

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE ESTUDIO

PERIODO Del 1 de Abril 2015 al 1 de Abril 2016

1. APELLIDO: HERRERA

NOMBRES: Macarena Lorena

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: Capital Federal *CP:* 1183 *Tel:*

Dirección electrónica (donde desea recibir información): macarenalherrera@hotmail.com

2. TEMA DE INVESTIGACIÓN (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Caracterización de las variaciones fenotípicas y genotípicas de la línea celular VERO adaptada al crecimiento en suspensión para ser utilizada en la producción de vacunas humanas

3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01/04/2015

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:*

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

4. INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS

Universidad y/o Centro: Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) CIC-CONICET

Facultad:

Departamento:

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 526 y Camino General Belgrano *N°:* s/n

Localidad: La Plata *CP:* 1900 *Tel:* 0221-4210112

5. DIRECTOR DE BECA

Apellido y Nombres: Bolzán Alejandro Daniel

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: La Plata *CP:* 1900 *Tel:*

Dirección electrónica: abolzan@imbice.org.ar

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).
CARACTERIZACIÓN CITOGÉNÉTICA DE LA LÍNEA CELULAR VERO

INTRODUCCIÓN

Las líneas celulares continuas (LCC) derivadas de tejidos de mamíferos no sólo representan herramientas invaluable para las ciencias de la vida, sino que también constituyen importantes sustratos celulares animales para la producción de diversos tipos de productos biológicos. Uno de los linajes más frecuentemente utilizados con estos propósitos es la línea celular Vero, establecida a partir de los fibroblastos de riñón de mono verde africano adulto (*Cercopithecus aethiops*) [1]. El cultivo primario de este tejido se inició en 1962, en la Universidad Chiba de Japón. A partir de éste, se obtuvieron varias sublíneas celulares y una de ellas fue la línea celular Vero C76 (ATCC®CCL-81) [2][3]. La línea celular Vero posee las características beneficiosas de la mayoría de las LCC (rápido crecimiento, inmortal, más o menos estable, clonal y de fácil obtención)[4] y es recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la producción de vacunas de uso humano [5]. Ha sido utilizada, luego de su propagación en “microcarriers”, para la producción de vacunas de base viral para el tratamiento de rabia, polio, enterovirus y hantavirus [6-10]. Dada su importancia en salud humana, el estudio de esta línea celular reviste particular interés. Por ello, es fundamental conocer sus características citogenéticas y analizar su estabilidad cromosómica en el tiempo [11]. Por otro lado, la amplia utilización de las líneas celulares que se utilizan en diversos campos de la investigación virológica, bioquímica y genética exige un control de las mismas que incluye el conocimiento detallado de su cariotipo. La transformación celular in vitro, que lleva al establecimiento de líneas, está siempre acompañada de cambios en el complemento cromosómico normal de las células de origen. Existe una marcada variabilidad en el número de cromosomas de las líneas de largo término y que afectaría, como consecuencia, su estabilidad. Sin embargo, pueden preservarse cromosomas denominados marcadores que ayudarían a identificar a las líneas celulares in vitro [12]. Los cromosomas marcadores son cromosomas supernumerarios que presentan una morfología diferente a la de los cromosomas del cariotipo normal de las células en cuestión y cuyas partes no pueden ser identificadas. Son producto de reordenamientos cromosómicos y caracterizan frecuentemente a las células tumorales.

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el objetivo de la presente investigación durante el período de beca fue caracterizar dos subclones de la línea celular Vero y analizar las posibles modificaciones a nivel genético (alteraciones cromosómicas) que las mismas pueden experimentar a lo largo de su adaptación a condiciones de cultivo en monocapa, mediante distintas técnicas citogenéticas de bandeado cromosómico. Los resultados obtenidos del presente estudio permitirán comparar ambas líneas celulares y establecer cuál de ellas es cromosómicamente más estable en el tiempo y, por ende, de mayor utilidad para el desarrollo de una plataforma de producción de virus para la fabricación de vacunas humanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas Celulares

Para todos los experimentos se utilizaron la línea celular Vero C76 (ATCC® CRL-1587, derivada de la línea celular Vero original) y su subclon Vero E6 (ATCC®CRL-1586), ambas compradas en el 2001 a la Asociación Banco Argentino de Células y disponibles, desde entonces, en el Banco de Células del IMBICE. Los estudios citogenéticos de Vero C76 y

Vero E6 comenzaron a partir del pasaje 37 y 2, respectivamente. Se estudiaron en total 16 pasajes para cada subclon.

