of about 300 bp length, and are classified into 12 major subfamilies that appeared at different times during primate evolution (Kapitonov and Jurka, 1996). They are the most abundant and extensively studied class of short interspersed nuclear elements (SINEs) present in the genome, representing about 11% of the human genome (Carroll *et al.*, 2001).

The presence or absence of *Alu* elements at a particular locus gives rise to genetic polymorphisms. Usually, *Alu* polymorphisms are selectively neutral and, as their location hardly changes or rearranges, they are considered to be derived from one unique event in which the absence of the insertion is the ancestral state for *Alu* markers (Batzer *et al.*, 1994). These characteristics make the human *Alu* insertion polymorphisms a good tool for studying the genetic diversity and the evolutionary relationships among human populations (Stoneking *et al.*, 1997).

Genetic and genome studies focusing on the process of colonization of the American continent, and in the composition of Latin American populations were for several years mostly based on Y-chromosome and mitochondrial variability. More recently, these studies were focused on X-chromosome variation, and provided useful information regarding the genetic composition of Latin American populations and their relationship with American, Asian and European populations. This information has not been previously reviewed in detail. Therefore, the aim of the present review is to summarize our current knowledge concerning the X-chromosome markers in Latin American populations and their significance in terms of genetic relationships between these populations and their evolution. In the next sections we will refer in detail to the main findings concerning different X-chromosome polymorphisms in Latin American populations. A summary of the reports included in this work in reference to X-chromosome variation in Latin American populations is listed in Table 1.

Table 1. Summary of the articles included in this work listed by the first author. Type of polymorphisms, analyzed populations, and main contributions are detailed.

Reference	Type/s of polymorphism/s	Population/s analyzed	Main contributions
AguilarVelázquez et al. 2022	STRs	Mestizo (admixed) individuals from Mexico	female genotypes and male haplotypes with 100% discriminatory capacity
Amorim et al. 2011	STRs	Amerindians and admixed populations from the Central Valley of Costa Rica and Southern Brazil	Lower genetic diversity and higher proportion of linkage disequilibrium in Native than admixed populations
Baeta et al. 2021	STRs	Native American and Mestizo groups of Central America	X-chromosome database for Central American populations
Battilana et al. 2006	ALU insertions	Native American, Northern Arctic, and several other populations as outgroups	Importance of genetic flow and of dispersive processes (genetic drift and founder effects) for the differentiation of Native American populations
Bobillo et al. 2011	STRs	Argentiniens	High power of exclusion, and usefulness for kinship tests and human identification
Bryc et al. 2010	SNPs	populations from Puerto Rico, the Dominican Republic, Ecuador, and Colombia	Significant sex bias in admixture proportions. Lower linkage disequilibrium in populations of higher African ancestry
Cainé et al. 2010	STRs	Brazilians (non-Amerindians) from Rio Grande do Sul and Amerindians from Brazilian population	Pattern of variation consistent with the known historical migrations from Portugal to Brazilian region of Santa Catarina
Caputo et al. 2021	INDELS	Argentinean individuals living in urban areas	Differential ancestry contribution between autosomal and X-markers. More important Native American and African contribution in X-chromosome
Casals et al. 2022	STRs	El Salvador, Central America	Gender-biased admixture pattern, with the lowest <i>F_{ST}</i> values for El Salvador
Casto et al. 2010	SNPs	CEPH-HGDP populations (including Native American and Colombian populations)	Selection and demographic processes are partially responsible for allele frequency differences
Catanesi et al. 2007	STRs	Gran Chaco Amerindians	Genetic structure in agreement with the geographic distribution of the populations
Córdoba et al. 2012	INDELS	Colombians	European and Amerindian contribution to the current gene pool of the studied population
Cortés-Trujillo et al. 2019	STRs	Different geographic regions of Mexico	Homogeneity of variation, and usefulness for constructing a global Mexican population database (<i>F_{st}</i> <i>p</i> -value >0.05) for forensic casework
Di Santo Meztler et al. 2018	ALU insertions, INDELS and SNPs	Northeast Argentina	INDEL and SNP variation differentiate populations within the country, while Alu-insertions are helpful in ancestry studies
Di Santo Meztler et al. 2019	STR	Northeast Argentina	A high level of genetic variability, with differentiation between Native Americans and urban populations, and also between Native populations
Ferragut et al. 2019	ALU insertions and STRs	north-western Argentina	A high Native American component for Salta population. Helpful for forensic purposes in north-western Argentina
Flores-Espinoza et al. 2021	INDELS and STRs	Ecuadorian Mestizo populations	Significant levels of linkage disequilibrium between the studied markers
Freitas et al. 2010a	INDELS	Brazilian Amazon	Statistical parameters agree with estimations from other populations. Usefulness of panels for forensic use
Freitas et al. 2010b	INDELS	Brazilian Amazon and urban populations	Construction of haplotypes show different admixture models for Amerindians and urban populations
García et al. 2019	STRs	Argentiniens from all regions	High gene diversity. Provide a database for Argentiniens, with highly discriminatory genetic information
Gayá-Vidal, M. et al. 2010	ALU insertions	Native Americans from the Bolivian Altiplano	A high genetic similarity for the two studied populations, with a big differentiation from the Quechua-speakers from Peru

Table 1. (continues) Summary of the articles included in this work listed by the first author. Type of polymorphisms, analyzed populations, and main contributions are detailed.

Reference	Type/s of polymorphism/s	Population/s analyzed	Main contributions
Glesmann et al. 2013	STRs	Native American population from Argentinian Chaco	High homozygote proportion and high linkage disequilibrium found in Wichí
Gusmão et al. 2009	STRs	Argentina, Brazil, Colombia, Costa Rica, Portugal, and Spain	High discrimination power for all populations. High mean exclusion chance in duos and trios of paternity test
Homburger et al. 2015	SNPs	Colombia, Ecuador, Peru, Chile, and Argentina	Differentiation among different South American urban populations concerning Native ancestry
Ibarra et al. 2014	INDELS	Colombian populations	A highly diverse genetic background in all admixed populations. X-chromosome contributions from all continental sources
Kehdy et al. 2015	SNPs	Brazilian populations	Sex-biased mating pattern, between males with predominant European ancestry and women with predominant African or Amerindian ancestry
Leite et al. 2009	STRs	non-Amerindian Brazilians, and Amerindians from Brazil, Argentina, and Paraguay	Demographic histories have significant effects on linkage disequilibrium levels. Provide a first approach to the X-chromosome ancestry of Brazilians
Martinez et al. 2019	INDELS	Brazilian population	High diversity and a high forensic efficiency for the São Paulo population
Martins et al. 2009	STRs	Brazilian population	High power of discrimination in males and females. Usefulness in human identification
Martins et al. 2010	STRs	Southeastern region of Brazil	Differences between Brazilians and other populations, and also among different Brazilian populations. High potential for forensic purposes
Martins et al. 2017	STRs	Mato Grosso, Brazil	Usefulness of Decaplex, no need for a specific forensic database, except for the population of Rio de Janeiro
Medina-Mora et al. 2021	STRs	Mexico	Highly informative markers for use in forensic casework
Moreno-Estrada et al. 2013	SNPs	Greater Antilles, Honduras, Colombia, and three Native South American populations	A higher proportion of Native American ancestry on the X chromosome than on the autosomes
Núñez et al. 2013	STRs	Nicaragua	Usefulness of the Decaplex for forensic purposes. Warn on a possible stratification among Latin American populations, as they are not homogeneous
Ongaro et al. 2021	SNPs	American	Complexity in the post-colonial admixture dynamics
Penna et al. 2012	STRs	South Brazilian population	Particular allele frequencies, highly informative markers
Pereira and Pena 2006	STRs	Brazilian geographical regions, and several populations from the world	Strong linkage disequilibrium between certain pairs of markers useful for constructing haplotypes
Pereira et al. 2006	ALU insertions	populations from 7 regions of the world	Worldwide frequency distribution of a new polymorphic Alu insertion
Pico et al. 2008	STRs	Colombian population	High discrimination power, and high mean exclusion chance in duos and trios. Usefulness in forensic and kinship analysis
Resano et al. 2016	ALU insertions	Argentinean population	X-chromosome variation helps revealing demographic histories. Importance of Native American and African ancestry components
Resque et al. 2010	INDELS	African, European, Native American, and Brazilian populations	Usefulness for admixture estimations in Brazilian populations, and, in general, for a colonization model with sex-biased admixture
Ribeiro Rodrigues et al. 2008	STRs	Admixed Brazilian populations	Usefulness for paternity investigations and complex forensic cases
Ribeiro-Rodrigues et al. 2011	STRs	Brazilian populations	High power of discrimination, potential use in forensic and paternity casework

Table 1. (continues) Summary of the articles included in this work listed by the first author. Type of polymorphisms, analyzed populations, and main contributions are detailed.

Reference	Type/s of polymorphism/s	Population/s analyzed	Main contributions
Ribeiro-Rodrigues et al. 2009	INDELS	African, European, Native American, and Brazilian populations	Usefulness to measure ancestry proportions in three-hybrid populations
Rojas et al. 2010	STRs	Native American and admixed Colombian populations	Sex bias in admixture proportions, involving predominantly Native American women and European men
Santos-Lopes et al. 2007	ALU insertions and STRs	populations from seven regional groups worldwide	Identification of a region of low recombination rate in the long arm of the human X chromosome
Tavares et al. 2008	STRs	Brazilian population	High discrimination power, and high exclusion chance in duos and trios. Useful for forensic casework
Wang et.al 2010	STRs	Native Americans	Low diversity and high linkage disequilibrium in Native American communities
Wang et.al 2008	STRs	Mestizo populations	Marked variation in ancestry both within and between mestizo populations
Yang et.al.2010	STRs	Native American populations along American continent	A north to south gradient of decreasing population diversity

STRs

The information available on X-chromosome STRs mostly focuses on the production of local databases that render good power of discrimination for forensic purposes and in cases in which paternity testing is deficient (refer to Szibor et al., 2003; Szibor, 2007; Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2008; Gusmão *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009; Cainé *et al.*, 2010; Bobillo *et al.*, 2011; García *et al.*, 2019; Medina-Mora *et al.*, 2021; among others). For Latin American populations, several reports refer to X-STR polymorphisms mainly on admixed communities and, to a lesser extent, on native tribes. Among the first efforts analyzing X-chromosome variability, Wang *et al.* (2008) provided interesting results on the variation of a high number of STRs in 13 Latin American populations, including 29 of the markers located in the X-chromosome. This work showed the existence of a sex bias in the ancestry components of the chromosomes with different mode of inheritance, with a much higher Native American and African proportion of genetic variation in the X-chromosome than in the autosomes. This bias is present in many admixed Latin American populations, and is a consequence of the predominance of Native and/or African women, and European men giving rise to the first admixed populations at the time of colonization of the continent, given that women contribute double of X-chromosomes than men in each generation (Wang *et al.*, 2008, Hedrick, 2017).

Another important contribution on X-STRs was the study of a set of 10 markers designed by Gusmão *et al.* (2009) for comparing 11 South American populations, together with data from four European and one African population. Pairwise genetic distances showed a relationship within Argentina (Buenos Aires, Misiones, Río Negro, Córdoba, Entre Ríos, and Paraná), and within Brazil (Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro) for the populations included in the analysis. Costa Rica and Antioquia (Colombia) populations showed the shortest genetic distance with Argentinian populations, while the European populations were positioned between the Argentinian and Brazilian ones. However, particularly for Argentina, significant distances were found by Bobillo *et al.* (2011) using the same set of STRs, when comparing Argentinian with Spanish and Portuguese populations, likely because of the admixture process with Native Americans and other non-European communities living in Argentina until present. In the same way, an analysis of 12 X-STRs included in the *Investigator Argus X-12* kit (Qiagen, Germany) suggested a Native American component for the Argentinian population from Salta province. The sign of a Native American contribution was the finding of alleles which were only described for populations of South American origin in four of the 12 markers (DXS10079, DXS10134, DXS7132, and DXS10148) which are then interpreted as variants of Native American origin (Ferragut *et al.*, 2019). On the other hand, the same set of 12 X-STRs (*Investigator Argus*

X-12) was used for analyzing admixed populations from all provinces of Argentina, which notably did not show significant differences among them when they were grouped geographically in four regions (García *et al.*, 2019).

Concerning populations from Brazil, they are in a closer relationship with Africans than those of other South American countries, given the past history of intense slavery in this country. When 16 populations covering the five geopolitical regions of Brazil were analyzed using 12 X-STRs, significant values of genetic structure were found for the whole country, mainly as a consequence of differentiation from north to south of the Brazilian territory (Ribeiro-Rodrigues *et al.*, 2011). Other reports on X-STRs from different regions of Brazil complemented this information pointing out the high variability (Pereira and Pena, 2006), proven by a number of unique haplotypes and a particular diversity of each region (Martins *et al.*, 2010). It is noteworthy that some X-STR markers presented population-specific alleles such as a single-base deletion in one of the repetitive motifs, giving rise to incomplete alleles (for example, alleles named 16.3, 17.3, and 18.3 instead of alleles 17, 18, and 19 for DXS7132). These alleles were described only for individuals who were born in Brazil, and thus considered to be of a Native American origin, as they were not reported for Europeans, Asians or Africans (Gomes *et al.*, 2009; Gusmão *et al.*, 2009; Chr-XSTR.org). These singularities are due to miscegenation of different groups, being an example the population from Rio Grande do Sul, where immigrants came mainly from Portugal, Italy and Germany (Penna *et al.*, 2012), while in the Mato Grosso region the initial immigration came from Spanish and Portuguese individuals (Martins *et al.*, 2017). Similar findings were reported for populations of the north of Argentina, where important differences on native contribution (between 30% and 72%) were reported for Catamarca, Tucumán and Salta, three provinces from the northwest of the country (Wang *et al.*, 2008). Moreover, genetic distances for 10 STRs in populations of Northeast Argentina revealed the influence of both the different geographical origin of immigrants and the particular processes of settlement, separating the locality of Misión Nueva Pompeya in the province of Chaco from other populations of the same region (provinces of Corrientes and Misiones), and even from the capital city of the province of Chaco (Di Santo Meztler *et al.*, 2019).

Another factor adding variation among populations within regions of South America is the relatively elevated level of genetic drift that characterizes Amerindian populations, as it has been reported by Santos-Lopes *et al.* (2007). These authors identified seven X-STRs located on Xq21, and four of them, together with

one *Alu* insertion polymorphism (spanning a 4.7 kb interval), resulted in complete linkage disequilibrium, thus providing a highly informative X-chromosome haplotype for inferring human phylogeography. They performed a worldwide analysis of this linked block (four STRs and one *Alu* marker) in 667 males from the CEPH Human Genome Diversity Panel, representing 52 different populations from Africa, Europe, Middle East, Central and South Asia, East Asia, Oceania and America (the Karitiana Native population was excluded from the analysis), and found the lowest haplotype diversity among Americans: 0.839 (the highest in Africa: 0.992), and the highest molecular variance among populations from America (15.29%) in contrast to the lowest among Eurasian populations (1.06%) (Santos-Lopes *et al.*, 2007). The results reported for America in their work gave clear evidence of the genetic drift process that affected Native American populations which are isolated from other communities. Several other reports on STR markers also give support to the high influence of genetic drift causing a reduction in diversity, not only on the X-chromosome (Catanesi *et al.*, 2007), but also on different regions of the genome of native populations (Dejean *et al.*, 2004, Catanesi *et al.*, 2007, Demarchi *et al.*, 2009).

About Colombian population, a study on 10 X-STRs in the Department of Santander resulted in significant differences in comparison with Spanish, Peruvian, and Argentinian data (Pico *et al.*, 2008). These differences are likely due to Native American contribution, which is higher for X-chromosome markers than for autosomes, as is the case of other Latin American countries (Rojas *et al.*, 2010).

Other reports refer to Latin American populations from Central America. In a study on an admixed sample of Nicaraguan individuals, significant genetic distances were found for Native American tribes (Colla, Toba, Kichwa and Waorani), as well as for populations from Asia and Africa (Núñez *et al.*, 2013). On the other hand, Nicaraguans resulted closer to an Argentinian sample from Río Negro province, to Costa Rica, and to the Colombian department of Antioquia (Núñez *et al.*, 2013).

Another report which included admixed populations from Guatemala, El Salvador, Nicaragua, and Panama, showed that the Panama population resulted more closely related to Colombian population than to the other three Central American populations (Baeta *et al.*, 2021). In the same analysis, a Native American group from Guatemala showed signs of genetic drift and isolation, as it commonly happens with South American native communities (Baeta *et al.*, 2021).

Concerning Mexico, an analysis of five X-STRs on the admixed population from the western part of the country reported significant genetic distances in a

comparison with data from Argentina (Bobillo *et al.*, 2011), African-Americans (Diegoli *et al.*, 2014), and Brazilians (Martins *et al.*, 2017), pointing out that these results are the consequence of an important multiethnic colonization process which occurred in that part of Mexico (Medina *et al.*, 2021). This work also reported a sex bias in the genetic composition of the X-chromosome of Mexican people. Another report spanning along different regions of Mexico, performed a forensic validation of the Argus kit (Qiagen), and found certain homogeneity among subpopulations from North, South, East, and West Mexico (Cortés-Trujillo and Zuñiga-Chiquette, 2019). More recently, a study of seven X-STRs on 105 individuals from Monterrey city was performed through massive parallel sequencing (MPS), together with a group of markers located on autosomes and Y-chromosome. MPS provides a greater amount of information than other analyses, although this technique is so far infrequently used for analyzing Latin American populations (Aguilar-Velázquez *et al.*, 2022). In this study, the number of alleles reported for the population of Monterrey was higher than that of other populations from Latin America (Peru), Europe (Spain and France) and Asia (Tibet).

Other works that present X-STRs data for different Latin American countries show a similar bias in gender admixture, with X-chromosome showing a larger Native and African component than autosomes, as already described (Casals *et al.*, 2022). Particularly, El Salvador did not show any regional division within the country (Casals *et al.*, 2022).

In regard to South American Native populations, the available information on X-STRs refers predominantly to communities from Colombia, Brazil and Argentina, and, to a lesser extent, to those from other countries (Chile, Bolivia, Venezuela). Besides the phylogeographic analysis reported by Santos-Lopes *et al.* (2007), an integrative analysis from Yang *et al.* (2010) collected data from six communities from the northwest of South America (including Zenu, Wayuu, Kogi, Embera, Waunana, and Arhuaco, together with two more from Central America), four Andean (Inga, Quechua, Aymara, and Huilliche), and four southeastern (Ticuna, Aché, Guarani, Kaingang). This report compared the variation of different portions of the genome, including 38 X-STRs, and evidenced an intermediate level of diversity for X-STRs, with an important correlation between genetic variation from autosomes and the X-chromosome (77%), in contrast to what was observed between other compartments, such as the Y-chromosome and the mitochondrial DNA (1%). Besides, this work confirmed the gradient in diversity previously reported from the north to the south of the continent (Yang *et al.*, 2010).