Cultivo Celular

Las líneas Vero C76 y E6 se repicaron de 3 veces por semana por tripsinado de la monocapa celular y se cultivaron en medio MEM, suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF). Al medio se le agregó penicilina (1000U/mL) y 100µg de estreptomina por mL, en una atmósfera gaseada (CO₂ al 5%).

Obtención de cromosomas para el análisis citogenético

Para el análisis cromosómico es necesario que las células se encuentren en la etapa de metafase, donde los cromosomas alcanzan el máximo grado de condensación y son por ello claramente visibles e identificables. En orden de detener las células en metafase, los cultivos celulares (10mL) fueron tratados en fase de crecimiento logarítmico con 0.1µg/mL de colchicina (solución stock 1 mg de colchicina en polvo en 1 mL de solución salina de Hanks) durante 3 horas, incubando en estufa a 37°C. Posteriormente, se volcó el contenido de los frascos en tubos cónicos de centrifuga y se centrifugaron y lavaron las células con solución salina de Hanks. Luego se agregaron un 1 mL de tripsina y 200 µL de EDTA a cada frasco para que las células se despegaran. Pasados dos minutos, se colocaron en cada frasco 3-4mL del medio para inactivar la tripsina. Se centrifugaron las muestras a 1.200rpm durante 10 minutos. La suspensión de células tripsinizadas se trató con solución hipotónica de agua y medio (3:1) por 60 minutos en estufa a 37°C. Luego se procedió a la fijación en metanol-ácido acético en proporción 3:1, con 3 cambios posteriores del fijador. Los extendidos cromosómicos se prepararon por goteo en frío de la suspensión celular sobre portaobjetos de vidrio, sobre los cuales se aplicaron posteriormente las distintas técnicas de estudio cromosómico.

Tinción convencional con el colorante Giemsa

Los preparados fueron sometidos a la técnica de tinción estándar con colorante Giemsa marca Merck® (diluido al 5% en agua corriente) por 5 minutos y posteriormente lavados con agua destilada y dejados secar a temperatura ambiente. Esta técnica permitió determinar el número y la morfología de los cromosomas de cada metafase estudiada y, en consecuencia, de la estructura del cariotipo (número de cromosomas normales propios de la línea, número de cromosomas marcadores y reordenamientos cromosómicos presentes)[13]. Para la determinación del número modal se consideraron 50 metafases por pasaje o subcultivo (haciendo un total de 800 metafases por cada subclon), mientras que para el estudio cariotípico se analizaron 20 metafases por subcultivo. De este modo, se analizó la estabilidad del cariotipo de las líneas celulares Vero C76 y Vero E6 a lo largo del tiempo del cultivo.

Técnicas de bandeo cromosómico G y C

Las técnicas de bandeo cromosómico permiten obtener un patrón de bandas específico para cada par de cromosomas homólogos y de este modo identificar y analizar a cada cromosoma. En la presente investigación, se utilizaron las técnicas de Bando G (produce un patrón de bandas claras y oscuras –regiones ricas en Adenina/Timina- debido a la desnaturalización de las proteínas cromosómicas mediante tripsina) y Bando C (tiñe específicamente las regiones cromosómicas ricas en heterocromatina constitutiva, especialmente la región centromérica de los cromosomas), para determinar los reordenamientos cromosómicos estructurales de tipo estable presentes en el cariotipo de las células Vero durante su cultivo.

Para el Bando G, se utilizó el procedimiento de Hsu (1971) [14], que permitió identificar reordenamientos cromosómicos en comparación al cariotipo diploide original del mono verde africano y al trabajo de Osada y colaboradores (2014) [1] en un total de 5 metafases para

cada línea celular estudiada. Para el Bando C se utilizó el procedimiento de Sumner (1972) [15], que permitió obtener información (en 10 cariotipos de cada línea celular) sobre la localización, cantidad y posibles variaciones de las regiones de heterocromatina constitutiva y, como consecuencia, la identificación de los distintos cromosomas marcadores propios de la línea celular, siguiendo el criterio del trabajo de Bianchi y colaboradores [16].