Amorim *et al.* (2011) analyzed X-STR variation

on three native communities from Colombia (Kogi, Wayuu, and Zenu), in comparison to data from admixed populations from Costa Rica (Central Valley) and Brazil (Southern Gaucho), and described one haplotype block between Xp22.22 and Xp22.3, and a second one between Xp11.4 and Xq21.1, which were only observed in the Native populations. This particular pattern of linkage disequilibrium remarks that a process of genetic drift occurred in isolated Amerindian communities (Amorim *et al.*, 2011). This increase in linkage disequilibrium values in X-chromosome markers was also reported for Amerindians from other South American countries (Leite *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Glesmann *et al.*, 2013; Caputo *et al.*, 2021).

In the Gran Chaco region of Argentina, a study on five X-STRs showed a genetic structure for Native groups according to their geographic location, being Ayoreo and Lengua from Paraguay separated from Chorote and Wichí from the Argentinian province of Salta, and in a more southern position, from Mocoví in the province of Santa Fe (Catanesi *et al.*, 2007). In another work, a more extensive analysis of the 10 STRs reported elsewhere (Gusmão *et al.*, 2009) for the Argentinian Wichí and Mocoví communities showed high percentages of homozygosity and linkage disequilibrium. A conspicuous random reduction in the genetic variation resulted not only in significant differences when they were compared to Argentinian urban populations, but also when both native communities were compared to each other, being a typical picture of the action of genetic drift (Glesmann *et al.*, 2013).

The relatively high mutation rate of STR polymorphisms make X-STRs very helpful, not only in solving paternity cases when the alleged father is missing, but also in population studies. These genetic markers proved their usefulness in analyzing the processes of genetic flow and genetic drift that occurred within South America from the start point of colonization, ≈ 500 years before present.

SNPs

In general, linkage disequilibrium tends to form blocks of sequences extending from a few kilobases to tens of them, with a very low recombination rate. This is particularly frequent along the non-recombining region of the X-chromosome, given the absence of recombination with Y-chromosome, thus having a low recombination rate in comparison to autosomes, with a tendency to form linked haplotypes (Szibor, 2007; Gabriel 2002). Thus, a block of a few tens of kb in the X-chromosome, which probably contains between 50

and 100 SNPs, can be very informative (Schaffner, 2004).

It is widely known that admixed Latin American populations show a sex bias in genetic information other than autosomal, given the origin of admixed populations during colonization by Spaniards. This bias has been demonstrated for the X-chromosome in an analysis of arrays including more than 500,000 SNPs along the whole genome (Bryc *et al.*, 2010), where the contribution resulted clearly biased to Native American and/or African ancestry. This imbalance in sex contribution has been described in different reports for populations from The Caribe -Mexico, Ecuador, Colombia, Puerto Rico, República Dominicana, Cuba, Honduras, Haití (Moreno-Estrada *et al.*, 2013), supporting a more important contribution of native women to the current Latin American heritage.

Particularly for Argentina, and in a previous report, Seldin *et al.* (2007) determined the contribution to Argentinian's genome of three parental populations (Native American, European, and African) by selecting a set of SNPs for drawing up ancestral informative markers (AIMs). Eight out of 78 SNPs were located in the X-chromosome, including rs3747295, rs1978240, rs734329, rs5981813, rs992864, rs2380316, rs1867024, and rs762656. The global results showed a major European contribution (78%), followed by Native American (19.4%), and African (2.5%). Particularly, the X-SNPs showed a wide range of F_{ST} distances (from 0.00 to 0.92) between Native Americans and European Americans, including low F_{ST} values in some cases (e.g. rs1867024 -0.02-, rs992864 -0.05-, and rs1978240 -0.08-), intermediate F_{ST} values in some others (e.g. rs5981813 -0.31- and rs3747295 -0.33-), while other SNPs resulted with high F_{ST} values (e.g. rs2380316 -0.65-, rs734329 -0.67-, and rs762656 -0.68-). In a comparison with Argentinians, these AIMs resulted more similar to Europeans (Seldin *et al.*, 2007).

In fact, the variation observed in X-SNPs in CEPH-HGDP database is higher than in autosome SNPs, which could be explained as an effect of genetic drift, acting more intensely on X-chromosome variants (Li *et al.*, 2008). More than 16,000 SNPs from the non-pseudoautosomal region of X-chromosome were analyzed in 51 populations of the CEPH-HGDP, including Native American populations from Mexico (Pima and Maya), Colombia (Piapoco and Curripaco), and Brazil (Karitiana and Surui) (Casto *et al.*, 2010). An analysis of variance using SNPs showed a lower within-population component of the variation for X-chromosome than for autosomes. This is related to selective sweeps on X-chromosome that can occur in males, thus reducing its variability to a greater extent than for autosomes. Therefore, interpopulation differentiation can be more informative in the X-chromosome, and that is why it is

important to consider its variation in population studies.

In the case of Brazilians, not only a Native component is present in their genome but also an African one, as it was reported for three populations (Salvador, Bambuí and Pelotas) on autosome and X-chromosome SNPs (Kehdy *et al.*, 2015). The analysis of 5,729 X-SNPs plus 331,790 autosomal SNPs showed a much higher African and Native component in the X-chromosome than in autosomes. This is consistent with a major contribution of African and Native X-chromosomes to current Brazilian populations than autosomes, according to its lower recombination rate and the important contribution of non-European women to current Latin American populations. Similar findings were reported by Homburger *et al.* (2015) using 694,834 SNPs in 437 admixed individuals from five countries (Colombia, Ecuador, Peru, Chile, and Argentina), to explore the population structure and demographic history of South American Latinos. By applying ancestry-specific Principal Component Analysis, they found that most of the European ancestry in South American Latinos was from the Iberian Peninsula, even though many individuals trace their ancestry back to Southern Europe, especially within Argentina (Homburger *et al.*, 2015).

In another study on the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos (HCHS/SOL), which included people living in the United States of America, a different contribution of ancestry for 2,233 X-chromosome SNPs was reported according to the precedence of individuals. This study revealed a higher African contribution in Caribbean people from Cuba, Dominicana and Puerto Rico, and a lower African contribution in continental countries of South America and Mexico (Conomos *et al.*, 2016).

A study on different kinds of X-chromosome markers in three populations of Northeast Argentina was carried out with 15 X SNPs (rs6639398, rs5986751, rs5964206, rs9781645, rs2209420, rs1299087, rs318173, rs933315, rs1991961, rs4825889, rs1781116, rs1937193, rs1781104, rs149910, and rs652) (Di Santo Meztler *et al.*, 2018). In 198 individuals from three different locations in Northeast Argentina (Corrientes, Posadas, and Eldorado), the SNPs showed significant F_{ST} values for the comparison between Posadas and Corrientes, and also a genetic structure was found within the population of Eldorado. For this reason, it was necessary to separate Eldorado samples according to the origin of the reported grandparents into: donors who knew that their four grandparents were German and/or Swiss, and donors who did not know the origin of all four grandparents (Di Santo Meztler *et al.*, 2018). Thus, X-SNP variation was informative for differentiation within a region of the country.

According to Backenroth and Carmi (2019), sex-

biased admixture does not allow testing for Hardy–Weinberg (H-W) equilibrium on X-chromosome. Therefore, in American populations, although more than five generations have passed since colonization, some of the X-SNPs have not reached equilibrium or have been affected by lower and more recent gene flows.

Very recently, in an analysis of populations from different Latin American countries (Argentina, Barbados, Brasil, Chile, Colombia, Dominicana, Ecuador, Mexico, Perú, Puerto Rico) using SNPs located in autosomes and in the X-chromosome, Ongaro *et al.* (2021) tested different statistical methods of analysis for obtaining more evidence of the higher contribution from Native American females in X-chromosome and, inversely, the higher proportion of European male contribution in autosomes. A more important unbalanced contribution was reported for populations from Chile, Colombia and Ecuador, and less remarkable for those from Mexico and Peru (Ongaro *et al.*, 2021).

In general, the SNP polymorphisms mostly used for populational studies are biallelic, and thus it is considered that they emerged from a single mutation event in the past of the history of humanity. When it is possible to recognize the ancestral allele, SNPs can help to differentiate the origin of the populations under study, giving the possibility to differentiate the three main ancestors of current South American populations.

INDELS

In an extensive and pivotal study, Weber *et al.* (2002) identified and characterized 2,000 human diallelic INDELS distributed throughout the human genome in Europeans, Africans, Japanese, and Native Americans, where new alleles were generally lower in frequency than old alleles. The accuracy and stability of this kind of marker enable researchers to identify predecessors and descendants in historically demographic studies (Yang *et al.*, 2016).

There are several reports concerning X-chromosome INDELS polymorphisms in populations from Brazil, Colombia, Ecuador, and Argentina. Ribeiro-Rodrigues *et al.* (2009) analyzed 13 X-chromosome INDELS by PCR multiplex in different populations of Africans, Europeans, and Native Americans, revealing high inter-population variability. These authors analyzed 663 samples, including 151 African, 149 European, 176 Native American, and 187 Brazilian (from Belém), and found that these INDELS exhibited high differentiation between ancestral populations, thus allowing its use to measure ancestry proportions in three-hybrid populations, as it was the case of Belém and other Latin

American populations. The estimated proportions of X-chromosomes in an admixed population from the Brazilian Amazon region showed a predominant Amerindian contribution (41%), followed by European (32%) and African (27%) contributions. The observed 41% Amerindian contribution based on X-linked data was consistent with the expected value based on previous mtDNA and Y-chromosome information (Santos *et al.*, 1999). The Native American and African ancestry proportions in the Belém population, based on X-chromosome information, resulted in higher percentages than those previously estimated for autosomal contributions, in accordance with the sex-biased mating pattern already mentioned for Latin American admixed populations (e.g., Marrero *et al.*, 2007; Corach *et al.*, 2010, Caputo *et al.*, 2021, Flores-Espinoza *et al.*, 2021). These results are in agreement with those obtained by Wang *et al.* (2008), in an extensive analysis of 13 mestizo and 26 Amerindian populations from Latin America, where Native American and African contributions were always higher for X-chromosome than for autosomes.