Técnica de FISH con sonda telomérica

La técnica de Hibridación In Situ Fluorescente (FISH, en inglés) consiste en la identificación de secuencias específicas de ADN in situ (en cromosomas en metafase o núcleos en interfase) con una secuencia complementaria de ácido nucleico (sonda) marcada con un colorante fluorescente, de modo que la ubicación de esas secuencias pueda ser visualizada mediante un microscopio de fluorescencia. Los telómeros son complejos nucleoproteicos localizados en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Están involucrados en la preservación de la integridad de los mismos, protegiéndolos de la degradación por nucleasas, de la recombinación, y la fusión con otros cromosomas [17]. Por lo tanto, el mantenimiento de la función telomérica es fundamental para la estabilidad genómica y la viabilidad celular. Los cromosomas de los vertebrados poseen en sus extremos o telómeros ADN de secuencia (TTAGGG)_n, la cual puede ser identificada utilizando la técnica de FISH con sonda telomérica y microscopía de fluorescencia [17]. De este modo, mediante el uso de esta técnica pueden identificarse los distintos reordenamientos cromosómicos que involucran a los extremos de los cromosomas [17]. En la presente investigación, se utilizó una sonda pantelomérica de tipo PNA conjugada con Cy3 [Cy3-(CCCTAA)₃] obtenida de Panagene (Korea) para identificar a los telómeros de cada uno de los cromosomas que componen el cariotipo de la línea celular Vero y determinar los posibles reordenamientos que involucren a los extremos de los cromosomas de esta línea celular y a las secuencias teloméricas intersticiales, en caso de hallarse presentes. La técnica de FISH se realizó de acuerdo con las instrucciones provistas por el fabricante y siguiendo las experiencias previas con esta sonda en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE.

Análisis y Procesamiento de Imágenes Las metafases con tinción con Giemsa, Bando G y Bando C fueron analizadas utilizando un microscopio óptico Leica DM500 con cámara fotográfica estándar en objetivo 100X. Posteriormente, el conteo de cromosomas y armado de cariotipo se realizó con el editor de imágenes Corel PhotoPaint X7® y el software Micromesure®. Las metafases sometidas de FISH fueron capturadas con un microscopio de epifluorescencia marca Nikon eclipse 50i con cámara fotográfica digital Nikon ds-ri refrigerada de alta resolución junto al software Nis-elements F3.2. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas con el software Image J/FIJI de acceso libre (<http://fiji.sc/>).

RESULTADOS

Determinación del Índice Mitótico.

Se calculó la proporción de células en división de un total de 1000 células con un objetivo 40X con un Microscopio Nikon modelo ECLIPSE E200 del primer pasaje considerado para cada línea celular estudiada. El resultado fue de 1% de células en división tanto para Vero C76 como Vero E6.

Determinación del número modal y rango de aneuploidía.

La determinación del número modal y rango de aneuploidía (cambio en el número de cromosomas individuales), para las dos líneas Vero estudiadas se llevó a cabo sobre preparados coloreados con Giemsa (Figura 1, ver Anexo).

En la Tabla 1 (ver Anexo) se resumen los datos de los conteos de cromosomas para las líneas Vero C76 y Vero E6. Las células de ambas líneas celulares presentaron el rango de aneuploidía de 53 a 62 cromosomas, con números modales de entre 58 y 59 cromosomas.

En la Figura 2 (ver Anexo) podemos observar la estabilidad celular de cada línea celular a lo largo de los 16 pasajes considerados en este estudio. Ambas líneas fueron relativamente estables, comenzando con 59 cromosomas en los dos primeros pasajes. Entre el tercer y décimo pasaje se observa una fluctuación de entre 58 y 59 cromosomas para ambas líneas. A partir del pasaje número 11, tanto Vero C76 como Vero E6 permanecen estables con 58 cromosomas como número modal.

A partir de estos datos se calcularon los porcentajes totales para cada línea y se estableció el número modal general para cada línea –resaltado en amarillo- (Tabla 2, ver Anexo). Como se observa en la Figura 3 (ver Anexo), en la línea Vero C76 el 33,37% de las células presentaron un número modal de 58 al igual que el 30,5% de la línea Vero E6. De los resultados de la Tabla 2 (ver Anexo), se desprende que más del 50% de las metafases analizadas en ambas líneas celulares presentaron entre 58 y 59 cromosomas cada una.

Análisis del cariotipo de las Células Vero

En la Tabla 3 (ver Anexo) se resumen los resultados del análisis cariotípico de cada línea celular. Se observa una gran variabilidad cariotípica que afecta la distribución de los cromosomas en los grupos Metacéntricos (M), Submetacéntricos (SM) y Subtelocéntricos (ST) de Ruzicsa y Hsu (Figura 4, ver Anexo) y que caracteriza en general a las líneas Vero VC76 y VE6. Esta variabilidad se observó en metafases de igual número modal y de distintos grados de condensación (Figura 5, ver Anexo). En la Figura 5 (ver Anexo), se muestra el análisis de dos metafases de referencia de las líneas Vero C76 (A) y Vero E6 (B), ambas con un número modal de 58 cromosomas. En Vero C76 (Figura 5.A, ver Anexo), se observaron 30 pares de cromosomas distribuidos de la siguiente manera: 6 pares de cromosomas metacéntricos y el cromosoma N° 1 (sin su homólogo) es el de mayor tamaño del grupo y corresponde al cromosoma sexual X; 11 pares de cromosomas submetacéntricos y el cromosomas N° 18 sin su homólogo; 11 pares de cromosomas subtelocéntricos. El par de cromosomas N° 30 exhibió constantemente una segunda constricción muy notoria, ubicada en el tercio proximal del brazo largo. En la línea Vero E6 (Figura 5.B, ver Anexo), se observaron un mayor número de cromosomas sin su homólogo y pocos pares cromosómicos. Se encontraron 14 cromosomas metacéntricos: 8 cromosomas sin sus homólogos y 3 pares de cromosomas homólogos (N°3, N°7 y N°9); 22 cromosomas submetacéntricos (6 cromosomas sin su homólogo y 8 pares de cromosomas homólogos) y 22 cromosomas subtelocéntricos (8 pares de cromosomas y 6 cromosomas sin su homólogo). El par de cromosomas 39 se corresponde al par de cromosomas N°30 del cariotipo de la línea Vero C76.

En ambos cariotipos, el tamaño cromosómico dentro de cada grupo disminuyó progresivamente sin brechas observadas. Además, en la mayoría de los casos la identificación fue tentativa, aplicando en los casos dudosos el programa para el análisis de datos citogenéticos MicroMeasure® (disponible en <http://micromeasure.software.informer.com/>), donde calculamos el largo de los brazos cromosómicos con respecto al centrómero y de esa manera los ubicamos en su grupo correspondiente.

Identificación de marcadores cromosómicos por Bandeado C.

Los resultados de la identificación de marcadores cromosómicos figuran en la Tabla 4 (ver Anexo), para cada línea estudiada. De los marcadores cromosómicos por Bandeado C publicados por Bianchi y colaboradores (poner cita) (Figura 6, ver Anexo), nosotros hemos considerado los siguientes:

- M1: cromosoma metacéntrico con una sola banda de heterocromatina en la posición del centrómero.
- M2: cromosoma metacéntrico con una banda de heterocromatina centromérica y una banda de heterocromatina distal

- SM1: cromosoma submetacéntrico con una sola banda de heterocromatina en la posición del centrómero
- SM2: cromosoma submetacéntrico con una banda de heterocromatina centromérica y una banda de heterocromatina distal en el brazo corto.
- ST1: cromosoma subteloacéntrico con una sola banda de heterocromatina en la posición del centrómero.
- ST2: cromosoma subteloacéntrico con una banda de heterocromatina centromérica y una banda de heterocromatina distal en el brazo largo.
- D25: cromosoma de pequeño tamaño con constricción secundaria. Corresponde al D25 de las células normales diploides de mono verde africano. La región heterocromática se encuentra localizada por encima de la constricción secundaria.

Con estos resultados, pudimos observar la presencia de los 7 marcadores analizados en la totalidad de las metafases de las células consideradas (n=20) para ambas líneas celulares (Figura 7, ver Anexo). Sin embargo, se observó una gran variabilidad en la cantidad de cada marcador cromosómico en las distintas metafases (Figura 8, ver Anexo). No se encontraron otros tipos de marcadores cromosómicos por Bando C.