In addition, Freitas *et al.* (2010a) developed a 33-INDELS marker panel for the X-chromosome in a single PCR multiplex reaction, followed by capillary electrophoresis, to genotype a sample of 351 individuals (249 males and 102 females) of a mixed population also from the Brazilian Amazon. They chose physically close markers in an attempt to identify INDEL blocks with pronounced linkage disequilibrium in allele transmission. Using these criteria, they selected six possible marker blocks. After correcting for multiple analyses, only one marker (MID3756) showed significant H-W disequilibrium. Their results demonstrated that the measurement of statistical parameters for forensic use in this population is compatible with prior estimates from other populations using current X-STR panels. The 33 X-INDELS were also analyzed in 185 individuals from indigenous tribes of the Brazilian Amazon, in order to define linkage disequilibrium between the blocks. Their results demonstrated that among the markers, only twelve pairs had significant linkage disequilibrium. These authors were able to identify seven linked groups containing two and three polymorphisms each (Freitas *et al.*, 2010b). Their results for Native American tribes differ from those previously found for the population of Belém, since the Amerindians have low intra-population genetic diversity, and different mixing models can create different patterns of linkage disequilibrium according to the population studied.

Also in 2010, Resque *et al.* analyzed a sample of 461 individuals of European, African, and Native American populations using X-chromosome markers and identified four linkage groups. The data obtained

were used to describe the ancestral contribution of populations from four different geographical regions of Brazil: north (146 from Pará state), northeast (235 from Ceará and Pernambuco states), southeast (226 from São Paulo and Minas Gerais), and south (138 from Rio Grande do Sul). These authors selected three possible marker blocks based on the following criteria: (i) physical location on the X-chromosome, with a maximum distance of 225 Kb between them; (ii) heterozygosity in parental populations >30%; and (iii) allele length variation of 2–30 base pairs. The expected heterozygosity in parental populations was larger in Africans (36.3%) and Europeans (28%) than in Native Americans (17.1%). These results were likely due to the known population reduction effect in indigenous people during the migration to the American continent. Among the admixed Brazilian populations, heterozygosity is slightly larger in samples from the northeast (41.2%) and the southeast (39.6%) than in those from the north (32.5%) and south (29.5%). In the north region, a large Native American ancestry was observed (42%). The northeast and southeast regions had low Native American contribution (27% in both of them). In the south region, there was a large European contribution (46%). Overall, the results by Resque *et al.* (2010) showed that, considering X-chromosome markers, European ancestry averaged 39%, African ancestry averaged 29%, and Native American ancestry averaged 32%. The estimates obtained were compatible with expectations for a colonization model with biased admixture between European men and Native American and African women, so the authors concluded that the 24 X-INDELS panel described by them could be a useful tool for studying interethnic admixture in Brazilian populations.

In 2019, Martinez *et al.* studied a population sample of 500 unrelated Brazilian individuals from São Paulo using 32 X-INDELS, and found no deviations from the H-W equilibrium, except for the MID1361 marker, and observed lower genetic distances when they were compared to the Colombian admixed and European populations than to Native American, Asian, or African populations. Ancestry analysis revealed 41.8% European, 31.6% African, and 26.6% Native American contributions. In conclusion, the 32 X-INDEL markers presented high variability in the São Paulo population and a high forensic efficiency. The results of genetic distance analysis and ancestry estimates showed a closer proximity of this population to European than to Native American or African populations.

On the other hand, Rojas *et al.* (2010), in one of the largest surveys of admixture carried out so far in a Latin American country, evaluated ancestry in over 1,700 individuals from 24 Colombian populations using

biparental (autosomal and X-chromosome), maternal (mtDNA), and paternal (Y-chromosome) markers. They found that autosomal ancestry varies markedly both within and between regions, confirming the great genetic diversity of the Colombian population. The X-chromosome, mtDNA, and Y-chromosome data obtained showed that there is a pattern across regions indicative of admixture involving predominantly Native American women and European and African men. In particular, eight X-linked STRs were genotyped in 385 males as previously described in detail in Collins-Schramm *et al.* (2002). These data showed that, for all populations, Native American ancestry on the X-chromosome is higher than on the autosomes. The higher Native and African ancestry estimated from X-chromosome markers, compared with autosomes, agrees with the sex-biased admixture at the origin of the populations examined inferred from the mtDNA and Y-chromosome data (Bedoya *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Moreover, Córdoba *et al.* (2012) analyzed the genetic composition of 306 residents (all males) from Cauca (Colombia) using different variants, including 34 autosomal, nine in the X-chromosome, six mitochondrial, and eight in the Y-chromosome. These authors showed that the European (average 57.3%) and Amerindian (average 32%) populations have contributed in greater proportion to the current gene pool than the African ones (10.7%). Regarding the individual mixture, these authors observed that the African component was very homogeneous in all individuals, with greater variation in the Amerindian and European contributions. In addition, Ibarra *et al.* (2014) examined 11 urban admixed populations and a Native American group called Pastos, for 32 X-INDELS to deeply understand the genetic background of Colombia. They studied 869 unrelated individuals and found a highly diverse genetic background comprising all admixed populations, harbouring important X-chromosome contributions from all continental source populations. Indeed, Colombia is genetically sub-structured, with different proportions of European and African influxes depending on the regions. The samples from the North Pacific and Caribbean coasts have a high African ancestry, showing the highest levels of diversity. The sample from the South Andean region showed the lowest diversity and significantly higher proportion of Native American ancestry than those from the North Pacific and Caribbean coasts, Central-West and Central-East Andean regions, and the Orinoquian region. The results of the admixture analysis using X-chromosome markers suggest that the high proportion of African ancestry in the North Pacific coast was primarily male driven. These men have joined to females with higher

Native American and European ancestry (likely classic colonial asymmetric mating type). This high proportion of male-mediated African contributions is atypical of colonial settings, suggesting that the admixture occurred during a period when African people were no longer enslaved. In the remaining regions, the African contribution was primarily female mediated, whereas the European counterpart was primarily male driven and the Native American ancestry contribution was not gender biased.

Concerning Argentina, Di Santo Meztler *et al.* (2019) analyzed five X-INDELS (MID193, MID1705, MID3754, MID3756 and MID1540), together with other types of markers, from three Argentinian northeast cities already mentioned above. They reported no deviations from H-W equilibrium for Posadas and Corrientes, but deviations for Eldorado were given by an internal substructuring with two groups of different origin, one showing higher similarity with European countries, and the other more similar to Posadas and Corrientes populations.

More recently, Caputo *et al.* (2021) compared data obtained using 33 X-INDELS previously reported by Freitas *et al.* (2010a) with data from 30 autosomal-INDELS chosen from previous reports (Santos *et al.*, 2009, 2015; Pereira *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2016) to analyze their potential use for ancestry determination in Argentinian populations. They were able to quantify the different contribution of Europeans, Native Americans and Africans in three regions of Argentina, being the north the region that showed much higher non-European components (38.81% European, 55.88% Native, and 5.31% African for X-INDELS), while the Centre showed intermediate values (52.96% European, 37.98% Native, and 9.06% African for X-INDELS) and the south was the region with the highest European component (64.76% European, 29.42% Native, and 5.82% African for X-INDELS). Concerning pairwise differences within populations, they found an important diversity in all three regions of the country, given by individual differences in African and Native American components (Caputo *et al.*, 2021). These authors proposed that the time since admixture and the model of admixture used for the analysis are factors involved in the differences observed when comparing ancestries from X-INDELS and autosomal-INDELS.

INDELS are considered as a unique event of insertion or, alternatively, deletion of a particular sequence of nucleotides in a precise region of the genome. Therefore, they are very helpful for recognizing different continental ancestries within a population, especially for those located in the X-chromosome, where selective sweeps have a deeper effect than in the autosomes.

ALU INSERTIONS

At present, there are only a few studies published concerning *Alu* insertion polymorphisms in the X-chromosome in Latin American populations. Pereira and Pena (2006) described a polymorphic *Alu* insertion embedded in a LINE 1 (L1) retrotransposon (*DXS225*, flanked by two microsatellites) on Xq21.3, and genotyped 684 males from the CEPH Human Genome Diversity Panel. Although this *Alu* insertion was found in all regions of the globe (namely Africa, Middle East, Central Asia, Oceania, Europe and America) only one of the five Amerindian populations studied (Karitiana) showed the insertion allele. Therefore, it is assumed that this allele has been introduced in this population by European and/or African admixture since the Karitiana had contact with European and African descendants in the early 20th century, and that it was absent from pre-Columbian Native Americans (Pereira *et al.*, 2006). In addition, the combination on the X-chromosome of a unique event polymorphism in linkage disequilibrium with two fast evolving microsatellites could make *DXS225* a valuable tool to evaluate genetic diversity of human populations and a highly informative tool for studies on human evolution. A year later, the same research group (Santos-Lopes *et al.*, 2007) increased the resolution power of their X-chromosome molecular analysis, as it has been explained in the STRs section. Through the combination of an X-*Alu* polymorphism of very low mutation rate with X-STRs of much higher mutation rate, these authors were able to support a single origin of modern man in Africa, and to identify a series of founder effects which occurred during migrations to occupy the other continents (Santos-Lopes *et al.*, 2007).

In 2010, Gayá-Vidal *et al.* investigated autosomal and X-chromosome *Alu* insertions in 192 individuals from two Amerindian populations of the Bolivian Altiplano, Aymaras and Quechuas (the two main Andean linguistic groups). Their study provided the first data on 14 X-*Alu* polymorphic elements in Native Americans, to establish if the *Alu* variation among South Amerindians exhibits some geographical or linguistic structure. These authors analyzed 18 autosomal and 14 X-*Alu* insertions. The two Bolivian samples showed a high genetic similarity for both sets of markers and were clearly differentiated from the two Peruvian Quechua samples available in the literature (Battilana *et al.*, 2006). Thus, no clear geographical or linguistic structure was found for the *Alu* variation among South Amerindians, which indicates that languages may not be congruent with the genetic features of the populations. With few exceptions (two polymorphisms), X-*Alu* insertions showed lower heterozygosity proportions compared to *Alu* insertions located in autosomes, with average values of 0.12 vs.

0.20 in Bolivian populations (Gayá-Vidal *et al.*, 2010).

Concerning Argentinians, three reports refer to X-Alu variability. Resano *et al.* (2016), analyzed 10 Alu insertions from the X-chromosome in the population from the city of Bahía Blanca (province of Buenos Aires), and found that seven of these elements were polymorphic. In a comparison of the data obtained with those from eight different populations from Africa, Europe and America, the population of Bahía Blanca resulted genetically closer to Europeans and north Africans (average genetic distances 0.106 and 0.113 respectively) than to Native Americans (0.163) and Sub-Saharan (0.247). In addition, admixture analysis indicated a similar proportion of Native American (0.472) and European (0.479) parental contribution, with minor contribution of Sub-Saharan African component (0.049). In this way, these results reported higher Native American and African contributions than previous studies.

On the other hand, Di Santo Meztler *et al.* (2018) studied 10 Alu insertions, five INDELS, and 15 SNPs to gain insight into the genetic composition of North-East Argentina populations from Posadas, Corrientes, and Eldorado cities (total: 198 unrelated individuals). No deviations from H-W equilibrium were observed for Posadas and Corrientes, but Eldorado showed significant values because of an internal heterogeneity (i.e. genetic substructuring). Indeed, two groups of different origin were distinguished, one showing higher similarity with Europeans and the other with more similarity to people from Posadas and Corrientes. Of particular interest, Alu insertions compared to INDELS and SNPs, demonstrated the most differences with data from other countries and continents, and could be of use in ancestry studies for these populations. On the contrary, INDELS and SNPs were more informative for differentiation within the country. The genetic diversity found in this work between the studied populations was similar to those referenced in the bibliography (Callinan *et al.*, 2003; Athanasiadis *et al.*, 2007; Gayá-Vidal *et al.*, 2010), except for two Alu insertions that were monomorphic in some cases, and for the Alu insertion Ya5DP13 which was invariant, similarly to previous data for European populations (Callinan *et al.*, 2003; Athanasiadis *et al.*, 2007).

A third study included the analysis of nine X-chromosome Alu insertions in populations from the northern Argentinian province of Salta, showing non-significant differentiation between rural and urban populations within the province, and a close relationship with two Bolivian Amerindian populations (Ferragut *et al.*, 2019).

In accordance with the lower rate of mutation of Alu insertions compared to other markers, they can be found as monomorphic within certain communities, and they can show an absence of marked differences

among closely related populations from South America. Therefore, X-Alu insertions are useful in ancestry studies of populations distantly related (i.e. from different countries or continents), while X-STRs, X-INDELS, and X-SNPs are more informative for differentiation within a region or country.

CONCLUSIONS AND FUTURE PROSPECTS

X-chromosome non-coding markers represent an important source of variability among populations, showing in many cases an important genetic differentiation when comparing populations of different ethnic origin. Its particular mode of inheritance makes a difference between X- and autosome variation in Central and South American populations, showing a more important Native and African contribution on X-chromosome markers than on those located in autosomes. Besides, within population variation is also important, and this advantage is taken for identification purposes, mainly for paternity cases when daughters are involved. For these reasons, the contributions on forensic markers located on the X-chromosome is currently growing, and the characterization of the different types of X-chromosome polymorphisms became very important especially when the populations under study are the result of genetic admixture.

Overall, the present review demonstrates that a bulk of information is already available for Latin American countries, although new techniques of analysis (as MPS) are still underutilized. Moreover, for some regions (for example, populations from the Patagonia, in the southernmost part of South America) and countries (for example, Perú and Paraguay) additional studies on X-chromosome non-coding variation are needed to provide a full picture of the human genetic diversity along Latin America.

BIBLIOGRAPHY

- Aguilar-Velázquez J.A., Duran-Salazar M.A., Córdoba-Mercado M.F., Coronado-Avila C.E., Salas-Salas O., Martínez-Cortés G., Casals F., Calafell F., Ramos-González B., Rangel-Villalobos H. (2022) Characterization of 58 STRs and 94 SNPs with the ForenSeq™ DNA signature prep kit in Mexican-Mestizos from the Monterrey city (Northeast, Mexico). *Mol. Biol. Rep.* 49(8):7601-7609.
- Ali A., Hussain N., Saqib Shahzad M., Ali Q. (2022) X chromosomal analysis in population genetics and forensic science: A mini review. *Genetika*, 53(3): 1379-1386.
- Amorim C.E.G., Wang S., Marrero A.R., Salzano F.R., Ruiz-Linares A., Bortolini M.C. (2011) X-Chromosomal Genetic Diversity and Linkage Disequilibrium Patterns in Amerindians and Non-Amerindian Populations. *Am. J. Hum. Biol.* 23(3): 299-304.

- Athanasiadis G., Esteban E., Via M., Dugoujon J.-M., Moschonas N., Chaabani H., Moral P. (2007) The X chromosome Alu insertions as a tool for human population genetics: data from European and African human groups. *Eur. J. Hum. Genet.* 15(5): 578-583.
- Backenroth D., Carmi S. (2019) A test for deviations from expected genotype frequencies on the X chromosome for sex-biased admixed populations. *Heredity*, 123(4): 470-478.
- Baeta M., Prieto-Fernández E., Núñez C., Kleinbielen T., Villaescusa P., Palencia-Madrid L., Alvarez-Gila O., Martínez-Jarreta B., de Pancorbo M.M. (2021) Study of 17 X-STRs in Native American and Mestizo populations of Central America for forensic and population purposes. *Int. J. Legal Med.* 135(5): 1773-1776.
- Battilana J., Fagundes N.J., Heller A.H., Goldani A., Freitas L., Tarazona-Santos E., Munkhbat B., Munkhtuvshin N., Krylov M., Benevolenskaia L., Arnett F., Batzer M., Deininger P., Salzano F., Bonatto S. (2006) Alu insertion polymorphisms in Native Americans and related Asian populations. *Ann. Hum. Biol.* 33(2): 142-160.
- Batzer M.A., Stoneking M., Alegria-Hartman M., Bazan H., Kass D.H., Shaikh T.H., Novick G.E., Ioannou P.A., Scheer W.D., Herrera R.J., Deininger P.L. (1994) African origin of human-specific polymorphic Alu insertions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(25): 12288-12292.
- Bedoya G., Montoya P., García J., Ruiz-Linares A. (2006) Admixture dynamics in Hispanics: a shift in the nuclear genetic ancestry of a South American population isolate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(19): 7234-7239.
- Bobbillo C., Sala A., Gusmão L., Corach D. (2011) Genetic analysis of 10 X-STRs in Argentinian population. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5(1): e14-16.
- Bryc K., Velez C., Karafet T., Moreno-Estrada A., Reynolds A., Auton A., Hammer M., Bustamante C.D., Ostrer H. (2010) Colloquium paper: genome-wide patterns of population structure and admixture among Hispanic/Latino populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107 (Suppl 2): 8954-8961.
- Cainé L.M., Zarrabeitia M.T., Riancho J.A., Pinheiro M.F. (2010) Genetic data of a Brazilian population sample (Santa Catarina) using an X-STR decaplex. *J. Forensic Leg. Med.* 17(5): 272-274.
- Callinan P.A., Hedges D.J., Salem A.H., Xing J., Walker J.A., Garber R.K., Watkins W.S., Bamshad M.J., Jorde L.B., Batzer M.A. (2003) Comprehensive analysis of Alu-associated diversity on the human sex chromosomes. *Gene*, 317: 103-110.
- Caputo M., Amador M.A., Sala A., Riveiro Dos Santos A., Santos S., Corach D. (2021) Ancestral genetic legacy of the extant population of Argentina as predicted by autosomal and X-chromosomal DIPs. *Mol. Genet. Genomics*, 296(3): 581-590.
- Carroll M.L., Roy-Engel A.M., Nguyen S.V., Salem A.H., Vogel E., Vincent B., Myers J., Ahmad Z., Nguyen L., Sammarco M., Watkins W.S., Henke J., Makalowski W., Jorde L.B., Deininger P.L., Batzer M.A. (2001) Large-scale analysis of the Alu Ya5 and Yb8 subfamilies and their contribution to human genomic diversity. *J. Mol. Biol.* 311(1): 17-40.
- Casals F., Rasal R., Anglada R., Tormo M., Bonet N., Rivas N., Vázquez P., Calafell F. (2022) A forensic population database in El Salvador: 58 STRs and 94 SNPs. *Forensic Sci. Int.: Genetics*, 57: 102646.
- Casto A.M., Li J.Z., Absher D., Myers R., Ramachandran S., Feldman M.W. (2010) Characterization of X-linked SNP genotypic variation in globally distributed human populations. *Genome Biol.* 11(2010): 1-19.
- Catanesi C.I., Martina P.F., Giovambattista G., Zukas P., Vidal Rioja L. (2007) Geographic structure in Gran Chaco Amerindians based on five X-STRs. *Hum. Biol.* 79(4): 463-474.
- Collins-Schramm H.E., Phillips C.M., Operario D.J., Lee J.S., Weber J.L., Hanson R.L., Knowler W.C., Cooper R., Li H., Seldin M.F. (2002) Ethnic-difference markers for use in mapping by admixture linkage disequilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 70(3): 737-750.
- Conomos M.P., Laurie C.A., Stilp A.M., Gogarten S.M., McHugh C.P., Nelson S.C., Sofer T., Fernández-Rhodes L., Justice A.E., Graff M., Young K.L., Seyerle A.A., Avery C.L., Taylor K.D., Rotter J.I., Talavera G.A., Daviglus M.L., Wassertheil-Smoller S., Schneiderman N., Heiss G., Kaplan R.C., Franceschini N., Reiner A.P., Shaffer J.R., Barr R.G., Kerr K.F., Browning S.R., Browning B.L., Weir B.S., Avilés-Santa M.L., Papanicolaou G.J., Lumley T., Szpiro A.A., North K.E., Rice K., Thornton T.A., Laurie C.C. (2016) Genetic Diversity and Association Studies in US Hispanic/Latino Populations: Applications in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *Am. J. Hum. Genet.* 98(1): 165-184.
- Corach D., Lao O., Bobbillo C., van Der Gaag K., Zuniga S., Vermeulen M., van Duijn K., Goedbloed M., Vallone P.M., Parson W., de Knijff P., Kayser M. (2010) Inferring continental ancestry of Argentinians from Autosomal, Y-chromosomal and mitochondrial DNA. *Ann. Hum. Genet.* 74(1): 65-76.
- Córdoba L., García J.J., Hoyos, L.S., Duque, C., Rojas W., Carvajal S., Escobar L.F., Reyes I., Cajas N., Sánchez A., García F., Bedoya G., Ruiz-Linares A. (2012) Composición genética de una población del suroccidente de Colombia. *Rev. Colomb. Antropol.* 48(1): 21-48.
- Cortés-Trujillo I., Zuñiga-Chiquette F. (2019) Allele and haplotype frequencies of 12 X-STRs in Mexican population. *Forensic Sci. Int.: Genetics*, 38: e11-e13.
- Dejean C.B., Crouau-Roy B., Goicoechea A.S., Avena S.A., Carnese F.R. (2004) Genetic variability in Amerindian populations of Northern Argentina. *Genet. Mol. Biol.* 27(4): 489-495.
- Demarchi D.A. (2009) Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Rev. Argent. Antropol. Biolog.* 11(1): 73-88.
- Diegoli T.M., Linacre A., Schanfield M.S., Coble M.D. (2014) Mutation rates of 15 X-chromosomal short tandem repeat markers. *Int. J. Legal Med.* 128(4): 579-587.
- Di Santo Meztler G.P., del Palacio S., Esteban E., Armoa I., Argüelles C.F., Catanesi C.I. (2018) Genetic differentiation of northeast Argentina populations based on 30 binary X-chromosome markers. *Front. Genet.* 9: 208.
- Di Santo Meztler G.P., Glesmann L.A., Esteban E., del Palacio S., Méndez M.G., Catanesi C.I. (2019) Comparative study of 10 X-STR markers in populations of Northeast Argentina. *Hum. Biol.* 91 (1): 9-14.
- Ferragut J. F., Bassitta M., Torrens V., Albeza V., Acreche N., Castro J. A., Ramon C., Picornell A. (2019) Analysis of 21 X-chromosome polymorphisms in urban and rural populations in Salta province (north-western Argentina). *Int. J. Legal Med.* 133(4):1043-1047.
- Flores-Espinoza R., Paz-Cruz E., Ruiz-Pozo V.A., Lopez-Carrera M., Cabrera-Andrade A., Gusmão L., Burgos G. (2021) Investigating genetic diversity in admixed populations from Ecuador. *Am. J. Phys. Anthropol.* 176: 109-119.
- Freitas N.S., Resque R.L., Ribeiro-Rodrigues E.M., Guerreiro J.F., Santos N.P., Ribeiro-dos-Santos A., Santos S. (2010a) X-linked insertion/deletion polymorphisms: forensic applications of a 33-markers panel. *Int. J. Legal Med.* 124(6): 589-593.
- Freitas N.S.C., Resque R.L., Ribeiro-Rodrigues E.M., Santos N.P.C., Ribeiro-dos-Santos A.K.C., Santos S.E.B. (2010b) Padrões de desequilíbrio de ligação de um painel com 33 marcadores X-INDEL em populações indígenas da Amazônia. Resumos do 56º Congresso Brasileiro de Genética, September 14th-17th, 2010, Guarujá (SP), Brasil; p. 48.
- Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., Moore J.M., Roy J., Blumenstiel B., Higgins J., DeFelice M., Lochner A., Faggart M., Liu-Cordero S.N., Rotimi C., Adeyemo A., Cooper R., Ward R., Lander E.S., Daly M.J., Altshuler D. (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, 296(5576): 2225-2229.
- García M.G., Catanesi C.I., Penacino G.A., Gusmão L., Pinto N. (2019) X-Chromosome data for 12 STRs: Towards an Argentinian

- database of forensic haplotype frequencies. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 41: e8-e13.
- Gayá-Vidal M., Dugoujon J., Esteban E., Athanasiadis G., Rodríguez A., Villena M., Vasquez R., Moral P. (2010) Autosomal and X chromosome Alu insertions in bolivian aymaras and quechuas: two languages and one genetic pool. *Am. J. Hum. Biol.* 22: 154-162.
- Glesmann L.A., Martina P.F., Catanesi C.I. (2013) Genetic variation of X-STRs in the Wichí population from Chaco province, Argentina. *Human Biology.* 85(5): 687-697.
- Gomes I., Pereira R., Mayr W.R., Amorim A., Carracedo A., Gusmão L. (2009) Evaluation of DXS9902, DXS7132, DXS6809, DXS7133, and DXS7423 in humans and chimpanzees: sequence variation, repeat structure, and nomenclature. *Int. J. Legal. Med.* 123: 403-412.
- Gomes I., Pinto N., Antão-Sousa S., Gomes V., Gusmão L., Amorim A. (2020) Twenty Years Later: A Comprehensive Review of the X Chromosome Use in Forensic Genetics. *Front. Genet.* 17(11): 926.
- Gusmão L., Sánchez-Diz P., Alves C., Gomes I., Zarrabeitia M.T., Abovich M., Atmetlla I., Bobillo C., Bravo L., Builes J., Cainé L., Calvo R., Carvalho E., Carvalho M., Cicarelli R., Catelli L., Corach D., Espinoza M., García O., Malaghini M., Martins J., Pinheiro F., João Porto M., Raimondi E., Riancho JA., Rodríguez A., Rodríguez A., Rodríguez Cardozo B., Schneider V., Silva S., Tavares C., Toscanini U., Vullo C., Whittle M., Yurrebaso I., Carracedo A., Amorim A. (2009) A GEP-ISFG collaborative study on the optimization of an X-STR decaplex: data on 15 Iberian and Latin American populations. *Int. J. Legal Med.* 123: 227-234.
- Hedrick P.W. (2017) Ancestry dynamics in a South American population: The impact of gene flow and preferential mating. *Am. J. Phys. Anthropol.* 163(3): 474-479.
- Homburger J.R., Moreno-Estrada A., Gignoux C.R., Nelson D., Sanchez E., Ortiz-Tello P., Pons-Estel B.A., Acevedo-Vasquez E., Miranda P., Langefeld C.D., Gravel S., Alarcón-Riquelme M.E., Bustamante C.D. (2015) Genomic Insights into the Ancestry and Demographic History of South America. *PLoS Genet.* 11(12): e1005602.
- Ibarra A., Restrepo T., Rojas W., Castillo A., Amorim A., Martínez B., Burgos G., Ostos H., Álvarez K., Camacho M., Suarez Z., Pereira R., Gusmão L. (2014) Evaluating the X chromosome-specific diversity of Colombian populations using insertion/deletion polymorphisms. *PLoS ONE* 9(1): e87202.
- Kapitonov V., Jurka J. (1996) The age of Alu subfamilies. *J. Mol. Evol.* 42(1): 59-65.
- Kehdy F.S., Gouveia M.H., Machado M., Magalhães W.C., Horimoto A.R., Horta B.L., Moreira R.G., Leal T.P., Scliar M.O., Soares-Souza G.B., Rodrigues-Soares F., Araújo G.S., Zamudio R., Sant Anna H.P., Santos H.C., Duarte N.E., Fiaccone R.L., Figueiredo C.A., Silva T.M., Costa G.N., Beleza S., Berg D.E., Cabrera L., Debortoli G., Duarte D., Ghirrotto S., Gilman R.H., Gonçalves V.F., Marrero A.R., Muniz Y.C., Weissensteiner H., Yeager M., Rodrigues L.C., Barreto M.L., Lima-Costa M.F., Pereira A.C., Rodrigues M.R., Tarazona-Santos E.; Brazilian EPIGEN Project Consortium (2015) Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 112(28): 8696-8701.
- Kidd K.K., Pakstis A.J., Speed W.C., Grigorenko E.L., Kajuna S.L., Karoma N.J., Kungulilo S., Kim J.J., Lu R.B., Odunsi A., Okonofua F., Parnas J., Schulz L.O., Zhukova O.V., Kidd J.R. (2006) Developing a SNP panel for forensic identification of individuals. *Forensic Sci Int.* 164(1): 20-32.
- Leite F.P., Santos S.E., Rodríguez E.M., Callegari-Jacques S.M., Demarchi D.A., Tsuneto L.T., Petzl-Erler M.L., Salzano F.M., Hutz M.H. (2009) Linkage disequilibrium patterns and genetic structure of Amerindian and non-Amerindian Brazilian populations revealed by long-range X-STR markers. *Am J Phys Anthropol.* 139(3): 404-412.
- Li C., Li M., Long J.R., Cai Q., Zheng W. (2008) Evaluating cost efficiency of SNP chips in genome-wide association studies. *Genet. Epidemiol.* 32(5): 387-395.
- Marrero A.R., Bravi C., Stuart S., Long J.C., das Neves Leite F.P., Kommers T., Carvalho C.M., Pena S.D., Ruiz-Linares A., Salzano F.M., Bortolini M.C. (2007) Pre- and post-Columbian gene and cultural continuity: the case of the Gaucho from southern Brazil. *Hum. Hered.* 64(3): 160-171.
- Martinez J., Polverari F.S., Silva F.A.J., Braganholi D.F., Ferraz J.A.M.L., Gusmão L., Cicarelli R.M.B. (2019) Genetic characterization of 32 X-InDels in a population sample from São Paulo State (Brazil). *Int. J. Legal Med.* 133(5): 1385-1388.
- Martins J.A., Costa J.C., Paneto G.G., Figueiredo R.F., Gusmão L., Sánchez-Diz P., Carracedo A., Cicarelli R.M. (2010) Genetic profile characterization of 10 X-STRs in four populations of the southeastern region of Brazil. *Int. J. Legal. Med.* 124: 427-432.
- Martins J.A., Costa J.C., Paneto G.G., Gusmão L., Sánchez-Diz P., Carracedo A., Cicarelli R.M.B. (2009) Genetic data of 10 X-chromosomal loci in Vitória population (Espírito Santo State, Brazil). *Forensic Sci. Int. Genet., Supplement Series* 2(1): 394-395.
- Martins J.A., Martins D.P., Oliveira-Brancati C.I.F., Martinez J., Cicarelli R.M.B., Souza D.R.S. (2017) Genetic characterization of an X-STR decaplex system in the State of Mato Grosso, Brazil: distribution, forensic efficiency and population structure. *Int. J. Legal. Med.* 131: 1523-1530.
- Medina-Mora Y., Javalera-Castro D., Rivas F., Valle Y., Del Toro-Arreola A., Daneri-Navarro A., Topete A., Padilla-Gutiérrez J., Quintero-Ramos A. (2021) Eficiencia de cinco marcadores X-STR para identificación forense en población mestiza del Occidente de México. *Rev. Mex. Med. Forense*, 6(2): 38-58.
- Moreno-Estrada A., Gravel S., Zakharia F., McCauley J.L., Byrnes J.K., Gignoux C.R., Ortiz-Tello P.A., Martínez R.J., Hedges D.J., Morris R.W., Eng C., Sandoval K., Acevedo-Acevedo S., Norman P.J., Layrisse Z., Parham P., Martínez-Cruzado J.C., Burchard E.G., Cuccaro M.L., Martin E.R., Bustamante C.D. (2013) Reconstructing the population genetic history of the Caribbean. *PLoS Genet.* 9(11): e1003925.
- Núñez C., Baeta M., Aznar J.M., Sosa C., Casalod Y., Bolea M., Martínez de Pancorbo M., Martínez Jarreta B. (2013) Genetic diversity of 10 X chromosome STRs in an admixed population of Nicaragua. *Forensic Science International: Genetics* 7 (2013) e95-e96
- Ongaro L., Molinaro L., Flores R., Marnetto D., Capodiferno M.R., Alarcón-Riquelme M.E., Moreno-Estrada A., Mabunda N., Ventura M., Tambets K., Achilli A., Capelli C., Metspalu M., Pagani L., Montinaro F. (2021) Evaluating the Impact of Sex-Biased Genetic Admixture in the Americas through the Analysis of Haplotype Data. *Genes*, 12 (10): 1580. <https://doi.org/10.3390/genes12101580>
- Penna L.S., Silva F.G., Salim P.H., Ewald G., Jobim M., Magalhães J.A., Jobim L.F. (2012) Development of two multiplex PCR systems for the analysis of 14 X-chromosomal STR loci in a southern Brazilian population sample. *Int. J. Legal Med.* 126(2): 327-330.
- Pereira R.W., Pena S.D.J. (2006) Phylogeography of haplotypes of five microsatellites located in a low-recombination region of the X chromosome: studies worldwide and in Brazilian populations. *Genetica*, 126: 243-250.
- Pereira R., Phillips C., Alves C., Amorim A., Carracedo A., Gusmão L. (2009) A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. *Electrophoresis*, 30(21): 3682-3690.
- Pereira R., Phillips C., Pinto N., Santos C., dos Santos S.E.B., Amorim A., Carracedo A., Gusmão L. (2012) Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One.* 7(1): e29684.
- Pereira R.W., Santos S.S., Pena S.D. (2006) A novel polymorphic Alu insertion embedded in a LINE 1 retrotransposon in the human X chromosome (DXS225): identification and worldwide population study. *Genet. Mol. Res.* 5(1): 63-71.
- Pico A., Castillo A., Vargas C., Amorim A., Gusmão L. (2008) Genetic profile

- characterization and segregation analysis of 10 X-STRs in a sample from Santander, Colombia. *Int. J. Legal Med.* 122(4): 347-351.
- Ramachandran S., Rosenberg N.A., Zhivotovskiy L.A., Feldman M.W. (2004) Robustness of the inference of human population structure: a comparison of X-chromosomal and autosomal microsatellites. *Hum. Genomics* 1(2): 87-97.
- Ramos B.R., D'Elia M.P., Amador M.A., Santos N.P.C., Santos S.E.B., da Cruz Castelli E., Witkin S.S., Miot H.A., Miot L.D.B., da Silva M.G. (2016) Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. *Genetica*, 144(3): 259-265.
- Resano M., Moral P. (2018) Mestizaje genético en las poblaciones humanas actuales de Argentina. *Revisión. Antropo.* 39: 77-96.
- Resano M., Zanetti D., Esteban E.M., Moral P. (2016) X-Chromosome Alu Insertions in Bahía Blanca, Argentina: Assessment of Population Information from Varied Genetic Markers and Usefulness of X-Chromosome Markers to Trace Sex-Biased Parental Contributions. *Hum. Biol.* 88(4): 275-286.
- Resque R.L., Freitas N.S.C., Rodrigues E.M., Guerreiro J.F., Santos N.P., Ribeiro dos Santos A., Zago M.A., Santos S. (2010) Estimates of interethnic admixture in the Brazilian population using a panel of 24 X-linked insertion/deletion markers. *Am. J. Hum. Biol.* 22(6): 849-852.
- Ribeiro-Rodrigues E.M., dos Santos N.P., dos Santos A.K., Pereira R., Amorim A., Gusmão L., Zago M.A., dos Santos S.E. (2009) Assessing interethnic admixture using an X-linked insertion-deletion multiplex. *Am. J. Hum. Biol.* 21(5): 707-709.
- Ribeiro-Rodrigues E.M., Leite F.P., Hutz M.H., Ferreira Palha T.J.B., Campos Ribeiro dos Santos A.K., dos Santos S.E.B. (2008) A multiplex PCR for 11 X chromosome STR markers and population data from a Brazilian Amazon Region. *Forensic. Sci. Int. Genet.* 2(2): 154-158.
- Ribeiro-Rodrigues E.M., Palha T.J., Bittencourt E.A., Ribeiro-Dos-Santos A., Santos S. (2011) Extensive survey of 12 X-STRs reveals genetic heterogeneity among Brazilian populations. *Int. J. Legal Med.* 125(3): 445-452.
- Rojas W., Parra M.V., Campo O., Caro M.A., Lopera J.G., Arias W., Duque C., Naranjo A., García J., Vergara C., Lopera J., Hernandez E., Valencia A., Caicedo Y., Cuartas M., Gutiérrez J., López S., Ruiz-Linares A., Bedoya G. (2010) Genetic Make Up and Structure of Colombian Populations by Means of Uniparental and Biparental DNA Markers. *Am. J. Phys. Anthropology*, 143(1): 13-20.
- Santos F.R., Pandya A., Tyler-Smith C., Pena S.D., Schanfield M., Leonard W.R., Osipova L., Crawford M.H., Mitchell R.J. (1999) The central Siberian origin for native American Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 64(2): 619-628.
- Santos V.R., Pena H.B., Pena S.D. (2015) A multiplex panel of short-amplicon insertion-deletion DNA polymorphisms for forensic analysis. *Genet. Mol. Res.* 14(2): 2947-2952.
- Santos-Lopes S.S., Pereira R.W., Wilson I.J., Pena S.D. (2007) A Worldwide Phylogeography for the Human X Chromosome. *PLoS ONE* 2(6): e557.
- Santos N.P., Ribeiro-Rodrigues E.M., Ribeiro-Dos-Santos A.K., Pereira R., Gusmão L., Amorim A., Guerreiro J.F., Zago M.A., Matte C., Hutz M.H., Santos S.E. (2009) Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum. Mutat.* 31(2):184-190.
- Schaffner S.F. (2004) The X chromosome in population genetics. *Nat. Rev. Genet.* 5(1): 43-51.
- Seldin M.F., Tian C., Shigeta R., Scherbarth H.R., Silva G., Belmont J.W., Kittles R., Gamron S., Allevi A., Palatnik S.A., Alvarellos A., Pairs S., Caprarulo C., Guillerón C., Catoggio L.J., Prigione C., Berbotto G.A., García M.A., Perandones C.E., Pons-Estel B.A., Alarcon-Riquelme M.E. (2007) Argentine population genetic structure: large variance in Amerindian contribution. *Am. J. Phys. Anthropol.* 132(3):455-462. doi: 10.1002/ajpa.20534. PMID: 17177183; PMCID: PMC3142769
- Stoneking M., Fontius J.J., Clifford S.L., Soodyall H., Arcot S.S., Saha N., Jenkins T., Tahir M.A., Deininger P.L., Batzer M.A. (1997) Alu insertion polymorphisms and human evolution: evidence for a larger population size in Africa. *Genome Res.* 7(11): 1061-1071.
- Szibor R. (2007) X-chromosomal markers: past, present and future. *Forensic Sci. Int. Genet.* 1(2): 93-99.
- Szibor R., Krawczak M., Hering S., Edelmann J., Kuhlisch E., Krause D. (2003) Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int. J. Legal Med.* 117: 67-74.
- Tavares C.C., Gusmão L., Domingues C., Domingues P., Silva D.A., Aquino J., Peixe C., Amorim A., de Carvalho E.F. (2008) Population data for six X-chromosome STR loci in a Rio de Janeiro (Brazil) sample: usefulness in forensic casework. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 1(1): 164-166.
- Wang S., Bedoya G., Labuda D., Ruiz-Linares A. (2010) Brief Communication: Patterns of Linkage Disequilibrium and Haplotype Diversity at Xq13 in Six Native American Populations. *Am. J. Phys. Anthropology*, 142(3): 476-480.
- Wang S., Ray N., Rojas W., Parra M.V., Bedoya G., Gallo C., Poletti G., Mazzotti G., Hill K., Hurtado A.M., Camarena B., Nicolini H., Klitz W., Barrantes R., Molina J.A., Freimer N.B., Bortolini M.C., Salzano F.M., Petzl-Erler M.L., Tsuneto L.T., Dipierri J.E., Alfaro E.L., Bailliet G., Bianchi N.O., Llop E., Rothhammer F., Excoffier L., Ruiz-Linares A. (2008) Geographic Patterns of Genome Admixture in Latin American Mestizos. *PLoS Genet* 4(3): e1000037. doi:10.1371/journal.pgen.1000037
- Weber J.L., David D., Heil J., Fan Y., Zhao C., Marth G. (2002) Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 71(4): 854-862.
- Willems T., Gymrek M., Highnam G., 1000 Genomes Project; Mittelman D., Erlich Y. (2014) The landscape of human STR variation. *Genome Res.* 24(11): 1894-1904.
- Yang J., He J., Wang D., Shi E., Yang W., Geng Q., Wang Z. (2016) Progress in research and application of InDel markers. *Biodiv. Sci.* 24(2): 237-243.
- Yang N.N., Mazières S., Bravi C., Ray N., Wang S., Burley M.W., Bedoya G., Rojas W., Parra M.V., Molina J., Gallo C., Poletti G., Hill K., Hurtado A., Petzl-Erler M.L., Tsuneto L.T., Klitz W., Barrantes R., Llop E., Rothhammer F., Labuda D., Salzano F.M., Bortolini M.C., Excoffier L., Dugoujon J.M., Ruiz-Linares A. (2010) Contrasting patterns of nuclear and mtDNA diversity in Native American populations. *Ann. Hum. Genet.* 74(6): 525-538.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires (CIC), and Universidad Nacional de La Plata (Proyecto I+D Bial 2019 UNLP N895), and FONCyT (PICT 2020-01075). We also thank MSc Eugenia Onaha for technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTION STATEMENT

Catanesi C.I.: literature search, manuscript writing, preparation of Table 1, manuscript review.

Hohl D.M.: literature search, manuscript writing, preparation of Table 1, manuscript review.

Bolzán A.D.: original idea, manuscript writing, manuscript review.



OBITUARIO - OBITUARY

DRA. LILIANA AMELIA PICARDI

1942-2023

Liliana nació en la primavera de 1942 en la ciudad de Rosario. Su familia luego se trasladó a ciudad de Buenos Aires por razones laborales y regresó a la ciudad de Rosario para completar sus estudios secundarios. En el año 1966 obtiene el título de Estadístico otorgado por la Universidad del Litoral. Buscando respuestas a sus frecuentes preguntas sobre biología, se acerca a la Genética y los estudios de la herencia como becaria bajo la dirección del Dr. Sol L. Rabasa en el Instituto de Investigaciones Médicas de Rosario (INIMER). A instancias de su director cursa y aprueba la asignatura Genética en la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA) de la Universidad Nacional de Rosario como estudiante vocacional. A partir de allí comienza una vertiginosa y sólida carrera en la docencia e investigación con participación activa en la Sociedad Argentina de Genética (SAG). En el año 1971 accede a un cargo docente en la cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (UNR), y aún como becaria del INIMER alcanza el título de Doctora por la UNR en 1981 bajo la dirección del Ing. Agr. Ewald Favret del Departamento de Genética del CICA – INTA Castelar. En experimentos de selección y endocría sobre poblaciones de ratones refutó los dogmas que los genetistas cuantitativos clásicos postulaban acerca de la nula variancia aditiva para aquellos caracteres que eran adaptativos o habían estado bajo selección en la evolución de una especie, como lo era la fertilidad en las hembras. Este avance en las fronteras del conocimiento sobre la Genética Cuantitativa está plasmado en varios

artículos científicos publicados en la revista Mendeliana que edita actualmente la Sociedad Argentina de Genética con el nombre de BAG. *Journal of Basic and Applied Genetics*. En búsqueda de nuevos desafíos, y ya siendo Investigadora del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario (CIUNR), cambió su modelo experimental para confirmar sus hipótesis en condiciones menos controladas y por ambientes de producción agropecuaria. Estudios básicos sobre las bases genéticas para el incremento de peso y la eficiencia en la conversión de alimento en ovinos fue la línea de investigación que llevó adelante desde la década de 1980 con pasión y excelencia. Siempre preocupada por el aporte de la Ciencia al medio socio-productivo, la línea de investigación derivó en la creación de un nuevo ecotipo ovino denominado MAGRARIO: el cordero magro de Agrarias, para el que obtuvo una marca registrada en la SAGyP en 1999. En la década de 1990 había logrado un reconocimiento a nivel nacional en la especialidad y transmitía su pasión por la Genética tanto a nivel de grado y posgrado que continuó hasta sus últimos días. Liliana participó activamente en comisiones de INTA, la Asociación Rosarina para el Fomento de la Ciencia (ARFIC), fue consejera directiva docente de la FCA-UNR (1985-1989), presidente de la Sociedad de Biología de Rosario (1989-1990) y en su querida Sociedad Argentina de Genética (SAG) ocupó cargos en varias Comisiones Directivas, fue vicepresidente en dos períodos (1986-1987 y 1988-1989), presidente (1993-1995), y miembro de su Consejo Asesor desde 1996 hasta

este año. La formación de recursos humanos y la consolidación de grupos de trabajo fue su gran obra. En 1979 junto al Ing. Agr. (Ph.D.) Alejo von der Pahlen crean la Maestría en Genética Vegetal entre la Universidad Nacional de Rosario y el INTA, que en la actualidad tiene más de 220 graduados ocupando roles destacados en programas de mejoramiento vegetal en instituciones públicas y empresas privadas tanto del país como del exterior. Su experiencia en la creación de la carrera no sólo fue la piedra angular de la actual Secretaría de Posgrado de la FCA-UNR, sino que fue capitalizada por otras Instituciones para la creación de carreras de posgrado tanto en el país como en el exterior. Liliana formuló y gestionó no sólo muchos proyectos de investigación sino también grandes proyectos institucionales que permitieron ampliar la infraestructura y el equipamiento científico de la FCA-UNR, entre ellos un proyecto FOMECA, un PME y otro PICT-E, que impactaron en la formación de nuevos grupos de trabajo y en la consolidación de otros en la Institución. Publicó más de 100 artículos científicos en revistas con referato prestigiosas a nivel nacional e internacional, más de 250 trabajos presentados en congreso y reuniones nacionales e internacionales en algunos de ellos participando como una destacada simposista y conferencista. Obtuvo 12 premios por sus aportes científicos que fueron otorgados por entidades regionales, nacionales e internacionales; entre los que se destacan el premio otorgado por la IWSS (*International Weed Science Society*) en 2008, el premio "Perez Companc" otorgado por la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria en 2010, y el Premio Francisco Sáez otorgado por la SAG en 2015 y en 2019. A nivel de posgrado dirigió a más de 25 profesionales entre investigadores, becarios, tesis de maestría y doctorado, y a nivel de grado miles de estudiantes en los que seguramente sembró una semilla por la forma de transmitir conocimientos y su visión apasionada de la ciencia y la vida. Liliana fue una gran Líder y jefe de grupo, ofreció libertad para la búsqueda individual en las líneas de trabajo de sus dirigidos, fue extremadamente generosa no sólo con sus discípulos sino con todas las Instituciones que tuvieron la fortuna de tenerla y fue revolucionaria por sus ideas y con el ejemplo. Liliana proclamaba

que somos unos privilegiados porque la Universidad nos retribuye monetariamente para dedicarnos a una tarea que nos apasiona, nos cultiva y alimenta el espíritu y que, además, tiene la capacidad de transformar la vida de las personas puesto que los estudiantes ingresan como adolescentes y egresan como adultos. Lili, la Piqui, nos dejó a todos los que nos formó un gran legado, pero también una gran responsabilidad, la de seguir transformando la vida de los estudiantes y de las instituciones que habitamos.

**Cátedra de Genética
Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad Nacional de Rosario
Argentina**

BAG

**Journal of Basic
& Applied Genetics**