Identificación de reordenamientos cromosómicos por Bando G

Para identificar los posibles reordenamientos cromosómicos presentes en ambas líneas celulares Vero sometidas, utilizamos como referencia el cariotipo de Bando G del trabajo del grupo de Osada y cols. [1]. (Figura 8, ver Anexo)

En la Figura 9 (ver Anexo) podemos observar distintas metafases obtenidas a partir del uso de tiempos variables de tratamiento con tripsina (10 segundos a 1 minuto) con el fin de optimizar la técnica de Bando G. No obstante, no pudo obtenerse un número aceptable de preparados de ambas líneas celulares estudiadas en el que se observaran cromosomas óptimos para el análisis del correspondiente patrón de bandas. De hecho, como muestra la Figura 10 (ver Anexo), habiendo realizado el cariotipo correspondiente a la metafase de mejor calidad obtenida, tampoco se pudo proceder a la identificación de las bandas y por ende, de los posibles rearrreglos cromosómicos.

Identificación de telómeros por FISH

En la Figura 11 (ver Anexo) puede observarse que la sonda telomérica utilizada hibridó en ambos extremos de cada uno de los cromosomas de las células Vero C76 y E6. Además, pudieron observarse algunas variaciones en la intensidad de las señales entre los distintos cromosomas de las metafases analizadas. Asimismo, no se observaron señales teloméricas intersticiales en ninguno de los cromosomas analizados, lo que indicaría que en los cromosomas de estas células no existen secuencias teloméricas intersticiales.

CONCLUSIONES

La adaptación de las células Vero a las condiciones de cultivo en monocapa lleva progresivamente a la aneuploidía, por pérdida de uno o más cromosomas durante la evolución in vitro de la línea celular) de las células diploides normales. Éste es un mecanismo "activo", durante el mantenimiento in vitro de las líneas celulares Vero C76 y Vero E6. Un amplio rango de variabilidad caracterizó a ambas líneas, siendo para todas ellas el rango de mayor frecuencia de aneuploidía de 53 a 62 cromosomas. No se encontraron células con más de 62 cromosomas. La gran variabilidad cariotípica observada de célula a célula en cada preparado analizado (incluso en aquellas células con igual número modal), es una característica constante en las líneas Vero estudiadas. Los cromosomas marcadores han permitido identificar a las células Vero provenientes del Banco de Cultivos Celulares del IMBICE como tales.

Durante el desarrollo del presente trabajo, fue difícil la obtención del patrón de bandas cromosómicas característico del Bando G, por lo que se sugiere la continuación de su

estudio y puesta a punto hasta obtener un tiempo óptimo de tripsina y grado de condensación cromosómica, a fin de poder identificar a los posibles reordenamientos cromosómicos presentes en estas líneas celulares. Sería necesario, además, realizar un estudio genómico (a nivel molecular) y de FISH multicolor (M-FISH) para poder detectar con precisión fusiones, translocaciones, deleciones y duplicaciones que involucren a los cromosomas diploides normales del mono verde africano y los cromosomas que surgen a lo largo de los pasajes de cultivo de las líneas Vero.

Con respecto a la técnica de FISH, se sugiere continuar con la aplicación de la misma para obtener un mayor número de preparados cromosómicos, a fin de poder realizar un análisis más profundo del patrón de distribución de secuencias teloméricas en los cromosomas de estas células. En efecto, los resultados obtenidos durante la presente beca no permiten descartar por completo la presencia de secuencias teloméricas intersticiales en uno o más cromosomas de las células Vero, ya que en las muestras analizadas el ruido de fondo o “background” de la foto obtenida dificultó por momentos la visualización de las señales teloméricas. Determinar con precisión esto último es importante, dado que la presencia de secuencias teloméricas intersticiales en los cromosomas implica la existencia de reordenamientos cromosómicos, especialmente, fusiones entre cromosomas.

El presente trabajo constituye la base fundamental para caracterizar en un futuro cercano a las células Vero cultivadas en un medio libre de suero bovino, las que servirán como plataforma para la producción de vacunas antirrábicas humanas en el marco del proyecto de “Fortalecimiento Integral del Instituto Biológico de La Plata- Dr. Tomás Perón” subsidiado por el Fondo Argentino Sectorial (FONARSEC) de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, Argentina) (2014-2017).

BIBLIOGRAFIA

- [1] Osada N., Kohara A., Yamaji T., Hirayama N., Kasai F., Sekizuka T., Kuroda M., Hanada K. 2014, The genome landscape of the african green monkey kidney-derived Vero cell line. *DNA Research*, 21, 673-683.
- [2] Yasumura, Y. and Kawakita, Y. 1963, Studies on SV40 in tissue culture: preliminary step for cancer reserach in vitro (in Japanese), *Nihon Rinsho*, 21, 1201–15.
- [3] Yasumura, Y. and Kawakita, Y. 1988, Studies on SV40 in tissue culture: preliminary step for cancer research in vitro, In: Simizu, B. and Terasima, T. (eds.), *VERO cells: origin, properties and biomedical applications*. Department of Microbiology School of Medicine Chiba University, Chiba, Japan, pp. 1–19.
- [4] Swanson S., Mento S., Weeks-Levy C., Brock B., Kowal K., Wallace R., Ritcbey M., Cano F. 1988, Characterization of Vero cells. *Journal of Biological Standardization*, 16, 311-320.
- [5] <http://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx>
- [6] Frazzati-Gallina, N.M., Paoli, R.L., Mourão-Fuches, R.M., Jorge, S.A.C., Pereira, C.A. 2001 Higher production of rabies virus in serum-free media cell cultures on microcarriers. *J. Biotechnol.* 92:67-72.
- [7] Montagnon B.J., Vincent-Falquet J.C., Fanget B. 1984 Thousand liter scale microcarrier culture of Vero cells for killed polio virus vaccine. *Dev. Biol. Stand.* 55:37-42.
- [8] Wu S.C., Liu C.C., Lia, W.C. 2004 Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. *Vaccine* 22:3858-3864.
- [9] Choi Y., Ahn C.J., Seong K.M., Jung M.Y. Ahn B.Y. 2003 Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. *Vaccine* 21:1867-1873.
- [10] Paillet C., Forno, G., Kratje R., Etcheverrigaray M. 2009 Suspension-Vero cell cultures as a platform for viral vaccine production. *Vaccine* 27:6464-6467.
- [11] World Health Organization. 1998 Requirements for the use of animal cells as in vitro substrates for the production of biologicals. WHO Technical Report Series, vol. 878. Geneva:WHO, p.20–53 [Annex 1].

- [12] Salum S., Larripa I., Damonte E., Coto C., 1978 Análisis citogenético de líneas celulares vero. Medicina, 38, 513-518.
- [13] Savage J.R.K. 2001. Chromosome rearrangements. En: Encyclopedia of Life Sciences, Nature Publishing Group / www.els.net.
- [14] Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 2:971-972.
- [15] Sumner A.T, 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res. 75:304-306.
- [16] Bianchi N., Ayres J. 1971. Heterochromatin location on chromosomes of normal and transformed cells from african green monkey (*Cercopithecus aethiops*). Experimental Cell Research, 68, 253-258.
- [17] Bolzán, A.D.2012 Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. Mutagenesis 27:1-15.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

Distribution of Telomeric Sequences (TTAGGG)_n in Rearranged Chromosomes of Phyllotine Rodents (Cricetidae, Sigmodontinae). Autores: Cecilia Lanzone, Carolina Labaroni, Natalia Suárez, Daniela Rodríguez, Macarena L. Herrera, Alejandro D. Bolzán. Cytogenic and Genome Research. DOI: 10.1159/000444602. Aceptado 17 de Diciembre 2015.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

Presentaciones a Congreso. Póster. Distribución de secuencias teloméricas (TTAGGG)_n en cromosomas reordenados de roedores de la tribu Phyllotini (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae). Autores: Lanzone, C., Labaroni, C.A., Rodríguez, D., Herrera, M.L. Bolzán, A.D. XXI Jornadas Argentinas de Mastozoología. 24 al 27 de Noviembre de 2015. Ciudad de Santa Fé, Santa Fé

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

Segundo Congreso Internacional de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. Teatro Argentino de La Plata. La Plata, Buenos Aires. 1 de Octubre 2015. Póster "Caracterización citogenética de la línea celular Vero" autores: Herrera, Macarena; Castrogiovanni D; Parisi J; Cálcena E; Bolzán A

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

Curso Teórico/Práctico introductorio al procesamiento y análisis de imágenes científicas de microscopía de fluorescencia empleando Image J/ FIJI. Departamento de Posgrado. Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. 7 al 23 de Octubre 2015.

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

Segundo Premio al Mejor Póster de Becarios de la CIC. Segundo Congreso Internacional de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. Teatro Argentino La Plata, Buenos Aires. 1 de Octubre 2015

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TÍTULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

14. TÍTULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Condiciones de Presentación

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
 - Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
 - Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario