

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---



**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**ESTUDIO DEL ORDEN SUPERIOR DE ORGANIZACIÓN DEL DNA  
EN NEURONAS DE CORTEZA CEREBRAL DURANTE EL  
DESARROLLO POSTNATAL Y EL ENVEJECIMIENTO  
NATURAL DE LA RATA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**JANETH ALVA MEDINA**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MYRNA ALEXANDRA ROBERTA DENT**

**MÉXICO, D.F.**

**OCTUBRE, 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), bajo la dirección de la Dra. Myrna Alexandra Roberta Dent. La presente tesis se realizó dentro de los proyectos CONACyT 48447-Q (25506) a cargo del Dr. Armando Aranda Anzaldo y proyecto 2212/2006 Universidad autónoma del estado de México, México, a cargo del Dr. Armando Aranda Anzaldo y la Dra. Myrna Alexandra Roberta Dent.

Los estudios de postgrado en el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de Janeth Alva Medina fueron apoyados por una beca otorgada por el CONACyT (194990).

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por:

Dra. Myrna Alexandra Roberta Dent

Facultad de Medicina, UAEMéx.

Dr. Rolando Hernández Muñoz

Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

Instituto de Neurobiología, UNAM

**“A mis padres por creer en mi, por estar siempre a mi lado, por apoyarme, cuidarme, ayudarme a lograr todas las metas que me he propuesto en la vida y por el ejemplo de fortaleza y de vida que siempre me han dado.”**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Myrna Alexandra Roberta Dent, por su confianza, apoyo y asesoría en la realización de este trabajo, por ser parte importante en mi formación académica y por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz y al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, miembros de mi comité tutorial, por las sugerencias y buenos consejos durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Armando Aranda Anzaldo por el gran apoyo y consejos brindados durante la realización de este trabajo y a lo largo de mi estancia en el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias.

A los miembros del jurado por la dedicación otorgada durante la revisión de esta tesis y por sus observaciones y sugerencias que contribuyeron a mejorar este trabajo.

A todos los miembros del Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la UAEMéx por sus consejos, apoyo técnico y la gran amistad que me han brindado.

A Ma. del Carmen Colin Ferreyra y Olga Lidia Alva Medina por sus consejos y valiosa ayuda en la realización de los análisis estadísticos utilizados en el presente trabajo.

## ÍNDICE

<b>1.0 RESUMEN.</b>	<b>1</b>
<b>2.0 INTRODUCCIÓN.</b>	<b>5</b>
<b>3.0 ANTECEDENTES</b>	<b>8</b>
3.1 El envejecimiento y la senescencia replicativa.	8
3.2 La senescencia replicativa asociada al acortamiento de los telómeros.	9
3.3 La senescencia celular asociada a STASIS.	10
3.4 La senescencia estocástica.	10
3.5 La organización del DNA en el núcleo celular.	11
3.6 Territorios cromosómicos.	14
3.7 La Matriz Nuclear (MN).	15
3.8 El modelo de tensegridad.	18
3.9 Atractores.	19
3.10 Dinámica estructural.	20
3.11 La neurona y el sistema nervioso central.	24
<b>4.0 HIPÓTESIS</b>	<b>29</b>
<b>4.1 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>29</b>
<b>4.2 OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>29</b>
<b>5.0 MATERIALES Y MÉTODO.</b>	<b>30</b>
5.1 Animales.	30
5.2 Aislamiento de núcleos neuronales.	30
5.3 Aislamiento de nucleoides neuronales.	31
5.4 Inmunohistoquímica.	31

5.5 Aislamiento de hepatocitos.	31
5.6 Aislamiento de nucleoides de hepatocitos.	32
5.7 Análisis de la integridad de los nucleoides.	32
5.8 Medición de núcleos, MN y halos de DNA.	32
5.9 Digestión de los nucleoides con DNAsa I.	33
5.10 Amplificación de secuencias específicas de DNA anclado a la matriz nuclear mediante PCR.	33
5.11 Electroforesis del DNA.	34
5.12 Extracción de RNA.	35
5.13 Amplificación de RNA específico por RT-PCR.	35
5.14 Extracción de Proteínas.	36
5.15 Perfiles Proteicos.	37
<b>6.0 RESULTADOS.</b>	<b>38</b>
6.1 Aislamiento y caracterización de núcleos y nucleoides neuronales.	38
6.2 Integridad de los nucleoides.	44
6.3 Dimensiones de los núcleos, la MN y halos de DNA en función de la edad.	46
6.4 Cinéticas de digestión del DNA en neuronas durante distintas etapas del desarrollo postnatal.	49
6.5 Comparación del OSODNA entre las células postmitóticas y las células senescentes.	52
6.6 Evaluación comparativa de la estabilidad de las interacciones DNA-MN entre neuronas (P7 y P540) y hepatocitos P540.	52
6.7 Comparación del tamaño promedio del núcleo, la MN y el halo de DNA entre neuronas (P7 y P540) y hepatocitos P540.	54
6.8 Comparación de las cinéticas de digestión con DNasa I entre neuronas (P7 y P540) y hepatocitos P540.	57

6.9 Mapeo posicional de secuencias génicas con respecto a la MN.	58
6.10 Mapeo posicional comparativo de secuencias génicas con respecto a la MN entre neuronas P7 y hepatocitos P540.	61
6.11 Mapeo posicional de secuencias génicas con respecto a la MN durante el desarrollo postnatal y el envejecimiento natural de las neuronas.	64
6.12 Mapeo posicional de las regiones 5' y 3' del gen MPZ.	69
6.13 Expresión de los genes mapeados en neuronas durante diferentes edades postnatales.	69
6.14 Perfil proteico de la MN durante el desarrollo postnatal de las neuronas.	72
<b>7.0 DISCUSIÓN.</b>	<b>74</b>
<b>8.0 CONCLUSIONES.</b>	<b>88</b>
<b>9.0 PERSPECTIVAS.</b>	<b>90</b>
<b>10.0 ANEXO</b>	<b>91</b>
<b>11.0 BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>106</b>

## 1.0 RESUMEN.

Las células de los metazoarios cultivadas *in vitro* cumplen un número limitado de divisiones celulares y después entran en un estado de arresto del crecimiento celular conocido como senescencia replicativa (SR). Estudios clásicos han mostrado que los fibroblastos humanos en cultivo son heterogéneos con respecto a su habilidad para dividirse y sintetizar DNA, además el número de células incapaces de dividirse se incrementa exponencialmente con la edad del cultivo (Smith y Hayflick, 1974). De hecho existen evidencias de que un proceso estocástico está involucrado con el establecimiento de un potencial proliferativo limitado en las células primarias en cultivo (Jones et al., 1985). Los hepatocitos de mamífero adulto son células que se encuentran arrestadas en G0 por largos periodos de tiempo. Sin embargo, son células que tienen capacidad proliferante, la cual se va perdiendo en función de la edad (Michalopoulos y De Frances, 1997). Por otro lado, las neuronas son células arrestadas en G0 de forma permanente desde que dejan la zona ventricular y migran a su posición final en el cerebro (Boulder et al., 1970; Rakic, 1974; 2009). Tanto el arresto del ciclo celular observado en células primarias como el estado postmitótico característico de las neuronas son estados muy estables y por lo tanto compatibles con la sobrevivencia celular a largo plazo. Ambos estados parecen ser irreversibles e independientes de factores solubles que actúan en *trans*, lo que sugiere que podría haber un factor común entre ambos estados celulares (Aranda-Anzaldo, 2009).

En las células de los metazoarios en interfase el DNA se encuentra organizado en bucles anclados a una subestructura proteica conocida como matriz nuclear (NM). El DNA se ancla a la MN mediante secuencias no codificantes de longitud variable conocidas como regiones de anclaje a la matriz o MARs. Aunque no existe una secuencia consenso para la identificación de los MARs, se sabe que son secuencias repetitivas ricas en A-T (Ottaviani et al, 2008). Sin embargo, no todos los MARs potenciales se encuentran actualmente unidos a la MN formando regiones verdaderas de anclaje del bucle o LARs (Razin, 2001). El DNA desnudo más la MN constituyen un nucleoide, en el cual los bucles estructurales permanecen topológicamente constreñidos e hiperenrollados incluso después de la extracción completa de las histonas y otras proteínas de la cromatina (Cook et al., 1976; Roti-Roti et al., 1993). En nucleoides de hepatocitos de rata existe una reducción significativa del tamaño promedio del bucle en función de la edad del animal y esto se correlaciona con un incremento en el volumen nuclear, la reducción del potencial proliferante y la progresión hacia la diferenciación terminal de los hepatocitos. Por otro lado, el número promedio de interacciones DNA-MN observado en hepatocitos de ratas senescentes

correlaciona con una consolidación dramática de la estructura de la MN y estabilización de las interacciones DNA-MN (Maya-Mendoza et al., 2005).

En el presente trabajo se analizó la estructura de orden superior de organización del DNA (OSODNA) al interior del núcleo, definida por las interacciones DNA-MN, en nucleoides de neuronas durante distintas etapas del desarrollo postnatal. Nuestros resultados muestran que la organización al interior del núcleo es muy estable en las neuronas desde estadios postnatales tempranos y se mantiene así hasta el envejecimiento. La estabilidad de las interacciones DNA-MN se correlaciona con un tamaño promedio del bucle de DNA más compacto, lo cual genera un aumento en la cantidad de LARs. Se observó también un incremento en la resistencia relativa de los bucles de DNA a la acción de la DNasa I en función de la edad del animal. Diferentes secuencias génicas estudiadas parecen guardar una posición relativamente cercana con respecto a la MN en neuronas de ratas recién nacidas (P0) y hasta la edad adulta (P80), pero dichas secuencias se alejan de la MN durante el envejecimiento (P540), semejante a lo reportado en hepatocitos senescentes (Maya-Mendoza et al., 2005). También se observaron cambios tanto cuantitativos como cualitativos en la composición proteica de la MN de P7 a P80, lo cual sugiere que estos cambios pueden estar relacionados con la diferenciación terminal de estas células. En las neuronas al igual que en los hepatocitos senescentes las interacciones DNA-MN son muy estables y los bucles de DNA presentan una resistencia similar al corte por la DNasa I, sugiriendo que el OSODNA que es muy estable constituye una base estructural común tanto para las células senescentes, como para las células postmitóticas *in vivo*. Sin embargo, el OSODNA en las neuronas postnatales tempranas (P0) aunque es similar en algunos aspectos al de los hepatocitos senescentes, no es estático y sigue evolucionando con el paso del tiempo hacia un estado de máxima estabilidad estructural en neuronas postmitóticas de ratas senescentes (P540).

## 1.1 ABSTRACT.

The cells of metazoans cultured in vitro complete a limited number of cell divisions and then enter a state of growth arrest known as replicative senescence (RS). Classical studies have shown that normal human fibroblasts in culture are heterogeneous with respect to their ability to divide and to synthesize DNA and the number of cells unable to divide increases exponentially with the age of the culture (Smith y Hayflick, 1974). Indeed, there is strong evidence that a stochastic process is involved in establishing the finite proliferating potential of primary cells in culture (Jones et al., 1985). Adult mammalian hepatocytes are cells that rarely divide as they are largely arrested in G0. However, there is a progressive reduction in the proliferating potential of the hepatocytes as a function of age (Michalopoulos and De Frances, 1997). The spontaneous, permanent cell-cycle arrest observed in primary cells and the post-mitotic state characteristic of early, terminally-differentiated cells such as neurons, are remarkably stable and compatible with long-term cell survival. Both states seem to be non-reversible and so independent of soluble regulatory factors acting in *trans*, suggesting that there might be a common factor linking both cellular states (Aranda-Anzaldo, 2009).

In the interphase of metazoan cells the DNA is organized in supercoiled loops anchored to a nuclear substructure known as the nuclear matrix (NM). The DNA is anchored to the NM by means of non-coding sequences of variable length known as matrix attachment regions or MARs. Yet there is no consensus sequence for a priori identification of MARs although they are generally rich in A-T and repetitive sequences (Ottaviani et al, 2008). However, not all potential MARs are actually bound to the NM constituting true loop attachment regions or LARs (Razin, 2001). The naked DNA loops plus the NM constitute a nucleoid in which the structural loops remain topologically constrained and thus supercoiled even after complete extraction of histones and other chromatin proteins (Cook et al., 1976; Roti Roti et al., 1993). In nucleoids from freshly isolated rat hepatocytes there is a significant reduction of the average DNA loop size as a function of animal age and this correlates with increase in the nuclear volume, reduction of the cell proliferating potential and progression towards terminal hepatocyte differentiation with age. Moreover, the larger average number of DNA-NM interactions observed in hepatocytes of naturally senescent rats correlates with a dramatic strengthening of the NM framework and the stabilization of such DNA-NM interactions (Maya-Mendoza et al., 2005).

In the present work we analyzed the global properties of the higher-order structure in the cell

nucleus (NHOS) defined by the DNA-NM interactions, in nucleoids of post-mitotic rat neurons at different post-natal ages. Our results show that there is a highly stable NHOS in the cell nucleus of neurons during postnatal development and aging. The stability of the DNA-NM interactions correlates with a smaller average DNA loop size, which results in an increase of LARs. It was also observed an increase in the resistance of the loop DNA to the action of DNase I as a function of age studied. A set of different gene sequences was found to be close to the MN in early postnatal neurons up to adulthood (P0-P80). However such sequences become distal to the NM with age (P540), similar to what it has been reported for senescent hepatocytes (Maya-Mendoza et al., 2005). Also, there are both quantitative and qualitative changes in the protein composition of the NM of neurons from P7 to P80, suggesting that these changes could be related to the terminal differentiation of neurons. In both neurons and senescent hepatocytes the DNA-NM interactions are highly stable and the loop DNA is similarly resistant to the DNase I, suggesting that a very stable NHOS is a common structural feature of both, naturally aged and post-mitotic cells *in vivo*. However, although the NHOS in early postnatal neurons (P0) is rather similar to that in senescent hepatocytes, it is not static and evolves in time towards a state of maximum structural stability in the postmitotic neurons of senescent rats (P540).

## 2.0 INTRODUCCIÓN.

Las células de los metazoarios cultivadas *in vitro* completan un número limitado de divisiones celulares y posteriormente entran en un estado de arresto del crecimiento conocido como senescencia replicativa (SR). A primera instancia, la SR parece estar constituida por dos fenómenos separados: 1) La SR relacionada con la pérdida de cierto potencial proliferante de la célula, el cual se ha relacionado con un mecanismo de conteo que determina el número de ciclos celulares completados antes de entrar en SR. El acortamiento de la longitud de los telómeros se ha correlacionado con esta forma de SR en algunos sistemas de mamíferos (Hayflick, 2000; Shay y Wright, 2005). y 2) Una senescencia prematura inducida por estrés desencadenada por un gran número de factores estresantes, se llama STASIS (Shay y Wright, 2005). Estudios clásicos han mostrado que los fibroblastos humanos normales son heterogéneos con respecto a su habilidad para dividirse y sintetizar DNA y el número de células incapaces de dividirse se incrementa exponencialmente con la edad del cultivo (Smith y Hayflick, 1974; Martin, 1977). Es decir, en una célula primaria existe una gran variación en el número de divisiones que ésta puede llevar a cabo, sugiriendo que el mecanismo que determina la vida media *in vitro*, no puede ser simplemente el número de divisiones celulares.

Los hepatocitos de mamífero adulto se encuentran arrestadas en G0, pero tienen potencial proliferante el cual se pierde en función de la edad (Michalopoulos y De Frances, 1997). Esto sugiere que la pérdida del potencial proliferante *in vivo* no está relacionado directamente con un mecanismo de conteo de divisiones celulares y por lo tanto, es probable que un mecanismo estocástico que limita el potencial proliferante conforme avanza la edad ocurra incluso en células arrestadas en G0. El arresto espontáneo del ciclo celular dependiente del tiempo observado en células primarias y el estado postmitótico, característico de células terminalmente diferenciadas como las neuronas, son muy estables y compatibles con la sobrevivencia celular a largo plazo. Ambos estados parecen ser irreversibles y por lo tanto independientes de factores reguladores solubles que actúan en *trans*, lo que sugiere que existe un posible mecanismo común para ambos estados celulares (Aranda-Anzaldo, 2009).

En las células eucariotas en interfase, el DNA está organizado en bucles hiperenrollados anclados por su base a una estructura proteica conocida como matriz nuclear (MN) que es un complejo insoluble de ribonucleoproteínas obtenida después de la extracción del núcleo con altas concentraciones de sal y DNasa (Nickerson, 2001; Tsutsui et al., 2005). Estos bucles de DNA

están anclados a la subestructura proteica por medio de secuencias no codificantes de longitud variable conocidas como regiones de anclaje a la MN o MARs (*Matrix attachment regions*). Aunque no existe una secuencia consenso para la identificación a priori de las secuencias MARs estas son secuencias repetitivas generalmente ricas en A-T (Ottaviani et al., 2008). Los MARs están clasificados operacionalmente en estructurales o permanentes, los cuales son resistentes a extracción con altas concentraciones de sal y en funcionales o facultativos que no resisten la extracción con altas concentraciones de sal (Razin, 2001; Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003). Sin embargo, de los MARs potenciales que existen no todos se encuentran realmente unidos a la MN como una región verdadera de anclaje del bucle o LAR (*Loop attachment region*) (Razin, 2001). Procesos importantes de la fisiología nuclear como la replicación, la transcripción y el procesamiento de transcritos primarios parecen ocurrir en complejos macromoleculares localizados en sitios discretos sobre la MN (Tsutsui et al., 2005; Ottaviani et al., 2008), por lo tanto las relaciones topológicas entre el DNA y la MN parecen ser muy importantes para la fisiología nuclear. Se ha sugerido que el patrón estructural de los bucles de DNA superenrollados anclados a la MN es la principal característica del orden superior de organización del DNA y define el contexto para los subsecuentes niveles de organización de la cromatina al interior del núcleo (Aranda-Anzaldo, 1989).

Un nucleoide está constituido por la MN más los bucles de DNA desnudo (sin histonas y otras proteína de la cromatina) anclados a la misma. En los nucleoides, los bucles estructurales permanecen topológicamente constreñidos y por lo tanto están hiperenrollados (Cook et al., 1976; Roti Roti et al., 1993). En tales nucleoides, las regiones de DNA localizadas cerca de la MN se encuentran relativamente protegidas de la acción de la DNasa I por estar embebidas en la estructura proteica (Razin et al., 1995; Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003). Se ha reportado que en nucleoides aislados de hepatocitos de rata, la fracción del bucle de DNA resistente a la acción de la DNasa I se incrementa en función de la edad del animal y ésto se correlaciona con una reducción significativa en el tamaño promedio del bucle de DNA, un incremento en el volumen nuclear, la reducción del potencial proliferante y la progresión hacia la diferenciación terminal de los hepatocitos en función de la edad, incluso cuando dichos hepatocitos no han sufrido divisiones celulares repetidas (Maya-Mendoza et al., 2005). El gran número de interacciones DNA-MN observadas en hepatocitos de ratas envejecidas de forma natural, resulta en un gran número de bucles estructurales de DNA que son significativamente más pequeños en tamaño, lo cual se correlaciona con la dramática consolidación de la MN y la estabilización de las interacciones DNA-MN durante el envejecimiento natural (Maya-Mendoza et al., 2005). También

se ha demostrado que los genes en los hepatocitos de las ratas recién nacidas se encuentran cercanos a la MN y se alejan progresivamente de ésta cuando el animal envejece. Dicho alejamiento se ha correlacionado con la tendencia hacia la diferenciación terminal y la pérdida del potencial proliferante (Maya-Mendoza et al., 2005). Estos resultados sugieren que una modificación global en las relaciones topológicas entre el DNA y la subestructura nuclear puede ser un marcador de senescencia celular.

Las neuronas son células que se vuelven postmitóticas desde estadios embrionarios tempranos, cuando dejan la zona ventricular y migran a su posición final en el cerebro (Parnavelas, 2002). Estas células han perdido por completo su potencial proliferante, sin embargo, deben ser capaces de sobrevivir por largos periodos de tiempo. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se analizaron las propiedades globales del orden superior de organización del DNA (OSODNA) al interior del núcleo, definido por las interacciones DNA-MN en nucleoides de neuronas de rata en diferentes etapas del desarrollo postnatal. Con el fin de establecer si la condición postmitótica es equivalente o no a la senescencia replicativa, se realizó la comparación de dichas propiedades con lo observado previamente en nucleoides de hepatocitos primarios de ratas envejecidas de manera natural. Nuestros resultados muestran que las interacciones DNA-MN son muy estables desde estadios postnatales tempranos en las neuronas de corteza cerebral de rata. La estabilidad de éstas interacciones se correlaciona con un tamaño promedio del bucle de DNA más compacto, que genera un aumento en la cantidad de LARs. Se encontró también que existe una resistencia relativa de los bucles de DNA al corte por la DNasa I en los nucleoides neuronales desde estadios postnatales tempranos, la cual aumenta durante el envejecimiento natural. Un conjunto de secuencias génicas estudiadas parecen guardar una posición relativamente cercana con respecto a la MN en las neuronas de ratas recién nacidas (P0), de 7 días postnatales (P7) y adultas (P80), pero dichas secuencias se alejan de la MN durante el envejecimiento (P540), en forma semejante a lo observado en hepatocitos senescentes. En las neuronas al igual que en los hepatocitos senescentes las interacciones DNA-MN son muy estables y los bucles de DNA presentan una resistencia similar al corte por la DNasa I, sugiriendo que el OSODNA muy estable constituye una base estructural común para el estado postmitótico y la senescencia. El OSODNA en las neuronas postnatales tempranas (P0) es similar en algunos aspectos al previamente descrito para hepatocitos senescentes, pero no es estático y todavía sigue evolucionando con el paso del tiempo hacia un estado de máxima estabilidad estructural en neuronas postmitóticas de ratas senescentes (P540).

### **3.0 ANTECEDENTES**

#### **3.1 El envejecimiento y la senescencia replicativa.**

El envejecimiento es la acumulación progresiva de cambios con respecto al tiempo asociados o responsables del incremento en la susceptibilidad a las enfermedades y la muerte, este proceso natural es universal para todos los organismos vivos y está caracterizado por un deterioro progresivo en el mantenimiento y reparación de los procesos vitales del organismo (Hayflick, 2000; Harman, 2000; Rattan, 2000). Las células somáticas normales no se dividen de manera indefinida, esta propiedad, llamada “esperanza de vida replicativa finita” en las células, conduce a una eventual detención de la división celular por un proceso llamado senescencia celular o senescencia replicativa. Esta senescencia replicativa (SR) fue observada hace más de 40 años (Hayflick y Moorhead, 1961; Hayflick, 1965), en células de fibroblastos sometidas a cultivos seriales en donde a medida que el cultivo envejece las células pierden la capacidad de dividirse y entran en un estado de arresto del crecimiento. Este proceso ha sido asociado con el envejecimiento del organismo, la supresión de tumores y la diferenciación terminal (Howard, 1996), ya que dicha SR está acompañada por cambios graduales en el fenotipo y por alteraciones en la expresión génica (Cristofalo et al., 1998). Esto sugiere que debe haber cambios en la estructura de la cromatina, de tal manera que algunos genes que no son expresados en un fenotipo joven, son expresados en el senescente y viceversa. La arquitectura nuclear también sufre cambios en función de la actividad proliferativa de las células, dado que en células quiescentes, proliferantes o senescentes, la organización subnuclear de los cromosomas humanos es fundamentalmente diferente (Bridger, et al., 2000).

La SR parece estar relacionada al menos con dos fenómenos diferentes: 1) La SR asociada con la extinción del potencial proliferante en la célula, la cual se ha relacionado con algunos mecanismos de conteo que determinan el número de ciclos celulares completados antes de sufrir SR y 2) La SR prematura inducida por estrés, que puede ser desencadenada por múltiples factores tales como la exposición a concentraciones elevadas de oxígeno (hiperoxia), estrés replicativo causado por daño al DNA y la hiperactivación de oncogenes, a esta senescencia prematura se le conoce como STASIS (*stress or aberrant signaling-induced senescence*) para poder distinguirla de la SR asociada al número de divisiones celulares (Parrinello et al., 2003).

#### **3.2 La senescencia replicativa asociada al acortamiento de los telómeros.**

Los telómeros son secuencias de DNA que cubren los extremos finales de los cromosomas y forman complejos con varias proteínas lo cual protege a los cromosomas de la erosión y de la fusión de sus extremos terminales. Consisten de arreglos repetidos en *tandem* de la secuencia hexamérica TTAGGG,

con un tamaño aproximado de 15 kb al nacimiento y algunas veces menor a 5 kb en estados de enfermedad crónica. Las repeticiones teloméricas ayudan a mantener la integridad cromosomal y proveen un potencial para expandir el DNA. Los extremos de los telómeros están protegidos y regulados por proteínas de unión a telómeros que forman una estructura similar a un lazo llamada “loop-t”, esta capa protectora al final de los cromosomas protege a los telómeros de ser reconocidos como DNA roto o dañado, por lo tanto cubre las terminales cromosómicas de la degradación, recombinación y reacciones de unión (Shay y Wright 2004).

La telomerasa es una ribonucleoproteína celular responsable de adicionar repeticiones teloméricas en las terminales 3' de los cromosomas. Se ha propuesto que los telómeros actúan como un reloj biológico, ya que éstos se acortan con cada división celular en organismos que carecen de la enzima telomerasa en tejidos somáticos adultos. La DNA polimerasa no es capaz de replicar los telómeros durante la síntesis de DNA, generando la pérdida de repeticiones teloméricas cada vez que la célula se divide, lo que finalmente lleva a la SR en células de organismos que no expresan telomerasa en tejidos somáticos adultos, tal es el caso de los humanos y los primates en los cuales el acortamiento crítico de los telómeros se correlaciona directamente con la SR (Shay y Wright 2005). El acortamiento de los telómeros desestabiliza los cromosomas, los cuales ya no son capaces de reclutar las proteínas del complejo “loop-t”, por lo tanto este complejo no se forma y el cromosoma queda descubierto. Esta situación genera un estado semejante al producido por la ruptura del DNA, generando un estado celular altamente inestable que puede activar las vías de p53 o p16ink4, que eventualmente generan senescencia o apoptosis (Fagagna et al., 2003; Patil et al., 2005). Evidencia directa de que el acortamiento de los telómeros está relacionado con la SR se ha mostrado *in vitro* en células que carecen de la enzima telomerasa, las cuales son capaces de dividirse de manera indefinida al ser manipuladas genéticamente y expresar activamente la enzima telomerasa (Shay y Wright, 2005). Células de varias especies de mamíferos como los roedores, conejos, liebres, entre otras no muestran SR *in vitro* dependiente de telómeros (Forsyth et al., 2005), dado que en estos animales los telómeros son mucho más largos que en humanos y al menos en el caso de los roedores, estos expresan telomerasa en células somáticas adultas.

### **3.3 La senescencia celular asociada a STASIS.**

En varios tipos de células incluyendo los fibroblastos humanos, la proliferación puede ser detenida espontáneamente por estrés celular. Este tipo de arresto del crecimiento celular depende de la expresión de un inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas ó p16ink4a que mantiene a la proteína Rb (reguladora del ciclo celular) en su forma no fosforilada (Ohtani et al., 2004). Aunque la senescencia celular inducida por p16ink4a ha sido descrita en cultivo, la expresión de éste inhibidor también se activa con la edad en

tejidos normales y en respuesta al estrés causado por la quimioterapia (Zindy et al., 1997; Schmitt et al., 2002; Krishnamurthy et al., 2004). La senescencia inducida por la expresión de p16ink4a ha recibido varios nombres como senescencia prematura, senescencia prematura inducida por estrés o mejor conocida como STASIS. En células humanas la STASIS puede desencadenarse mediante la activación de p16ink4a, pero este proceso no es revertido por la inactivación de Rb o p53, lo cual sugiere que éstas células pueden quedar indefinidamente arrestadas en las fases G2 o M del ciclo celular (Takahashi et al., 2007; Shay y Wright, 2005), a diferencia de las células murinas en cultivo, donde el arresto del ciclo celular inducido por la expresión de p16ink4a puede revertirse por la inactivación de Rb o p53 (Takahashi et al., 2007). Este tipo de arresto del crecimiento celular se confunde fácilmente con la SR asociada al acortamiento de los telómeros. Sin embargo, las células que sufren SR asociada al acortamiento de los telómeros pueden ser immortalizadas por la expresión de la enzima telomerasa (hTERT), lo cual no sucede en células que sufren arresto celular debido a STASIS, por lo tanto este tipo de senescencia no involucra un número de divisiones celulares (Shay y Wright, 2005).

### **3.4 La senescencia estocástica.**

Como se describió anteriormente, se ha pensado que el número de divisiones celulares y el estrés están involucrados en limitar el potencial proliferante de las células y generar arresto del crecimiento celular. Sin embargo existe evidencia disponible que apunta hacia un tercer mecanismo relacionado con la SR de las células, que es la senescencia estocástica que no depende de factores solubles que actúan en *trans*, ni del acortamiento de las regiones teloméricas y que además es un proceso generalizado que ocurre tanto en células en cultivo como en células primarias que forman tejidos y que no están sujetas a divisiones seriales.

Como se ha mencionado, los fibroblastos humanos en cultivo presentan un número limitado de divisiones celulares (40-60 duplicaciones) antes de entrar en un estado de arresto del crecimiento celular (Hayflick y Moorhead, 1961; Hayflick, 1965). Sin embargo en experimentos realizados a partir de una sola célula se ha observado que estos mismos fibroblastos presentan una distribución bimodal con respecto a su potencial proliferante, ya que las células derivadas de la misma población clonal sometidas a cultivos independientes muestran que muchas de éstas células dejan de dividirse inmediatamente, mientras que otras pueden continuar dividiéndose por más de 30 ciclos (Smith y Hayflick, 1974; Smith y Whitney, 1980). La heterogeneidad en el potencial proliferante aparece rápidamente dentro de la primer clona de fibroblastos diploides, el potencial proliferante de dos células provenientes del mismo evento mitótico pueden diferir hasta en 8 duplicaciones además de que el porcentaje de las células que son capaces de sufrir éste mismo número de divisiones mitóticas se reduce si las clonas son tomadas de cultivos con

mayor número de duplicaciones (Jones et al., 1985). Por lo tanto, el número de células incapaces de dividirse o sintetizar DNA se incrementan exponencialmente con la edad del cultivo, lo cual sugiere que existe un mecanismo estocástico que limita el potencial proliferante de las células en cultivo (Smith y Hayflick, 1974; Martin, 1977; Jones et al., 1985).

Por lo tanto, las poblaciones de células en cultivo al parecer son heterogéneas y están compuestas de dos subpoblaciones celulares, una con bajo potencial proliferante y otra con alto potencial proliferante, lo cual indica que el mecanismo que limita la capacidad proliferativa de la célula no puede ser únicamente el número de divisiones celulares, más bien sugiere un mecanismo estocástico involucrado en el establecimiento de la vida media de las células en cultivo (Smith y Hayflick, 1974). Este mecanismo tampoco puede estar relacionado con la erosión de los telómeros como se ha propuesto anteriormente, ya que se ha observado en hepatocitos primarios de rata (las cuales tienen telómeros muy largos) que el número de hepatocitos capaces de dividirse en respuesta a un estímulo mitótico se reduce significativamente con la edad del animal (Michalopoulos y DeFrances, 1997). También, el hecho de que los hepatocitos de rata se encuentren arrestados en G0 de manera indefinida sugiere que la pérdida del potencial proliferante *in vivo* no está relacionado directamente con un mecanismo de conteo de divisiones celulares y que un mecanismo estocástico que limita el potencial proliferante de las células ocurre incluso en células que se encuentran arrestadas en G0 (Aranda-Anzaldo, 2009).

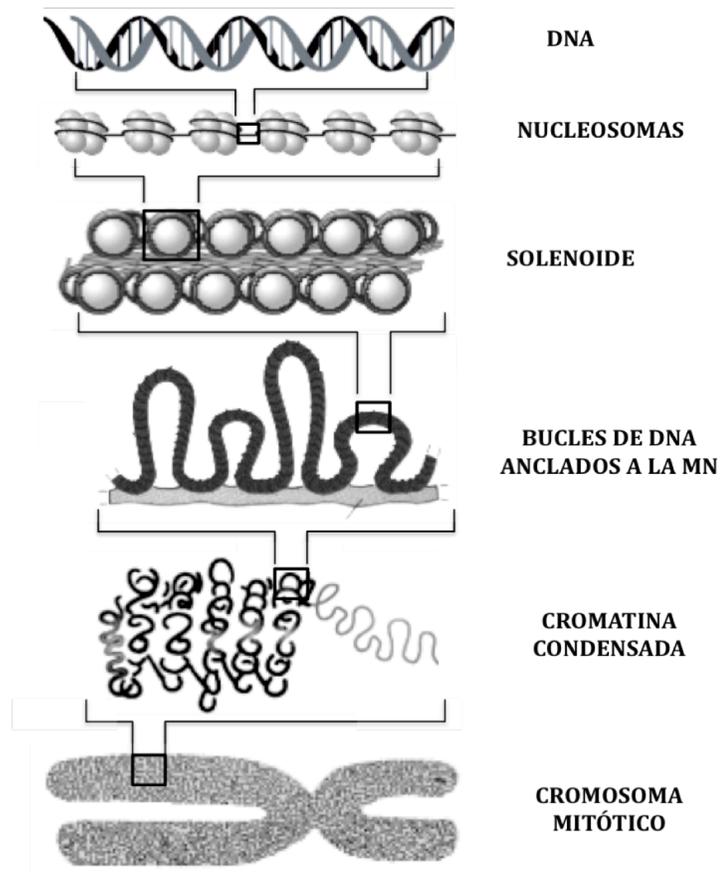
### **3.5 La organización del DNA en el núcleo celular.**

El contenido de DNA en una célula humana diploide es de  $6 \times 10^9$  pb que corresponde a una longitud aproximada de 2 metros, el cual debe ser empaquetado en un núcleo con un diámetro de aproximadamente  $10 \mu\text{m}$  (Jackson, 1991). Esto representa un gran problema topológico para las células de mamífero, pues la longitud del DNA debe ser reducida unas 50,000 veces aproximadamente, para poder ajustarse al tamaño del núcleo. No obstante el DNA debe presentar una conformación dinámica que le permita tener un papel extremadamente activo en ciertos procesos biológicos como la replicación, transcripción y segregación de cromátidas hermanas. Tales procesos parecen demandar precisión en la organización del material genético, lo cual sería prácticamente imposible de lograr sin un orden estructural dentro del núcleo. Este problema se resuelve mediante un incremento progresivo en el grado de condensación de la hebra de DNA que permite lograr un factor de empaquetamiento del orden de  $10^4$ .

Se ha establecido que existen varios niveles de organización del DNA en el núcleo celular, el primero de ellos es la propia estructura lineal del DNA en forma de dos cadenas antiparalelas descritas por Watson y Crick (1953), dando como resultado la doble hélice. El siguiente nivel es el nucleosoma, que es la unidad

básica estructural de la cromatina. Los nucleosomas constan de 146 pb de DNA enrollados 1.75 veces alrededor del octámero de histonas formado por dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Este empacamiento mediado por las histonas produce una fibra de 10 nm de diámetro que consta de nucleosomas separados por segmentos de DNA que funcionan como eslabones (Calladine et al., 2004; Wachsmuth et al., 2008). Una molécula de la histona H1 se fija en el punto de entrada y salida del DNA entre cada nucleosoma produciendo un arreglo espacial de los nucleosomas en forma de hélice (solenoides). El siguiente nivel de organización del DNA es la estructura en espiral conocida como solenoide, en la cual la fibra de 10 nm se enrolla sobre sí misma formando una hélice con aproximadamente seis nucleosomas por cada vuelta, con un diámetro aproximado de 30 nm y que representa un índice de condensación de 40 veces con respecto al DNA desnudo. En ausencia de la histona H1 este tipo de plegado no ocurre por lo tanto esta histona tiene un papel crítico en la organización del DNA.

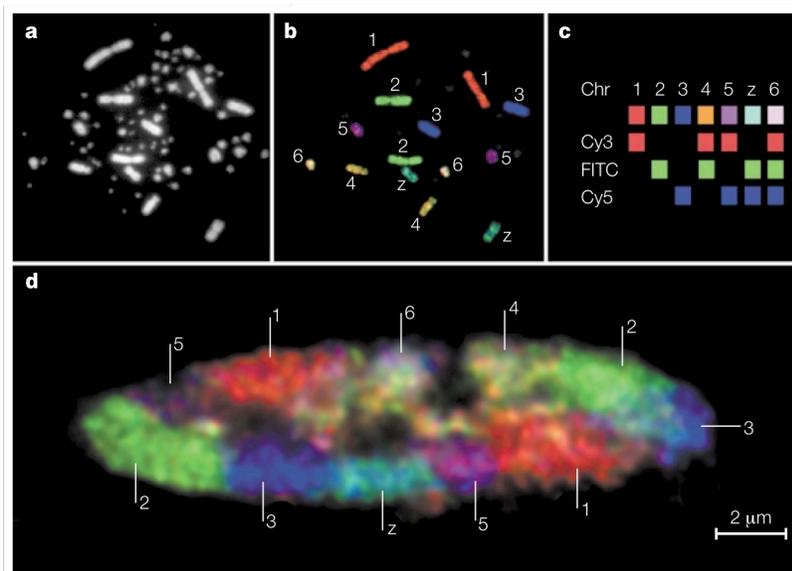
El grado de condensación de la cromatina varía a lo largo del ciclo celular. Durante la interfase una fracción importante de la cromatina permanece relativamente extendida y distribuida homogéneamente dentro del núcleo, formando así la eucromatina, la cual en su mayoría se encuentra en forma de solenoide. La fibra de solenoides de 30 nm está organizada a su vez en bucles que contienen un promedio de 5 a 200 kilo pares de bases (kpb) de DNA (Jackson et al., 1990). Los bucles están constreñidos topológicamente pues se encuentran anclados por su base a una subestructura proteica conocida como matriz nuclear (MN) en interfase o al andamio cromosómico en mitosis (Fig. 1) (Razin, et al., 1995; Sheval y Polyakov, 2006). La estructura de los bucles de DNA anclados a la MN fue inferida inicialmente por mediciones de sedimentación nuclear realizadas con bromuro de etidio (EtBr) en preparaciones con altas concentraciones de sal (Cook y Brazell, 1975; Cook et al., 1976; Benyajati y Worcel, 1976) y confirmada por la visualización directa por microscopía de los bucles de DNA extendidos más allá de la lámina nuclear después de la remoción de las histonas (Vogelstein et al., 1980). Estos bucles anclados a la MN constituyen el orden superior de organización del DNA (OSODNA). Durante la mitosis la cromatina alcanza su máximo grado de condensación formando los cromosomas mitóticos que se repartirán a las células hijas. Un modelo sugiere que en el cromosoma mitótico, los bucles están dispuestos radialmente, 18 bucles por vuelta, formando la minibanda, que equivale a una vuelta completa de bucles alrededor de la cromátida y contiene aproximadamente un millón de pares de bases (Nelson et al., 1986).



**Figura 1:** Esquema de los diferentes niveles de organización del DNA en la cromátida del cromosoma. Se observan los diferentes niveles de organización del DNA al interior del núcleo, primero la doble hélice de DNA se enrolla en un octámero de histonas para formar el nucleosoma, el cual posteriormente se enrolla sobre sí mismo formando el solenoide, esta estructura se encuentra anclada a la MN formando los bucles de DNA, que es la conformación que tiene el DNA en las células en interfase. Estos bucles de DNA llegan a su máximo grado de compactación al formar el cromosoma mitótico durante el ciclo celular.

### 3.6 Territorios cromosómicos.

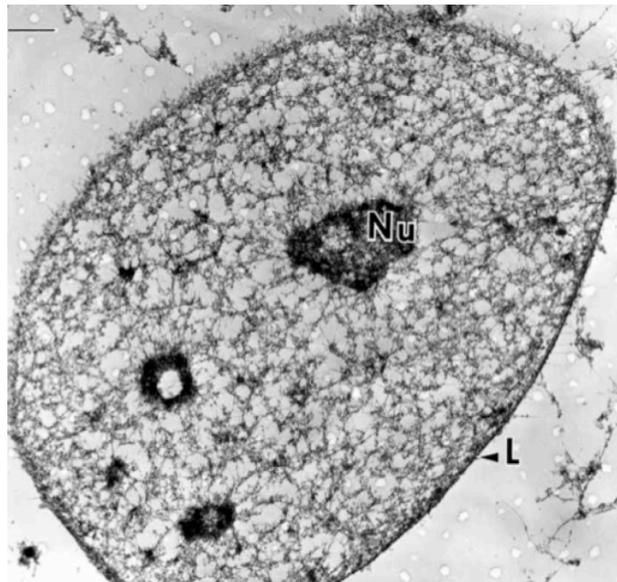
Recientemente se ha establecido que los cromosomas en el núcleo en interfase ocupan zonas bien delimitadas que no se traslapan (Fig. 2), denominadas territorios cromosómicos (Cremer y Cremer, 2006a; Cremer y Cremer, 2006b). Dichos territorios cromosómicos están separados por compartimentos llamados regiones intercromatínicas, en las cuales aparentemente los bucles de DNA situados en la periferia de los territorios pueden extenderse, además estas regiones intercromatínicas pueden contener algunos cuerpos nucleares como los “speckles”, PLMs o cuerpos de Cajal (Brasch y Ochs, 1992). Experimentos recientes sobre la posición de los territorios cromosómicos dentro del núcleo sugieren que la disposición de los cromosomas en territorios específicos depende de la asociación del DNA con la MN (Petrova et al., 2005; Petrova et al., 2006).



**Figura 2:** Territorios cromosómicos en las células en interfase. A) Preparación de cromosomas metafásicos de células diploides teñidos con DAPI. B) Cromosomas metafásicos después de la hibridación con diferentes sondas fluorescentes específicas. C) Fluoróforos utilizados para cada uno de los cromosomas analizados. D) Sección óptica de un núcleo en interfase mostrando los distintos territorios cromosómicos. Tomada de Cremer y Cremer, 2001.

### 3.7 La Matriz Nuclear (MN).

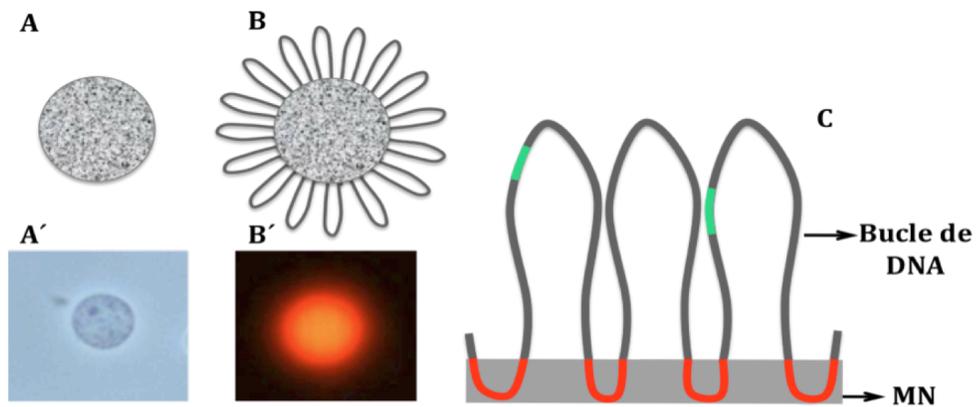
La MN se ha definido operacionalmente como aquella subestructura nuclear que se obtiene después de tratar a la célula con altas concentraciones de sal y detergentes no iónicos (para extraer la mayor parte de las proteínas nucleares), seguido de la digestión total del DNA mediante el tratamiento con nucleasas (Nickerson, 2001). Este tratamiento produce una estructura residual que conserva el tamaño y la forma del núcleo original, formada por una red de material insoluble, que consiste principalmente de tres elementos: a) la lámina nuclear, b) el residuo nucleolar y c) la red interna de fibras granulares compuesta por proteínas y RNA (Mika y Rost, 2005) (Fig. 3). La MN está constituida por proteínas (97.6%), pequeñas cantidades de RNA (1.2%), DNA (menos de 0.1%) carbohidratos (5.5% azúcares neutros) y fosfolípidos (1.1%) (Berezney et al., 1995). Aunque no se conoce con precisión la composición exacta de la MN, el análisis por electroforesis en dos dimensiones de las proteínas de la MN en diversos tipos y líneas celulares revela que está compuesta de al menos 400 proteínas diferentes (Mika y Rost, 2005), entre las que resaltan las láminas A, B y C, las cuales migran entre 60-70 kDa y son los componentes más abundantes de la envoltura nuclear residual también llamada lámina nuclear (Fey y Penman, 1988).



**Figura 3:** Micrografía electrónica de la MN. La MN consiste de la lámina nuclear (L) y una red intrincada de fibras conectadas a la lámina y bien distribuidas a lo largo del volumen nuclear. Los nucleolos (Nu) permanecen después de la extracción y están conectados a las fibras de la MN interna. Tomada de Nickerson, 2001.

Se ha propuesto que la MN en el núcleo celular juega un papel semejante al del citoesqueleto de la célula, sirviendo como soporte para el anclaje de los dominios estructurales de la cromatina, definidos por los bucles de DNA, pero también ha sido asociada como soporte estructural para diversos procesos fundamentales como son: la replicación, la transcripción y el almacenamiento y procesamiento de los transcritos primarios (Tsutsui et al., 2005; Ottaviani et al., 2008).

Cuando se tratan núcleos celulares en presencia de sales y detergentes no iónicos, se obtiene una subestructura nuclear denominada nucleoide, formada por la MN y los bucles de DNA anclados a ella (Fig. 4). Este DNA conserva el hiperenrollamiento a pesar de encontrarse desprovisto de histonas y proteínas del grupo de alta movilidad, debido a que los bucles están topológicamente constreñidos al permanecer anclados por su base a la MN (Aranda-Anzaldo y Dent, 1997; Aranda-Anzaldo et al., 1999).



**Figura 4:** Representación esquemática de la MN, los nucleoides y los bucles de DNA. (A) Esquema de la MN y (B) su nucleoide correspondiente. (A') Micrografía en contraste de fases de la MN y (B') del nucleoide (MN+DNA) de una neurona teñido con 80µg/ml de EtBr donde se muestra cómo el DNA forma un halo fluorescente alrededor de la MN. (C) Representación lineal de los bucles de DNA anclados a la MN, las secuencias rojas representan el DNA directamente anclado a la MN (LARs), las secuencias verdes representan regiones de DNA con potencial para anclarse a la MN (MARs potenciales).

Varios estudios han demostrado que el proceso de replicación se encuentra asociado con la MN, ya que se ha observado la asociación directa de polimerasas activas con el esqueleto subyacente (Cook, 1991; Hozák, et al., 1993). Asimismo, componentes de los complejos de transcripción como la RNA polimerasa y factores generales de la transcripción se han encontrado en estrecha relación con la subestructura nuclear (Kimura et al., 1999). Estos datos sugirieron que el nucleoesqueleto participa en el sitio activo de transcripción y replicación (Wei, et al., 1998). Dentro del núcleo la organización de la cromatina en

territorios cromosomales se mantiene mediante la asociación del DNA con la MN, ya que en extracciones de la MN con altas concentraciones de sal pero sin el uso de nucleasas se preserva la organización de los territorios cromosomales (Ma et al., 1999). La desintegración de los componentes internos de la MN con RNasa resulta en la pérdida de la arquitectura de los territorios cromosomales, lo cual indica que los cromosomas se encuentran restringidos a espacios particulares mediante su asociación con elementos de la red interna de la MN (Ma et al., 1999). Se ha mostrado también que la localización específica de los centrómeros al interior del núcleo se conserva a pesar de la remoción de hasta el 80 % de la cromatina, indicando que la organización de los cromosomas en interfase se mantiene por la interacción entre el DNA y la MN (Petrova et al., 2005; Petrova et al., 2006).

Los bucles de DNA topológicamente constreñidos e hiperenrollados están anclados a la MN mediante pequeñas secuencias de DNA no codificante conocidas como regiones de anclaje a la matriz o MARs (*matrix attachment regions*) que son las responsables de mediar las interacciones entre los dominios genómicos y la MN (Berezney et al., 1995; Ottaviani et al., 2008) (Fig. 4C). La comparación de la secuencia genómica entre los elementos MARs que han sido identificados no muestra homología de secuencia, sin embargo, estas regiones de DNA son por lo general secuencias ricas en A-T. La longitud promedio de los MARs puede variar entre 100 y varias kilobases (Iarovaia et al., 2004; Ottaviani et al., 2008). Los MARs pueden ser clasificados de acuerdo a su afinidad por la MN como facultativos (funcionales), los cuales son de baja afinidad y no resisten la extracción con altas concentraciones de sal (Fig. 4C), dichos anclajes han sido asociados con regulación transcripcional (Heng et al., 2004; Ottaviani et al., 2008). Los MARs estructurales (permanentes) tienen gran afinidad por la MN, son resistentes a la extracción con altas concentraciones de sal y al parecer constituyen los anclajes que subdividen el genoma en dominios estructurales (Razin et al., 1995; Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003). La estructura del orden superior de organización del DNA en interfase y metafase se mantiene probablemente debido a los MARs estructurales. Los cuales constituyen los puntos reales de anclaje con la MN (Figura 4C) y se han denominado regiones de anclaje del bucle o LARs (*Loop attachment region*) (Razin, 2001; Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003; Maya-Mendoza et al., 2005).

### **3.8 El modelo de tensegridad.**

El concepto de tensegridad (principio utilizado en la construcción) define estructuras que estabilizan su forma mediante tensión continua, dichas estructuras son descritas como redes de miembros estructurales que resisten la distorsión de la forma y se auto-estabilizan incorporando elementos de soporte que resisten la compresión (Ingber, 2003). Nuestro cuerpo es un ejemplo claro de una estructura de tensegridad, los huesos actúan como barras de acero para resistir la tensión de los músculos y ligamentos y la estabilidad de nuestro cuerpo varía dependiendo del tono (pre-estrés) en los músculos (Ingber, 2003). El modelo de tensegridad celular propone que la célula completa es una estructura pre-estresada, en la cual las fuerzas de tensión están representadas por los microfilamentos y los filamentos intermedios del citoesqueleto, estas fuerzas están balanceadas por elementos estructurales interconectados que resisten la compresión (microtúbulos internos y matriz extracelular) (Ingber, 2003). Actualmente existe amplia evidencia de que la célula es un sistema complejo de cables capaz de transducir información mecánica. Por lo tanto, las células dentro de un tejido sólido son parte de un sistema continuo de mecanotransducción que acopla la matriz extracelular con el citoesqueleto y el núcleo de la célula (Wang et al., 2009). Por tal motivo, la célula puede ser modelada como un campo de vectores en el cual el citoesqueleto-nucleosqueleto mecánicamente acoplados pueden actuar como transductores coordinados de la información mecánica (Aranda-Anzaldo, 1989).

Las fuerzas de tensión y compresión que soportan las células de manera interna y externa son aplicables a niveles microscópicos desde los primeros indicios de la formación del organismo. Se ha propuesto que la morfogénesis del tejido y el desarrollo embrionario pueden estar controlados mecánicamente guiados por fuerzas micromecánicas que se generan desde dentro y son aplicadas por el citoesqueleto a las células que están formando el tejido (Ingber, 2006). El estudio de varios tipos celulares en cultivo ha confirmado que cambios en el balance de las fuerzas mecánicas entre la célula y la matriz extracelular controlan todos los comportamientos celulares responsables del desarrollo del tejido (Folkman y Moscona 1978, Moore et al., 2005). Se ha asumido que cambios en el destino celular están controlados a través de una serie de eventos regulatorios que inducen a la célula hacia un fenotipo u otro, los cuales han sido nombrados como vías de crecimiento o vías de diferenciación (Callaway et al., 2001; Marcotte, 2001). También se ha observado que variaciones en la forma de la célula son capaces de producir cambios abruptos en el destino celular, tales como apoptosis, diferenciación o crecimiento, este hecho es similar a una fase de transición en un sistema físico (Ingber, 2006).

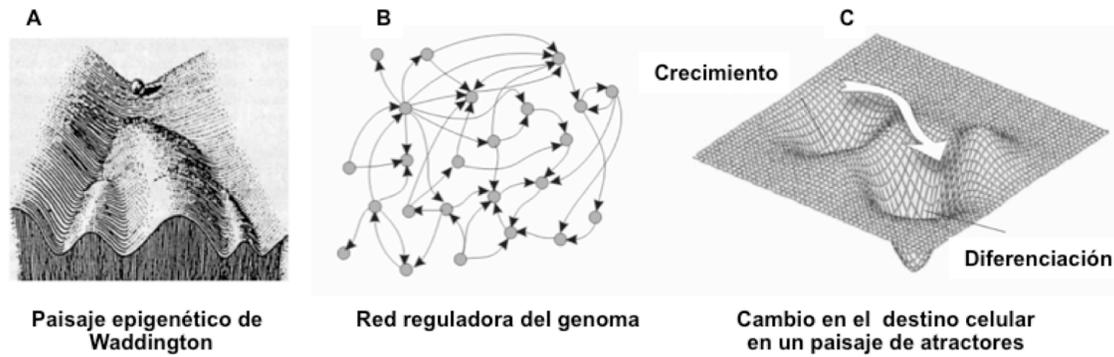
En modelo de tensegridad celular requiere una estructura en la cual el núcleo se encuentre mecánicamente unido a través del citoesqueleto al exterior de la célula (Nickerson et al., 1995). La MN es parte de una gran estructura que conecta al núcleo con la red extensa de filamentos intermedios en el citoesqueleto, los

cuales se unen a las células adyacentes mediante los desmosomas, ésto sugiere que la MN y los filamentos intermedios son el soporte fundamental para la arquitectura tanto de la célula como del tejido. Los filamentos intermedios pueden acoplar mecánicamente el núcleo al exterior de la célula y de esta manera estabilizar su forma y posición (Hansen e Ingber, 1992; Ingber, 1993).

De acuerdo con este principio, algunos modelos predicen que cambios permanentes en la forma de las células puede modificar las interacciones mecánicas dentro de la célula, lo cual podría generar cambios estructurales dentro del núcleo celular resultando en la redefinición de los bucles estructurales (Aranda-Anzaldo et al., 1989). Se ha demostrado *in vitro*, que un cambio estable en la forma de la célula establece nuevas interacciones estructurales DNA-MN, lo cual sugiere que la forma de la célula y del núcleo pueden actuar como señales para que algunos MARs potenciales puedan actualizarse y formar LARs en la MN (Martinez-Ramos et al., 2005).

### **3.9 Atractores.**

Los atractores son estados estables que emergen espontáneamente en grandes redes interconectadas, las cuales exhiben una arquitectura muy particular debida a la restricción dinámica impuesta por interacciones reguladas (Kauffman, 1969, 1993). Las redes biológicas exhiben este mismo comportamiento, por lo que se ha propuesto que los diferentes destinos celulares que pueden ser tomados por las células representan distintos estados o atractores en la red del genoma (Huang e Ingber, 2000). La existencia de distintos atractores estables o destinos celulares es análogo al control del desarrollo presentado por Waddington (1956), donde se menciona que diferentes linajes (destinos) en el desarrollo son robustos y mutuamente excluyentes. Para visualizar más fácilmente este fenómeno se utiliza la analogía de una pelota rodando por un paisaje que contiene crestas y valles. La pelota rueda progresivamente cuesta abajo sobre cualquier colina y puede descansar en alguno de los valles que se encuentran abajo (Fig. 5). Los valles representan cuencas de atracción y al sitio dónde la pelota tiende a descansar (el punto más bajo del valle) se le conoce como atractor. Por lo tanto, en cualquier punto del tiempo la posición de la pelota puede representar el estado interno de la célula, el cual puede ser modificado por algún estímulo y entonces la célula tenderá a moverse a través del espacio de estado (laderas), dicha célula puede seguir diferentes caminos o vías, pero siempre caerá en alguno de los destinos celulares potenciales (atractores).



**Figura 5:** Waddington propone un modelo para explicar cómo es que la célula decide qué destino tomar durante el desarrollo (A). Este concepto puede ser considerado como una manifestación de las constantes dinámicas en la red reguladora del genoma (B), la cual crea un espacio de estado o paisaje con distintos atractores (C), en el cual distintos destinos celulares como el crecimiento y la diferenciación representan distintos atractores dentro del mismo paisaje. Las células pueden tomar diferentes vías para cruzar las colinas, sin embargo rodarán hasta parar en un punto en común al final del siguiente valle; estos puntos bajos (atractores) son los diferentes estados que una célula puede exhibir (Tomada y modificada de Inberg, 2006).

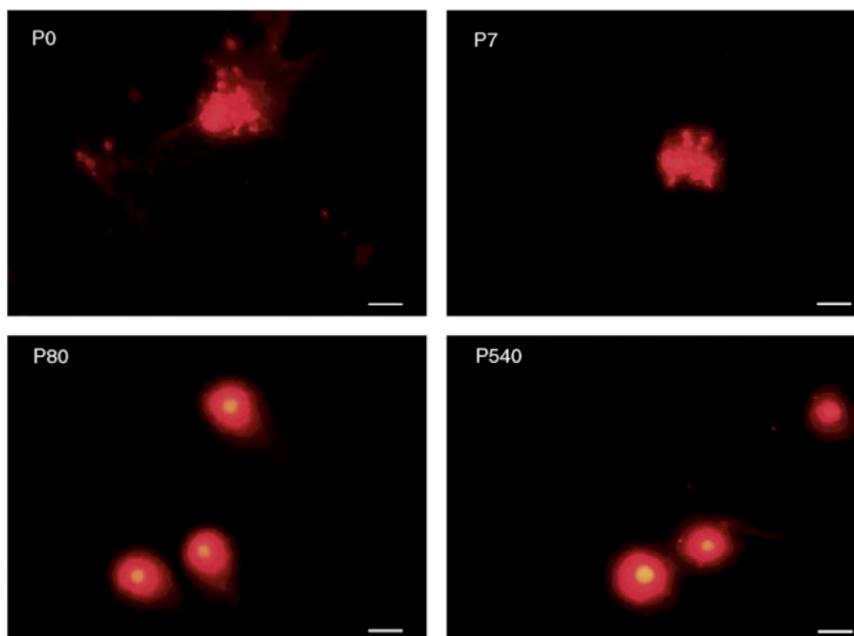
### 3.10 Dinámica estructural.

Por muchos años el término entropía se ha relacionado de manera errónea con el término de desorden, dado que Boltzmann utilizó en su tiempo el ejemplo del gran desorden de las moléculas de un gas a altas temperaturas para describir su gran entropía. Sin embargo la entropía no es una medida del desorden o el caos, sino una medida de la difusión, disipación o dispersión de la energía en un estado final comparado con un estado inicial dentro de un sistema y entre el sistema y su entorno (Lambert, 2002); por lo tanto, un incremento en la entropía de un sistema involucra la dispersión de la energía en un mayor número de microestados (estados cuánticos). Se ha observado que la entropía crece en la dirección positiva del tiempo, es decir, que cuanto más pasa el tiempo sobre un sistema físico la entropía de dicho sistema va en aumento, lo cual supone que los sistemas físicos y biológicos se encuentran inicialmente en estados de baja entropía los cuales se encuentran dados por una asimetría temporal (Penrose, 1996). La tendencia natural para la mayoría de los sistemas físicos es hacia la reducción de las asimetrías, de tal manera que el sistema evoluciona en el tiempo hasta volverse más simétrico (Aranda-Anzaldo, 1997). Todos los sistemas biológicos tienden hacia un estado de menor energía libre, esto corresponde a un régimen de estabilidad. Esta tendencia de los sistemas hacia la estabilidad ilustra la tendencia unitaria hacia la simetría (Aranda-Anzaldo, 1997). La configuración asimétrica de un sistema le confiere a este la posibilidad de cambiar,

mientras que la simetría se considera la base de la estabilidad, por lo tanto la tendencia a la reducción de las asimetrías en los sistemas y por lo tanto el aumento en la entropía constituyen los principios formativos necesarios para explicar el desarrollo y estabilidad de las formas regulares observadas en la naturaleza. En los sistemas físicos, estadios más simétricos constituyen atractores estructurales con respecto a estadios más asimétricos (Aranda-Anzaldo, 1997).

Por otro lado, los sistemas físicos estables (simétricos) son resistentes al cambio, por lo que un núcleo celular estructuralmente estable no puede ser la base para funciones dinámicas como la replicación del DNA, la mitosis y el rearrreglo de territorios cromosómicos característico de las células con un alto potencial proliferante. Por lo tanto la organización topológica del DNA que resulta en posiciones privilegiadas de las secuencias génicas codificantes con respecto a la MN (Maya-Mendoza et al., 2005) es altamente inestable y está destinada inevitablemente a evolucionar hacia una configuración de mayor estabilidad (Aranda-Anzaldo, 2009). Una configuración topológica del DNA en la cual la mayoría de las secuencias MARs potenciales se encuentren actualmente unidas a la MN podría resultar en bucles más pequeños y estables que pueden constituir un atractor estructural (Aranda-Anzaldo, 2009). Una configuración muy estable de los bucles de DNA satisface la segunda ley de la termodinámica dado que el estrés estructural a lo largo de la molécula de DNA se encuentra más disperso (mejor repartido) dentro del volumen nuclear, incrementando el número de interacciones DNA-MN. Un gran número de estas interacciones crea un complejo estructural similar a un puente colgante en el cual, las vigas (las proteínas) y los tensores (DNA) interactúan para crear una estructura completa altamente estable (Aranda-Anzaldo, 2009).

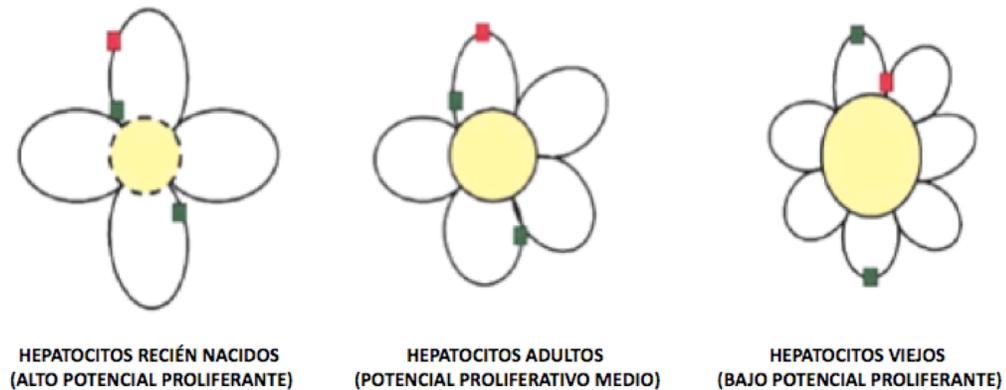
En hepatocitos, el estudio de las interacciones entre los bucles de DNA y la MN durante el desarrollo postnatal y el envejecimiento natural han mostrado que existe un proceso de estabilización de dichas interacciones conforme avanza la edad del animal (Maya-Mendoza et al., 2005). En nucleoides (MN+DNA) de hepatocitos de ratas recién nacidas (P0) y de 7 días postnatales (P7) tratados con altas concentraciones de EtBr se observa la desintegración y severa fractura de la MN, en los cuales las fuerzas expansivas producidas por la relajación y desenrollamiento de los bucles de DNA son suficientes para causar estragos en la MN de estas células (Fig. 6). Por el contrario, en nucleoides de hepatocitos de ratas adultas (P80) y ratas viejas (P540) la misma fuerza de relajación y desenrollamiento de los bucles de DNA generada por el EtBr produce halos muy bien definidos que rodean a la MN, la cual permanece intacta (Fig. 6), indicando que las interacciones DNA-MN se estabilizan y se fortalecen con la edad (Maya-Mendoza et al., 2005).



**Figura 6:** Micrografías en fluorescencia de nucleoides de hepatocitos de rata de diferentes edades postnatales. Los nucleoides fueron tratados con 80  $\mu\text{g/ml}$  de bromuro de etidio (EtBr) para inducir el desenrollamiento y la relajación de los bucles de DNA. Nótese la pérdida completa del DNA y la desintegración de la MN en P0 y P7, además del halo simétrico que se forma alrededor de la MN estable en P80 y P540. Hepatocitos de (P0) ratas recién nacidas, (P7) de 7 días postnatales, (P80) adultas y (P540) viejas. Tomada de Maya-Mendoza et al., 2005. Barra=25  $\mu\text{m}$

Además de la estabilidad de las interacciones DNA-MN que se lleva a cabo durante el envejecimiento de los hepatocitos, también se ha observado una reducción significativa en el tamaño promedio del bucle de DNA, de la rata joven a la rata vieja (acortamiento aproximado de 36%). Asimismo se ha observado una disminución en la sensibilidad del DNA de los bucles a la acción de la DNasa I, además de un alejamiento gradual de las secuencias génicas con respecto a la MN (Maya-Mendoza et al., 2005). Estos fenómenos han sido relacionados directamente con el envejecimiento natural, la reducción del potencial proliferante y la tendencia de los hepatocitos hacia la diferenciación terminal (Michalopoulos y DeFrances, 1997). Maya-Mendoza et al, en 2005 propusieron un modelo (Fig. 7) en el cual los bucles de DNA en los hepatocitos de ratas recién nacida son menores en número pero mayores en tamaño, con todas las secuencias génicas localizadas en una posición muy próxima a la MN, pero las interacciones DNA-MN son muy inestables. Sin embargo, conforme la célula envejece y pierde su potencial proliferante, los bucles de DNA se vuelven más cortos y más estables, generando un mayor número de interacciones DNA-MN (Maya-Mendoza et al., 2005). Un gran número de interacciones DNA-MN y un mayor número de bucles significativamente más cortos y más estables coincide con la actualización de muchos MARs potenciales que ahora se encuentran anclados a la MN formando nuevos anclajes estructurales o LARs. La

actualización de MARs relacionada con el envejecimiento natural del animal modifica la organización estructural del DNA al interior del núcleo, pues secuencias que en los hepatocitos de las ratas recién nacidas se encontraban en posiciones privilegiadas cercanas a la MN alcanzan su posición más lejana con respecto a la MN en los hepatocitos de las ratas viejas (Maya-Mendoza et al., 2005).



**Figura 7:** Modelo que representa el alejamiento progresivo de los genes relativo a la MN y la reducción gradual en el tamaño del bucle de DNA además del incremento en el número de bucles con la edad en hepatocitos de rata. Los cuadros verdes representan genes (regiones codificantes). Los cuadros rojos representan secuencias no codificantes. Los círculos amarillos representan la MN. Las líneas punteadas indican que la MN es inmadura en los hepatocitos de ratas recién nacidas. Tomada y modificada de Maya-Mendoza et al., 2005.

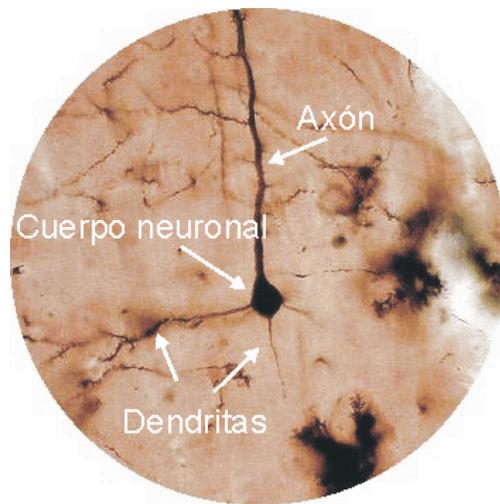
Existe evidencia de que cuando múltiples copias de MARs se encuentran presentes, éstas son usadas de manera selectiva, lo cual es un indicativo de adaptabilidad de las secuencias MARs para servir como anclajes sólo bajo ciertas condiciones (Heng et al., 2004). Se ha sugerido que la selectividad dinámica en el uso de MARs como anclajes del DNA puede modular la longitud promedio del bucle de DNA y la estabilidad de las relaciones topológicas DNA-MN durante el desarrollo y la diferenciación celular (Berezney, 1979; Aranda-Anzaldo, 1989). Por otro lado, sólo se han identificado un número limitado de proteínas que participan en la unión DNA-MN, que son dependientes de la secuencia del DNA (Tsutsui et al., 2005), por lo que se piensa que las interacciones DNA-MN se dan a gran escala y son el resultado de un proceso indirecto entre el DNA y las proteínas de la MN. Tales interacciones indirectas dependen de la forma del DNA y de sus propiedades mecánicas (Zhang et al., 2004). Dentro del genoma de las células eucariotes existen secuencias de DNA no codificante con un amplio rango de afinidades por sitios potenciales de anclaje a la MN, así como en la MN hay proteínas estructurales con un rango amplio de afinidades por los distintos MARs potenciales, un modelo que explica cómo se regulan y actualizan dichas afinidades sugiere que la unión del MAR con la MN depende de tres factores básicos: 1) El grado de

mutua afinidad entre la secuencia de DNA y el sitio potencial de anclaje en la MN, 2) El grado de hidrancia estérica impuesto por la densidad relativa de sitios potenciales de anclaje por unidad de longitud de la MN y el límite de deformabilidad en el DNA y 3) El grado de estrés estructural a lo largo de la fibra de DNA que modula la deformabilidad completa del DNA. Por lo tanto, una secuencia de DNA puede o no anclarse de manera estable a la MN dependiendo de estos tres factores (Aranda-Anzaldo, 2009).

Es decir, inicialmente en hepatocitos de ratas P0 y P7 la organización topológica del DNA es altamente asimétrica, pero conforme pasa el tiempo una mayor actualización de los MARs potenciales del genoma que se convierten en LARs produce una mayor cantidad de bucles, más estables, de menor tamaño, pero más rígidos y por lo tanto resistentes al cambio, generando de esta forma una reducción de las asimetrías estructurales dentro del núcleo celular.

### **3.11 La neurona y el sistema nervioso central.**

El sistema nervioso (SN) está compuesto de células nerviosas conocidas como neuronas y células gliales (oligodendrocitos, astrocitos, glía radial y microglía). La neurona es la unidad funcional del SN, se caracteriza por su habilidad para responder a impulsos nerviosos y por la rápida conducción de éstos a largas distancias. Las funciones de las células gliales aún no se conocen bien, sin embargo son responsables de aislar los procesos neuronales, controlar el ambiente en el que se efectúan, así como de regular la eficacia en la transmisión de la sinapsis. Las neuronas al igual que otras células están formadas por el cuerpo celular, que contiene al núcleo rodeado por citoplasma con diferentes organelos característicos de las células eucariotas, contiene también a las dendritas, que reciben la información de otras células y la transmiten al cuerpo celular y a los axones que conducen los mensajes (Fig. 8). La morfología de las neuronas puede variar con respecto al tamaño del soma, al número, la longitud y ramificación de las dendritas, entre otras.

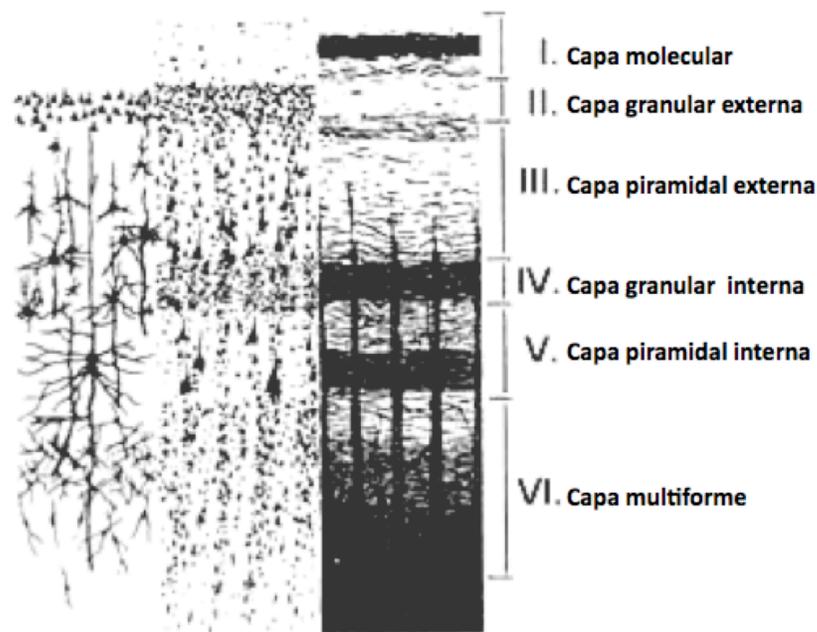


**Figura 8:** La neurona. Es la unidad funcional del sistema nervioso y está formada por el cuerpo neuronal, las dendritas y un solo axón.

En preparaciones microscópicas de neuronas, se aprecia un núcleo característico por su gran tamaño y ligera tinción de Nissl (cromatina extendida, indicando que mucho del genoma está en uso). Se observa también un prominente nucleolo que hace fácil distinguir a las neuronas de las células gliales. En el citoplasma de estas células se observa una gran cantidad de mitocondrias, indicando la elevada actividad metabólica de estas células dependiente de ATP, así como una gran cantidad de ribosomas libres y retículo endoplásmico rugoso, necesario para la síntesis de proteínas (Brodal, 1992; Purves et al., 2001).

En los estados primarios del desarrollo, el embrión tiene la forma de un disco elongado, cubierto en su parte dorsal por epitelio primitivo (ectodermo). El primer signo de desarrollo del SN es la formación de una invaginación del ectodermo (surco neural) que posteriormente se cierra por su parte media, formando el tubo neural. Las paredes de éste se encuentran formadas por células neuroepiteliales primitivas, las cuales se desarrollarán dando origen a neuronas y células gliales. Las células precursoras de las neuronas y las células gliales están localizadas en los centros germinales conocidos como las zonas ventricular y subventricular situados cerca de la superficie de los ventrículos cerebrales laterales. Todas las neuronas que se generan en las zonas germinales se vuelven postmitóticas después de dejar la zona ventricular y migrar hacia su posición final en el cerebro. Las células que salen definitivamente del ciclo celular entran en fase G0 permanente y son consideradas postmitóticas (Boulder et al., 1970; Rakic, 1974). Estas células adquieren su posición laminar (en el caso de las neuronas corticales) mediante la migración radial o tangencial a través de la zona intermedia. Para poder alcanzar su posición final en el SN, las neuronas migran guiadas por un tipo específico de células gliales, conocidas como glía radial, que se encuentra en el tubo neural (Rakic, 2009; Marin y Rubenstein, 2003; Brodal, 1992; Rakic, 1974). Las neuronas en las diferentes regiones del cerebro se producen con un orden temporal y secuencial muy rígido. Debido a que

la proliferación de las células precursoras neuronales se lleva a cabo lejos del lugar donde las neuronas se diferencian y establecen contactos sinápticos, la diferenciación neuronal involucra mucho más que la transformación de células precursoras mitóticas en células nerviosas postmitóticas. (Altman, 1992; Rakic, 2009). En la corteza cerebral las neuronas migran formando capas o láminas cada una de las cuales se caracteriza por una forma, tamaño y densidad de empacamiento distinta. La capa 1 está constituida principalmente de dendritas neuronales, fibras nerviosas que derivan de las dendritas apicales de las neuronas piramidales subyacentes y de los axones de las neuronas piramidales invertidas, las capas 2 y 4 conocidas como capa granular externa e interna respectivamente, que consisten principalmente de pequeñas células redondas, las dendritas de estas neuronas terminan en la capa molecular, mientras que sus axones se dirigen a las capas más profundas y algunos pasan a la materia blanca. Las capas 3 y 5 están formadas por células más largas, los cuerpos celulares de éstas tienden a ser de forma piramidal y por ello reciben el nombre de células piramidales. Las células de la capa 6 son más pequeñas y de forma más alargada que las de la capa 5, los axones de estas células van a formar parte del cuerpo calloso (Fig. 9). Las neuronas piramidales constituyen entre el 70 y 80% de la población neuronal (Brodal, 1992; Purves et al., 2001).



**Figura 9:** Capas de la corteza cerebral: Se muestran las 6 capas que forman la corteza cerebral; I capa molecular, II capa granular externa, III capa piramidal externa, IV capa granular interna, V capa piramidal interna y VI capa multiforme. La columna de la izquierda muestra la apariencia de una sección teñida con Golgi donde se aprecia el cuerpo neuronal y algunas dendritas. En la columna central se muestra una sección teñida con tiónina donde sólo el soma es visible. En la columna de la derecha se muestra la representación de una tinción para mielina donde el principal patrón observado son las fibras de axones mielinizados. Tomada de Brodal, 1992.

En el SNC adulto, el número de células gliales es mucho mayor que el de neuronas. La cantidad de neuronas generadas durante la vida embrionaria es mucho más grande que la presente en el SN adulto, dado que muchas neuronas se eliminan por apoptosis al tiempo que sus axones establecen contacto sináptico, a esto se le conoce como la etapa de muerte celular selectiva, en la cual cerca de la mitad de las neuronas son eliminadas (Brodal, 1992; Purves et al., 2001). Muchas sinapsis son eliminadas en estadios tempranos. Sin embargo, postnatalmente hay un incremento dramático en el número de sinapsis (Brodal, 1992; Purves et al., 2001). En rata, se ha reportado que durante la segunda y tercera semanas postnatales existe el mayor establecimiento de sinapsis, el cual continua por más tiempo pero en menor proporción. El incremento más dramático se lleva a cabo entre los días P10 y P14 (Aghajanian y Bloom, 1967; Parnavelas y Globus, 1976).

Para la mayoría de las neuronas, el proceso de diferenciación comienza después de que la migración ha terminado; entendiendo por diferenciación el desarrollo de características estructurales y funcionales que hacen a una neurona diferente de otra. El siguiente paso en el desarrollo del SN es el crecimiento de los axones y establecimiento de conexiones sinápticas específicas. Durante esta fase el axón debe encontrar su camino y reconocer las células con las cuales va a establecer contacto sináptico, ya que después de que las neuronas llegan a su célula blanco sólo algunas de ellas establecen sinapsis. El análisis microscópico de la corteza cerebral de rata en el día postnatal 4 revela que existe un incremento en el espesor de la zona comparado con etapas más tempranas y las neuronas individuales que aún se encuentran inmaduras tienen un citoplasma más voluminoso; para el día postnatal 6, las dos terceras partes de la corteza superficial siguen estando densamente empacadas, son de menor tamaño y aún son inmaduras (Blue y Parnavelas, 1983a; Cohen-Cory, 2002). La segunda semana postnatal está caracterizada por mayores cambios en el tamaño y madurez de las neuronas como se observa por el gran contenido de organelos en el soma y el desarrollo prominente de los procesos axonales; las sinapsis en general aparecen con mayor madurez en los días posteriores a la segunda semana postnatal, el número de especializaciones postsinápticas vacantes se reduce significativamente a partir del día 14, sin embargo, aún se observan sinapsis inmaduras con pocas especializaciones de membrana definidas y aún pocas vesículas sinápticas (Blue y Parnavelas, 1983a; Cohen-Cory, 2002). Durante la tercera semana postnatal las neuronas de todas las capas corticales alcanzan su madurez, que se pone de manifiesto por el tamaño del soma y la citología general. Sin embargo, no es sino hasta el final de la cuarta semana postnatal que las sinapsis son cualitativamente indistinguibles de las sinapsis en el animal adulto (Blue y Parnavelas, 1983a, 1983b; Cohen-Cory, 2002).

## **4.0 HIPÓTESIS**

En el núcleo de las células que senescen existe un orden superior de organización del DNA que es muy estable. El estado senescente y el estado postmitótico son irreversibles y estables a largo plazo, por lo tanto, la organización estructural del DNA en células postmitóticas puede ser similar a la presente en células senescentes.

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el orden superior de organización del DNA al interior del núcleo en neuronas de corteza cerebral durante el desarrollo postnatal y el envejecimiento natural de la rata.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

Caracterizar en forma comparativa la estabilidad global de la MN y el orden superior de organización del DNA en neuronas de corteza cerebral de rata durante el desarrollo postnatal y el envejecimiento natural.

Realizar el mapeo posicional con respecto a la MN de secuencias génicas específicas ubicadas en cromosomas distintos correspondientes a diferentes territorios cromosómicos, en neuronas de corteza cerebral de rata durante el desarrollo postnatal y el envejecimiento natural.

Determinar si existen diferencias en el perfil proteico de la MN entre los diferentes estadios del desarrollo postnatal estudiados y compararlo con los datos reportados en hepatocitos durante los mismos estadios del desarrollo postnatal.

Comparar los resultados obtenidos en neuronas de diferentes etapas postnatales con lo reportado por Maya-Mendoza et al., (2005) en hepatocitos de diferentes etapas postnatales.

## **5.0 MATERIALES Y MÉTODO.**

### **5.1 Animales.**

Para el presente estudio se utilizaron ratas Wistar recién nacidas (P0), de 7 días postnatales (P7), adultas de 200-250g (P80) y viejas (P540). Los animales fueron manejados de acuerdo con la norma oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

### **5.2 Aislamiento de núcleos neuronales.**

Los núcleos de neuronas de corteza cerebral de ratas P0, P7, P80 y P540 se aislaron utilizando el método de Thompson (1973) con ligeras modificaciones. El tejido fresco se homogenizó manualmente con 1ml de sacarosa 2.0 M (1mM MgCl<sub>2</sub> y 0.25mM PMSF) con  $\pm$  20 golpes del vástago. El homogenado se transfirió a un tubo de 14 ml conteniendo 8 ml de sacarosa 2.0 M formando un gradiente, el cual se centrifugó a 49,500 g durante 60 min a 4°C en una centrífuga KR 25i con un rotor AKL 100.21. Se obtuvo un precipitado, el cual para el estadio P0 se lavó con 10ml de sacarosa 0.32M (1mM MgCl<sub>2</sub> + 0.25mM PMSF) y se centrifugó por 5 min a 1,500g. El precipitado resultante se resuspendió en 1ml de sacarosa 0.32M y se utilizó directamente para la obtención de nucleoides. El precipitado de P7, P80 y P540 se resuspendió en 4 ml de sacarosa 2.4 M (1mM MgCl<sub>2</sub> y 0.25mM PMSF), y se formó un gradiente colocando 1ml de sacarosa 1.8 M (1mM MgCl<sub>2</sub> y 0.25mM PMSF), centrifugando nuevamente a 49,500 g por 60 min a 4°C en una centrífuga KR 25i con un rotor AKL 100.21. Como resultado de la segunda centrifugación se obtuvo una población de núcleos en la interfase de sacarosa entre 2.4M y 1.8M (N1) y otra población en el precipitado (N2). Las poblaciones obtenidas se lavaron con 10 ml de sacarosa 0.32M de la misma manera como se realizó para la población de núcleos totales en P0. En las preparaciones de nucleoides N1 y N2 en P7, P80 y P540 se observó un enriquecimiento de nucleoides neuronales mayor al 90% (ver sección 6.1), por lo que se decidió omitir la separación de poblaciones nucleares en N1 y N2, de tal forma que todos los experimentos de mapeo posicional en P0, P7, P80 y P540 se realizaron a partir de la población total de núcleos obtenida de la primer centrifugación.

### **5.3 Aislamiento de nucleoides neuronales.**

De los núcleos aislados de P0, P7, P80 y P540 resuspendidos en sacarosa 0.32M se tomó una alícuota de 50µl conteniendo  $5 \times 10^5$  núcleos y se mezcló con 150µl de solución de lisis (2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, 0.6% Triton-X 100 pH 8.0), después de 10 min a 4 °C, la mezcla se lavó con 14ml de PBS-A a 4 °C por 4 min a 1,500 g. Se forma una nube de nucleoides en el fondo del tubo que se recuperó en un volumen de 200-300µl.

### **5.4 Inmunohistoquímica**

Para diferenciar los núcleos y nucleoides neuronales de los gliales tanto de P0 como de las poblaciones N1 y N2 de P7, P80 y P540, se utilizó el anticuerpo monoclonal mouse anti-NeuN (Chemicon), que reconoce a la proteína NeuN, específica de núcleos neuronales. Con 100µl de núcleos y nucleoides de cada población nuclear en cada estadio del desarrollo postnatal se realizó una dilución 1:2 en solución TM2 (10mM Tris pH 7.2, 2mM MgCl<sub>2</sub> y 0.5mM PMSF), éstos núcleos se montaron en portaobjetos (previamente cubiertos por poli-L-lisina) por 90 min a temperatura ambiente, se fijaron con acetona fría por 10 min y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS-A. Los sitios de unión no específicos se bloquearon en PBS-A-leche al 10% toda la noche a 4°C, posteriormente las laminillas se incubaron con el anticuerpo mouse anti-NeuN (1:500) en PBS-A conteniendo 0.01% Tween 20 a 4°C por 2 horas. Después de 3 lavados con PBS-A por 5 min, se incubaron con anti-mouse-Rhodamine (ICN, Pharmaceuticals) en PBS-A a 4°C por 30 min. Después de 3 lavados en PBS-A por 5 min, las muestras se montaron con DABCO y se examinaron bajo microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus BX60. Los controles negativos se realizaron por omisión del anticuerpo primario. El porcentaje de núcleos neuronales se estimó mediante el conteo de los núcleos y nucleoides marcados positivamente con anti-NeuN, contra los no marcados (glía).

### **5.5 Aislamiento de hepatocitos.**

Los hepatocitos primarios fueron obtenidos a partir de hígado de ratas P540 usando el protocolo previamente descrito por Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo (2003). El hígado se perfundió con PBS sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> a 37 °C por 5 min a 15ml/min y posteriormente con una solución de

colagenasa IV, Sigma (0.025% colagenasa con 0.075% de  $\text{CaCl}_2$  en Hepes, ( $\text{NaCl}$  160.8mM,  $\text{KCl}$  3.15mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  0.7mM, Hepes 33mM pH 7.6) por 8 min. Los hepatocitos aislados fueron contados en un hemocitómetro y usados inmediatamente para la preparación de nucleoides.

### **5.6 Aislamiento de nucleoides de hepatocitos.**

Los nucleoides fueron preparados según lo descrito previamente (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003). Alícuotas de 50 $\mu\text{l}$  de hepatocitos recién aislados que contenían  $3 \times 10^5$  células se mezclaron con 150 $\mu\text{l}$  de solución de lisis (2.6 M  $\text{NaCl}$ , 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, 0.6% Triton-X 100 pH 8.0). Después de 20 min a 4 °C, la mezcla se lavó con 14ml de PBS-A a 4 °C por 4 min a 1,500 g. Se forma una nube de nucleoides en el fondo del tubo que se recuperó en un volumen de 200-300 $\mu\text{l}$ .

### **5.7 Análisis de la integridad de los nucleoides.**

Se tomó una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  de los nucleoides tanto de neuronas como de hepatocitos previo al lavado con PBS-A y se tiñeron con 10 $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio (EtBr) a una concentración de 160 $\mu\text{g/ml}$  (concentración final de 80 $\mu\text{g/ml}$ ). Inmediatamente después de la adición del EtBr se le colocó un cubreobjetos y se observó la integridad de los nucleoides y los bucles de DNA por microscopía de fluorescencia, capturando imágenes y secuencias en tiempo real (Aranda-Anzaldo y Dent, 1997), utilizando el programa *Image Pro Plus digital image analysis system* version 4.5 (Media Cybernetics). Las secuencias de imágenes fueron tomadas utilizando un milisegundo entre cada micrografía.

### **5.8 Medición de núcleos, MN y halos de DNA.**

Se tomaron micrografías en contraste de fases de los núcleos y las matrices nucleares de neuronas P0, P7, P80 y P540 y de hepatocitos P540, así como de sus nucleoides correspondientes teñidos con 80 $\mu\text{g/ml}$  de EtBr utilizando una cámara *Evolution MP colour camera* de alta calidad con un objetivo de 40X. Dichas imágenes se utilizaron para realizar las mediciones correspondientes del

diámetro de los núcleos y de las matrices nucleares y el radio de los halos de DNA mediante el programa *Image Pro Plus Digital Image Analysis System* version 4.5 (Media Cybernetics). Los valores obtenidos de las mediciones específicas fueron comparadas mediante una prueba *T-student* para muestras independientes utilizando las siguientes páginas web: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm?Format=C>, <http://www.dimensionresearch.com/resources/calculators/ttest.html>, con un intervalo de confianza del 99%.

### **5.9 Digestión de los nucleoides con DNasa I.**

Los nucleoides recién lavados de hepatocitos y neuronas ( $2.4 \times 10^6$  nucleoides en 1.2ml PBS-A) se mezclaron con 5.1ml de buffer de digestión para DNasa I (10mM  $MgCl_2$ , 0.2mM 2-Mercaptoetanol, 50mM Tris, pH 7.2) y se digirieron con 0.5 U/ml ó 0.92 U/ml de DNasa I (Sigma) (0.15M NaCl, 50% Glicerol, 2,300 U/ml DNasa I) a 30°C por 60 min. Para cada punto de digestión, se tomó una alícuota de 1ml conteniendo  $3.8 \times 10^5$  nucleoides y la digestión se detuvo con 200µl de buffer de paro (0.2 M EDTA, 10 mM Tris a pH 7.5). Después de la digestión las muestras se centrifugaron por 10 min a 9,000g a 4°C. El precipitado se lavó una vez con 1ml de PBS-A y 2 veces con 1ml de agua bidestilada (dd- $H_2O$ ) y se centrifugaron nuevamente por 10 min a 9,000g a 4°C. El precipitado final se resuspendió en 100µl de dd- $H_2O$  para ser usado directamente como templado para la PCR. La cantidad de DNA presente en cada muestra se determinó por espectrofotometría.

### **5.10 Amplificación de secuencias específicas de DNA anclado a la matriz nuclear mediante PCR.**

Muestras de nucleoides parcialmente digeridos con DNasa I se usaron como templado para ensayos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se utilizaron 60ng de DNA asociado a la MN como templado para cada reacción y 1.25 U de GoTaq Flexi DNA polimerasa (Promega). Todos los experimentos se realizaron utilizando un mismo programa de amplificación que permite que todas las secuencias estudiadas se amplifiquen con eficiencia semejante, en un termociclador *Perkin Elmer GeneAmp PCR System*. Los pares de “primers” (por su nombre en inglés) para cada una de las secuencias estudiadas se diseñaron utilizando el programa *Vector*

*NTI advance™* (Tabla 1). El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, desnaturalización a 94 °C por 45 s, alineamiento a 56 °C por 30 s, y extensión a 72 °C por 1 min por 35 ciclos, con una extensión final de 72 °C por 10 min.

Amplicón	Primer Sentido	Primer Antisentido	Longitud del amplicón	Número de acceso	Cromosoma
NFM	5'TCGGCGATCTCTTCTTTAGCG3'	5'CGGAGCAATCACGAAGAGG A3'	254 pb	NM_017029	15 p12
NFL	5'TCCCCCTTGAGTCCTCTTGA3'	5'ACTTGTCCCTTACGGGAGA 3'	249 pb	X53981	14
MBP	5'CTTCCGAAGGCCTGATGTGAT3'	5'TAAAGAAGCGCCCGATGGA3'	158 pb	K00512	18 q11-q13
GFAP	5'TCCAGCCCGTCCCTCAATAA3'	5'TCCCGAAGTTCTGCCTGGTA A3'	418 pb	Z48978	10 q32.1
MPZ5'	5'CTTGCCCTACCCCAGCTAT3'	5'TCTCCTTGGCTGGCTCTCAAT 3'	184 pb	NM_017027	13 q24-q25
MPZ3'	5'CCCTGGCCATTGTGGTTTACA3'	5'TGGATGCGCTCCTTGAAGGT 3'	291 pb	NM_017027	13 q24-q25
ACT	5'AACACCCAGCCATGTACG3'	5'ATGTCACGCACGATTCC3'	254 pb	M10277	12 q11
ALB	5'GGGATTTAGTTAAACAATT3'	5'AAAGGTTACCCACTTCATTG 3'	206 pb	M16825	14 p22
AFP	5'ACCCATGCATCTGTGACATA3'	5'AGTAAAATGCATGTTGCCTG 3'	252 pb	J02816	14 p21
IP3R3	5'GGTGAGCGGCGAGGGCGAGG3'	5'GCAGTTCTGCACGTCCACGA 3'	480 pb	L06096	20
C-MYC	5'TATAATCCGGGGTCTGCGC3'	5'CCCTCTGTCTCTCGCTGGAA3'	227 pb	Y00396	7 q33
COL1A1	5'CATACCTGGGCCACACCAT3'	5'CTTGCACTTCTTCTGGGA3'	261 pb	J04464	11

**Tabla 1.** Oligonucleótidos sintéticos “primers” de DNA genómico usados para el mapeo posicional con respecto a la MN de secuencias blanco específicas. (NFM) neurofilamento medio; (NFL) neurofilamento ligero; (MBP) proteína básica de mielina; (GFAP) proteína ácida glial fibrilar; (MPZ5') proteína cero de mielina región 5'; (MPZ3') proteína cero de mielina región 3'; (ACT)  $\beta$ -actina; (ALB) albúmina; (AFP)  $\alpha$ -fetoproteína, (IP3R3) receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3, (C-MYC) c-myc de rata, (COL1A1) colágena tipo 1 alfa 1.

### 5.11 Electroforesis del DNA.

La electroforesis del DNA se realizó mediante geles de agarosa al 2% teñidos con 0.5 $\mu$ g/ml de EtBr. Se corrieron 10 $\mu$ l de cada muestra, en buffer TBE (45mM Tris-Base, 45mM ácido bórico 1mM EDTA pH 8.0) a 100 volts por aproximadamente 60 min. Se utilizó una escalera de 50 pb (Fermentas) como referencia de peso molecular. Para visualizar los geles se utilizó una fuente de luz UV ( $\lambda$ = 302nm). La visualización de los productos amplificados se realizó utilizando el

programa Kodak 1D *Image Analysis Software 3.5 system* utilizando los parámetros estándar del programa. Los amplicones específicos fueron corroborados por análisis de restricción

### **5.12 Extracción de RNA.**

El RNA de los tejidos analizados (corteza cerebral, hígado y nervio ciático) se extrajo utilizando el reactivo TRIZOL (GIBCO-BRL). Se colocaron de 50-100 ng de tejido fresco de ratas P0, P7, P80 y P540 en 1ml de TRIZOL, el cual se homogenizó perfectamente, se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se incubó por 5 min de 15-30°C. Posteriormente se adicionaron 0.2ml de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se agitó vigorosamente, se incubó de 15-30°C por 3 min y se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio, se agregaron 0.5ml de alcohol isopropílico, se incubó de 15-30°C por 10 min, y se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. El precipitado de RNA se lavó con 1.0 ml de etanol al 75% y se centrifugó durante 5 min a 7,500 g a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado de RNA se dejó secar de 5-10 min a temperatura ambiente. El precipitado se disolvió en 0.1ml de dd-H<sub>2</sub>O libre de RNasas y se incubó por 10 min a 55-60°C. El RNA de cada muestra se determinó por espectrofotometría y se guardó a -70°C para su uso posterior.

### **5.13 Amplificación de RNA específico por RT-PCR.**

El RNA obtenido se utilizó para realizar ensayos de RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa). Los primers para los ensayos de RT-PCR se muestran en la Tabla 2, los cuales se diseñaron utilizando el programa *Vector NTI advance™*. Para realizar la conversión de RNA a DNA complementario (cDNA) se utilizó 1µl de random primers y 100ng de RNA de cada una de las muestras en un volumen final de 12µl y se incubaron a 94°C por 5min. Posteriormente se le adicionó la mezcla de reacción, la cual contiene 4µl de buffer de RT (250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>), 2µl de ditiotritiol 0.1M (DTT), 0.9µl de transcriptasa reversa (40U/µl SuperScript™ II de GIBCO-BRL) y 0.7 µl de dNTPs 10mM, en un volumen final de 20µl. El programa de amplificación utilizado para todos los ensayos de RT-PCR fue: alineamiento a 25°C por 10 min, extensión a 42°C por 60 min, y una extensión final a 70°C durante 15 min.

Amplificación	Primer Sentido	Primer Antisentido	Longitud del amplificación	Número de acceso
NFM	5'TCGGCGATCTTCTTTAGCG3'	5'CGGAGCAATCACGAAGAGGA3'	254 pb	NM_017029
NFL	5'GAAGAGTGGTTCAAGAGCCGC3'	5'TCGTGCTTCGCAGCTCATT3'	256 pb	NM_031783
MBP	5'CTTCCGAAGGCCTGATGTGAT3'	5'TAAAGAAGCGCCCGATGGA3'	158 pb	K00512
GFAP	5'TGTCTCGAATGACGCCTCCA3'	5'TGCCTGGTAAACGTCAGCCA3'	239 pb	NM_017009
MPZ	5'CCCTGGCCATGTGGTTACA3'	5'TGGATGCGCTCCTGAAGGT3'	291 pb	NM_017027
ACT	5'CGTAAAGACCTCTATGCCAA3'	5'AGCCATGCCAAATGTGTCAT3'	349 pb	V01217; J00691
ALB	5'ATACACCCAGAAAGCACCTC3'	5'CACGAATTGTGCGAATGTCAC3'	436 pb	NM_134326
AFP	5'CAGTGAGGAGAAACGGTCCG3'	5'ATGGTCTGTAGGGCTCGGCC3'	252 pb	NM_012493

**Tabla 2.** Primers de RT-PCR usados para analizar la expresión de genes específicos. (NFM) neurofilamento medio; (NFL) neurofilamento ligero; (MBP) proteína básica de mielina; (GFAP) proteína ácida glial fibrilar; (MPZ) proteína cero de mielina; (ACT)  $\beta$ -actina; (ALB) albúmina y (AFP)  $\alpha$ -fetoproteína.

Una vez obtenido el cDNA se incubó durante 20 min con 0.8 $\mu$ l de ribonucleasa H (RNasa H 2U/ $\mu$ l Invitrogen) a 37°C para degradar las cadenas híbridas. Este cDNA se usó posteriormente para el ensayo de PCR estándar con el programa de amplificación y las especificaciones utilizadas para el mapeo de secuencias génicas (ver sección 5.10). Las secuencias amplificadas se corrieron en geles de agarosa al 2% de la misma manera como se llevó a cabo con los productos amplificados en el protocolo del mapeo posicional (Sección 5.11).

#### 5.14 Extracción de Proteínas.

Para la extracción de las proteínas de MN los núcleos de corteza cerebral de cada uno de los estadios estudiados se sometieron al proceso de extracción de nucleoides y digestión exhaustiva con 30U/ml de DNasa I en 10.2 ml de buffer de digestión para DNasa I (10mM MgCl<sub>2</sub>/MgSO<sub>4</sub>, 0.2mM Mercaptoetanol, 50mM Tris base, pH 7.2) durante 3 hr a 37°C. La acción de la DNasa I se detuvo agregando 200 $\mu$ l de buffer de paro (0.2M de EDTA y 10mM de Tris, pH 7.5) por cada 1000 $\mu$ l de mezcla de digestión. Las alícuotas se centrifugaron a 9,000 g por 10 min a 4 °C. El precipitado se lavó una vez con PBS-A, se juntaron los precipitados de 3 tubos y se lavaron con dd-H<sub>2</sub>O. Posteriormente, se juntaron todos los precipitados obtenidos en un solo tubo y se lavaron nuevamente con dd-H<sub>2</sub>O siguiendo el mismo protocolo de centrifugación después de cada lavado

(9,000 g por 10 min a 4 °C). El precipitado final se homogenizó en 100µl de buffer de extracción de proteínas, se transfirió a un tubo limpio y se llevó a ebullición en baño María durante 5 min. Las proteínas de MN así extraídas se cuantificaron en el espectrofotómetro a 750nm utilizando el kit *DC protein assay* (BIO-RAD) y se guardaron a -70°C para su uso posterior.

### **5.15 Perfiles Proteicos.**

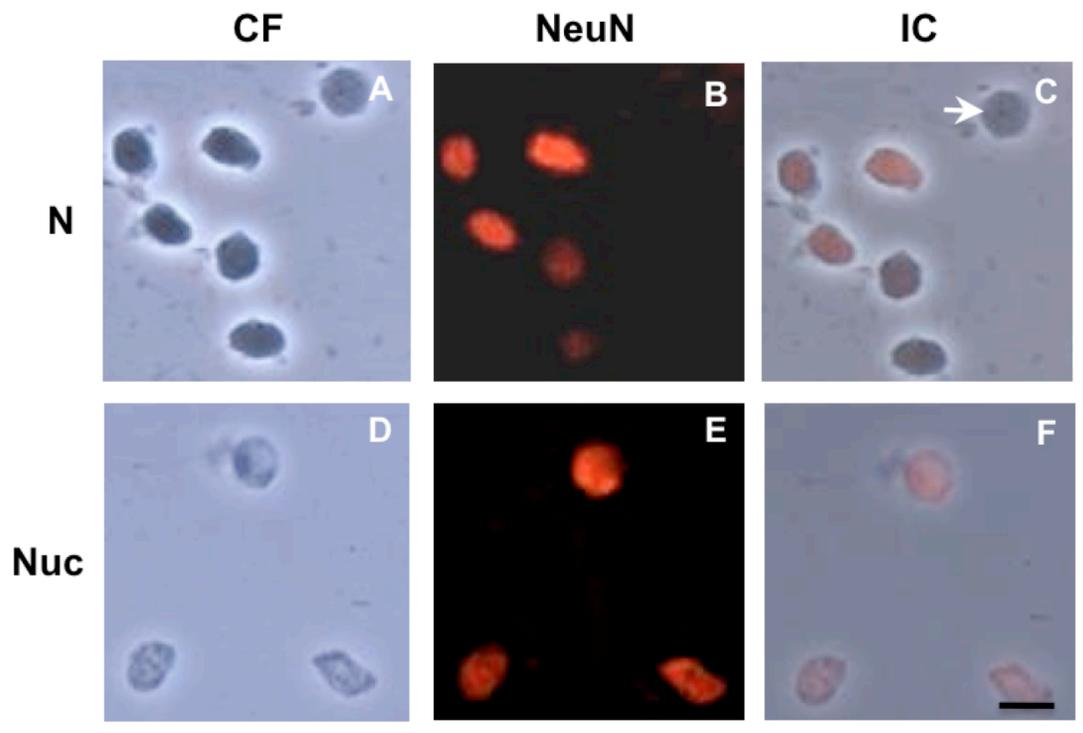
Los perfiles proteicos se obtuvieron mediante el protocolo estándar de SDS-PAGE para las proteínas de MN durante las diferentes etapas de desarrollo postnatal. Para resolver las proteínas se utilizaron minigeles (C.B.S.) de poliacrilamida al 10%. Se cargaron 15µg de proteína por carril y se corrieron a 40mA. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie (de acuerdo al protocolo estándar) y las imágenes se procesaron utilizando el sistema *Kodak 1D Image Analysis Software 3.5*.

## **6.0 RESULTADOS.**

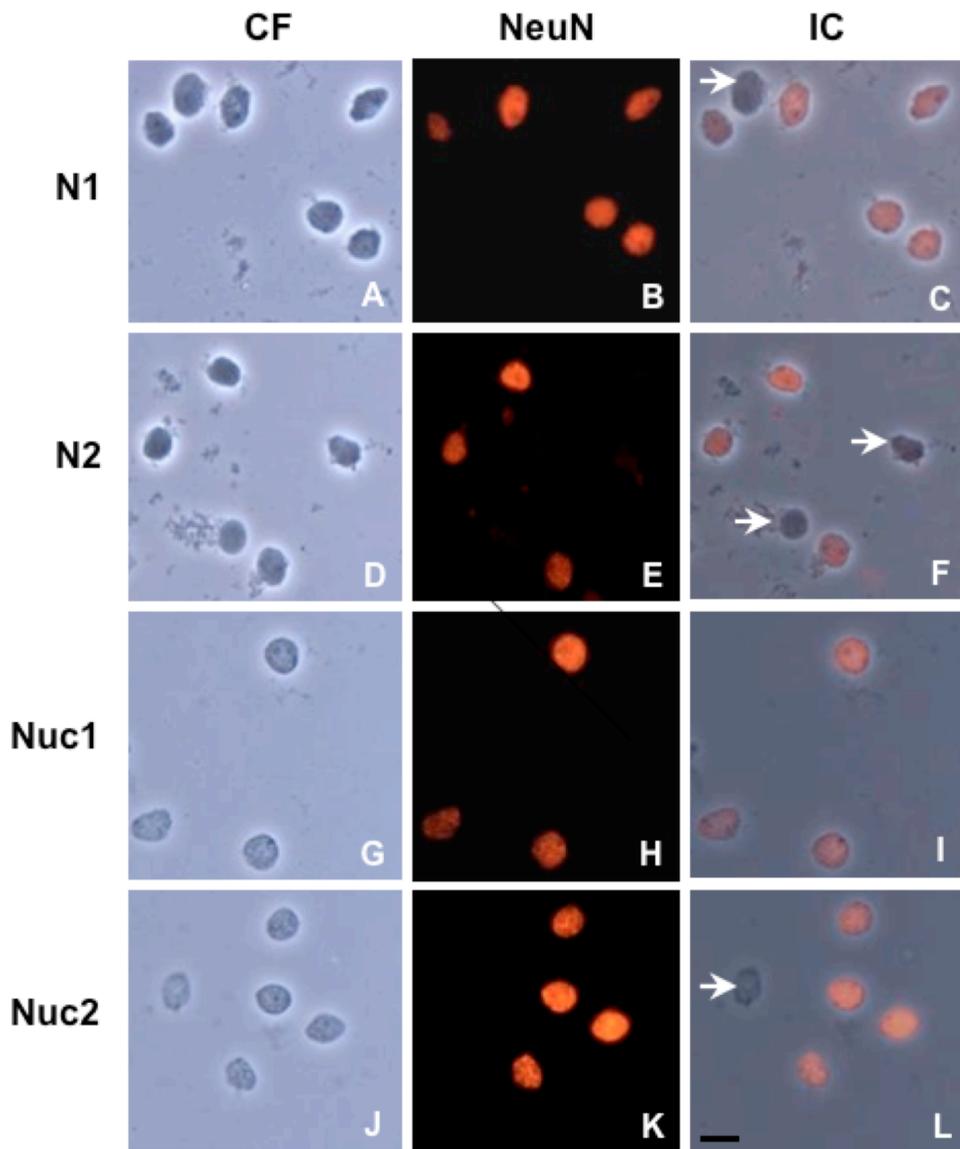
El presente trabajo se realizó con el propósito de estudiar el orden superior de organización del DNA (OSODNA) en células que carecen de capacidad proliferante (células postmitóticas) y comparar los resultados con lo reportado anteriormente para el OSODNA durante el desarrollo postnatal y el envejecimiento natural de los hepatocitos, en los cuales se ha reportado que cambios en el OSODNA al interior del núcleo están relacionados con la tendencia de éstas células hacia la diferenciación terminal y la pérdida del potencial proliferante (Maya-Mendoza et al., 2005). Por ello se utilizaron núcleos de neuronas de corteza cerebral de rata en distintos estadios del desarrollo postnatal, debido a que éstas células son postmitóticas desde estadios embrionarios tempranos, cuando migran de los ventrículos (zona proliferante) a su posición final en el cerebro (zona postmitótica) (Parnavelas, 2002; Rakic, 2009).

### **6.1 Aislamiento y caracterización de núcleos y nucleoides neuronales.**

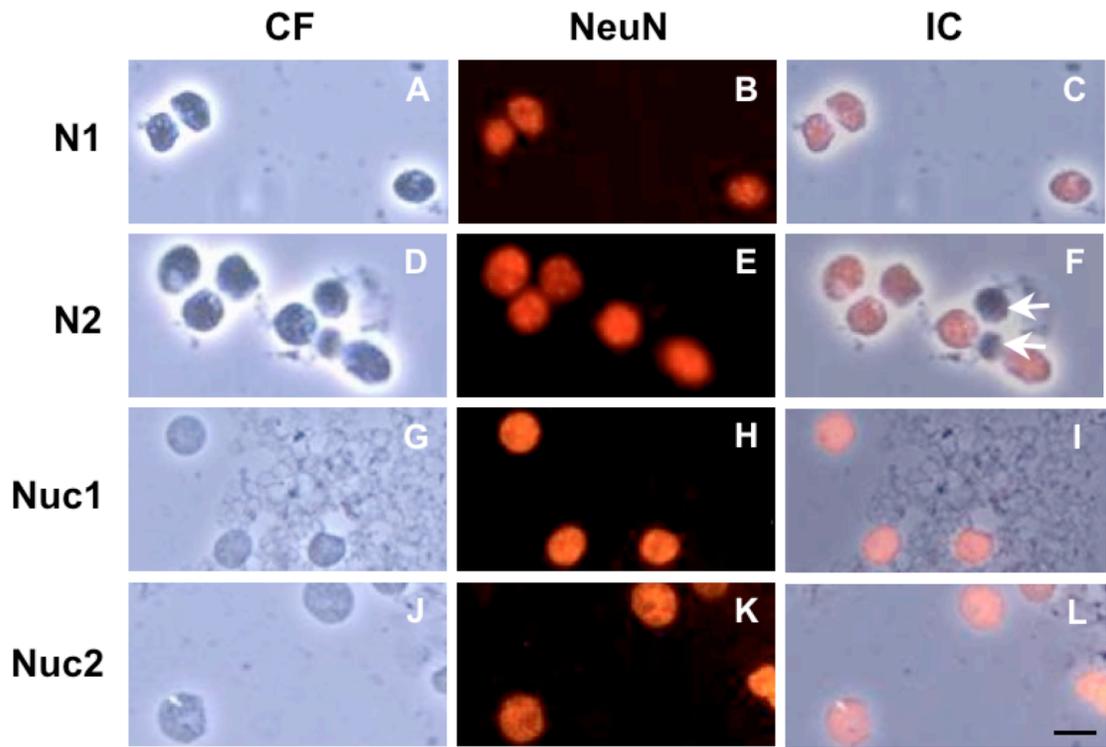
Dado que el SNC se encuentra constituido tanto por neuronas como por células gliales fue necesario determinar el porcentaje de contaminación cruzada de los núcleos neuronales con los núcleos gliales obtenidos en las preparaciones. Para ello se empleó el anticuerpo contra la proteína NeuN que se expresa específicamente en los núcleos neuronales (Mullen et al., 1992). Se caracterizaron los núcleos y sus correspondientes nucleoides obtenidos de corteza cerebral de rata en distintas edades postnatales (P0, P7, P80 y P540). Se llevaron a cabo 3 ensayos inmunohistoquímicos para los cuatro estadios postnatales estudiados y se contaron los núcleos y nucleoides marcados con el anticuerpo anti-NeuN (neuronas) de un total de 500 núcleos y 300 nucleoides de cada estadio postnatal. Dado que el método de Thompson separa dos poblaciones nucleares denominadas N1 y N2, en donde N1 está compuesta, con base en criterios morfológicos, por núcleos neuronales y N2 por núcleos gliales, se llevó a cabo la separación de las poblaciones N1 y N2 en los estadios P7, P80 y P540. En el estadio P0 las células gliales representan un porcentaje muy pequeño del total de células (Brodal, 1992; Rakic, 1974) y por lo tanto no se realizó la separación de poblaciones N1 y N2 en este estadio. En las Figs. 10-13 se muestra el marcaje con anti-NeuN para cada uno de los diferentes estadios del desarrollo postnatal.



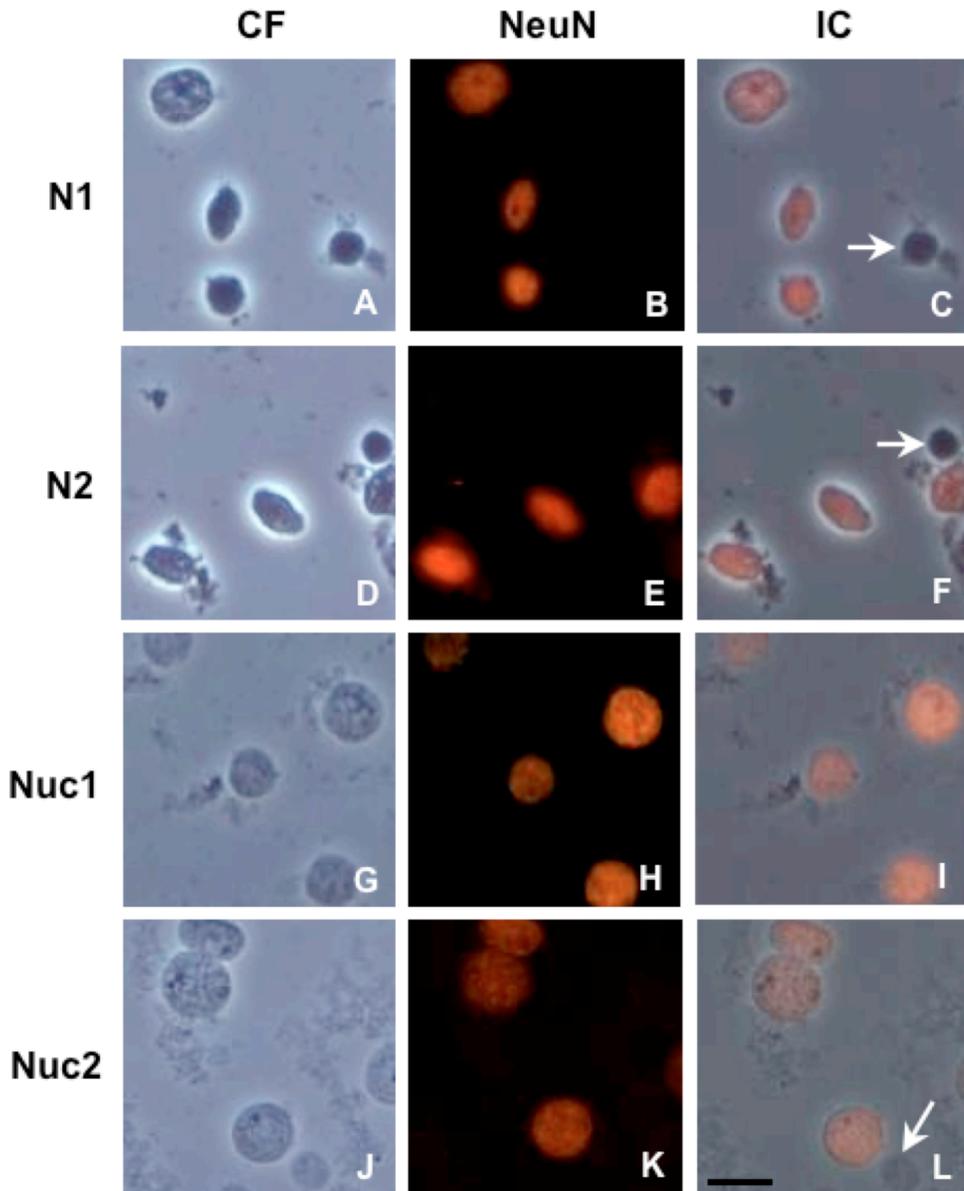
**Figura 10:** Núcleos (N) y nucleoides (Nuc) del estadio P0 teñidos con anti-NeuN. Núcleos de corteza cerebral de P0 (A, B, C) y nucleoides de corteza cerebral de P0 (D, E, F). (CF) Contraste de fases (A, D), (NeuN) marcados con anti-NeuN (B, E), (IC) imagen compuesta (C, F). Las flechas indican aquellos núcleos que no se tiñen con el anticuerpo (núcleos gliales). Barra=10 $\mu$ m.



**Figura 11:** Núcleos (N) y nucleoides (Nuc) del estadio P7 teñidos con anti-NeuN. Población de núcleos N1 (A, B, C), y de núcleos N2 (D, E, F). Población de nucleoides N1 (Nuc1) (G, H, I) y población de nucleoides N2 (Nuc2) (J, K, L). (CF) Contraste de fases (A, D, G, J), (NeuN) marcados con anti-NeuN (B, E, H, K); (IC) imagen compuesta (C, F, I, L). Las flechas indican aquellos núcleos y nucleoides respectivamente que no se tiñen con anti-NeuN (glía). Barra=10 $\mu$ m.



**Figura 12:** Núcleos (N) y nucleoides (Nuc) del estadio P80 teñidos con anti-NeuN. Población de núcleos N1 (A, B, C) y de núcleos N2 (D, E, F). Población de nucleoides N1 (Nuc1) (G, H, I) y población de nucleoides N2 (Nuc2) (J, K, L). (CF) Contraste de fases (A, D, G, J), (NeuN) marcados con anti-NeuN (B, E, H, K); (IC) imagen compuesta (C, F, I, L). Las flechas indican aquellos núcleos y nucleoides respectivamente que no se tiñen con anti-NeuN (glía). Barra=10µm.



**Figura 13:** Núcleos (N) y nucleoides (Nuc) del estadio P540 teñidos con anti-NeuN. Población de núcleos N1 (A, B, C) y de núcleos N2 (D, E, F). Población de nucleoides N1 (Nuc1) (G, H, I) y población de nucleoides N2 (Nuc2) (J, K, L). (CF) Contraste de fases (A, D, G, J), (NeuN) marcados con anti-NeuN (B, E, H, K); (IC) imagen compuesta (C, F, I, L). Las flechas indican aquellos núcleos y nucleoides respectivamente que no se tiñen con anti-NeuN (glía). Barra=10 $\mu$ m.

La Tabla 3 muestra que ambas poblaciones nucleares (N1 y N2) están enriquecidas en núcleos neuronales y la contaminación glial es menor del 27% en todos los estadios del desarrollo postnatal estudiados.

Edad postnatal	Núcleos				Nucleoides			
	Neuronas		Glía		Neuronas		Glía	
	N1	N2	N1	N2	N1	N2	N1	N2
P0	83.7± 4.5	---	16.3± 4.5	---	90.6± 1.5	---	9.4± 1.5	---
P7	81.9± 2.1	73± 9.4	18.1± 2.1	27.0± 9.4	93.7± 3.2	91.9± 1.2	6.3± 3.2	8.1 ± 1.2
P80	80.0± 1.5	74.3± 4.0	20.0± 1.5	25.1± 4.0	93.7± 2.4	89.2± 5.2	6.3± 2.4	10.8± 5.1
P540	78.3± 13.0	81.5± 10.7	21.7± 13.0	18.5± 10.7	95.3± 1.9	89.4± 2.7	4.7± 1.9	10.6± 2.7

**Tabla 3:** Porcentaje de núcleos y nucleoides neuronales y gliales determinado por marcaje con anti-NeuN en las muestras obtenidas a partir de corteza cerebral de ratas P0, P7, P80 y P540. Los valores se obtuvieron de experimentos realizados por triplicado para cada estadio del desarrollo. Dado que los nucleoides neuronales son la materia prima utilizada para la realización de todos los experimentos posteriores, también se midió la posible contaminación glial en éstos. Los resultados muestran que hay un mayor enriquecimiento de la población neuronal en los nucleoides correspondientes a los cuatro estadios del desarrollo postnatal independientemente de si se trata de la población N1 ó N2 (Tabla 3), ya que la contaminación glial oscila entre el 5-10%. Debido a que la población neuronal resultante es mayor o igual al 90%, se decidió omitir la separación de las poblaciones nucleares en experimentos posteriores y trabajar directamente con la población de núcleos totales que se obtiene de la primera centrifugación (ver sección 5.2), ya que de esta forma se incrementa la cantidad de núcleos obtenidos en cada experimento. Estos datos sugieren que las condiciones de lisis con altas concentraciones de sal y detergentes no iónicos empleadas para la extracción de los nucleoides son muy severas y que la mayoría de los núcleos gliales no resisten este proceso de extracción. Por lo tanto, los nucleoides gliales no representan una fuente importante de contaminación en nuestras preparaciones neuronales.

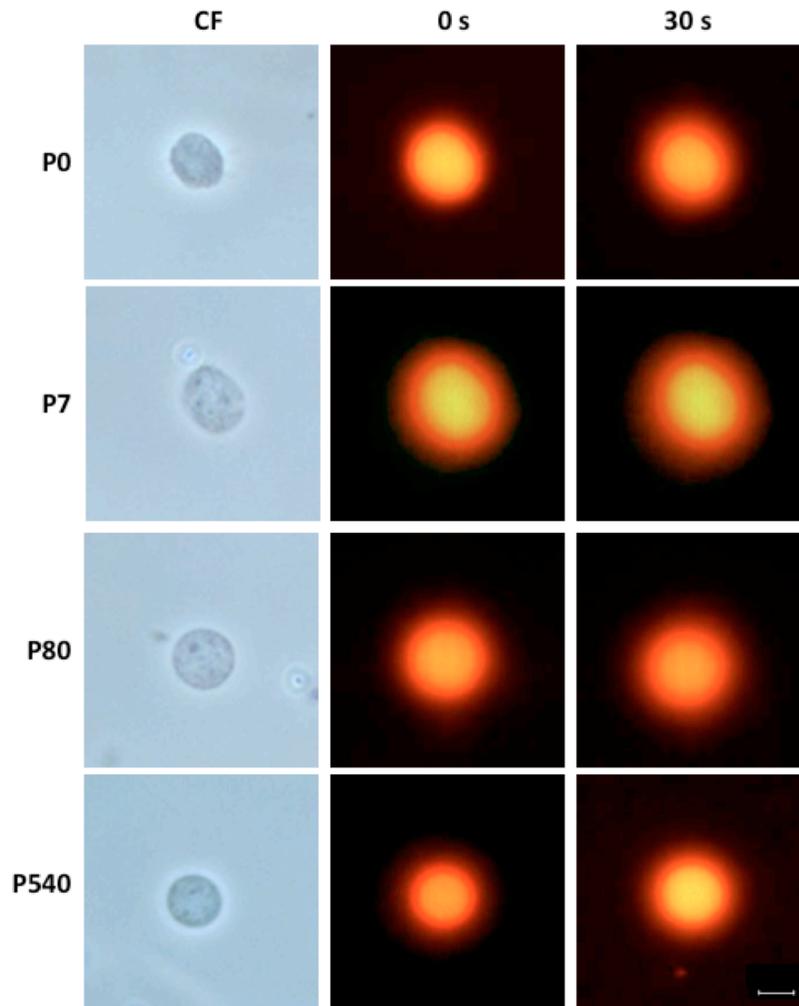
## 6.2 Integridad de los nucleoides.

Una vez que se tenían aislados y bien identificados los núcleos y nucleoides neuronales de las diferentes edades postnatales se procedió a evaluar la integridad de éstos. Los nucleoides constituidos por los bucles de DNA más la MN, se generan por la lisis celular con altas

concentraciones de sal y detergentes no iónicos. Bajo estas condiciones de lisis el DNA de los nucleoides permanece esencialmente intacto, pero carece de la estructura nucleosomal debido a la disociación de histonas y otras proteínas de la cromatina; sin embargo, los bucles de DNA permanecen topológicamente constreñidos e hiperenrollados (Cook et al., 1976; Roti-Roti et al., 1993).

Los nucleoides también se conocen como halos de DNA, ya que la exposición de éstos a agentes intercalantes como el bromuro de etidio (EtBr) genera el desenrollamiento de los bucles de DNA que forman un halo fluorescente alrededor de la MN. Este proceso induce fuerzas extremas que actúan sobre la MN conforme el DNA rota y se expande durante el desenrollamiento. Una forma de evaluar la integridad y el hiperenrollamiento de los bucles de DNA es exponiendo los nucleoides a diferentes concentraciones de EtBr. Con concentraciones bajas de EtBr se logra el desenrollamiento de los bucles; a concentraciones mayores, se logra un enrollamiento del halo de DNA pero ahora en sentido contrario al enrollamiento inicial, por lo que se logra un enrollamiento en sentido positivo. Este comportamiento se logra si el DNA de los nucleoides no tiene rupturas (Aranda-Anzaldo y Dent 1997). Sin embargo, en preparaciones estándar de nucleoides los bucles de DNA presentan rupturas, por lo cual en presencia de altas concentraciones de EtBr se genera un halo que alcanza su máxima expansión en pocos segundos de tal manera que la forma del halo y sus dimensiones reflejan la estabilidad de los anclajes del DNA a la MN (Aranda-Anzaldo y Dent, 1997).

Utilizando esta estrategia experimental y con el fin de evaluar la estabilidad de los anclajes DNA-MN en las neuronas en distintos estadios del desarrollo postnatal, se tomaron secuencias de video en tiempo real durante 30 segundos de los nucleoides de neuronas P0, P7, P80 y P540 tratados con 80 µg/ml de EtBr. Los resultados muestran una lenta expansión del halo de DNA el cual es homogéneo en tamaño y muy estable en todos los casos (Fig. 14). Esto indica que las interacciones entre los bucles de DNA y la MN son muy estables desde estadios postnatales tempranos, dado que la MN es capaz de soportar las fuerzas expansivas que resultan de la relajación y desenrollamiento de los bucles de DNA. Esto contrasta con lo observado en hepatocitos de ratas P0 y P7, en donde las fuerzas liberadas por el desenrollamiento inducido por el EtBr produce la desintegración o severa fractura de la MN; mientras que en nucleoides de hepatocitos de ratas adultas jóvenes (P80) y senescentes (P540) la relajación de los bucles producida por el EtBr genera halos de DNA bien definidos que rodean a la MN y ésta permanece intacta (Maya-Mendoza et al., 2005).

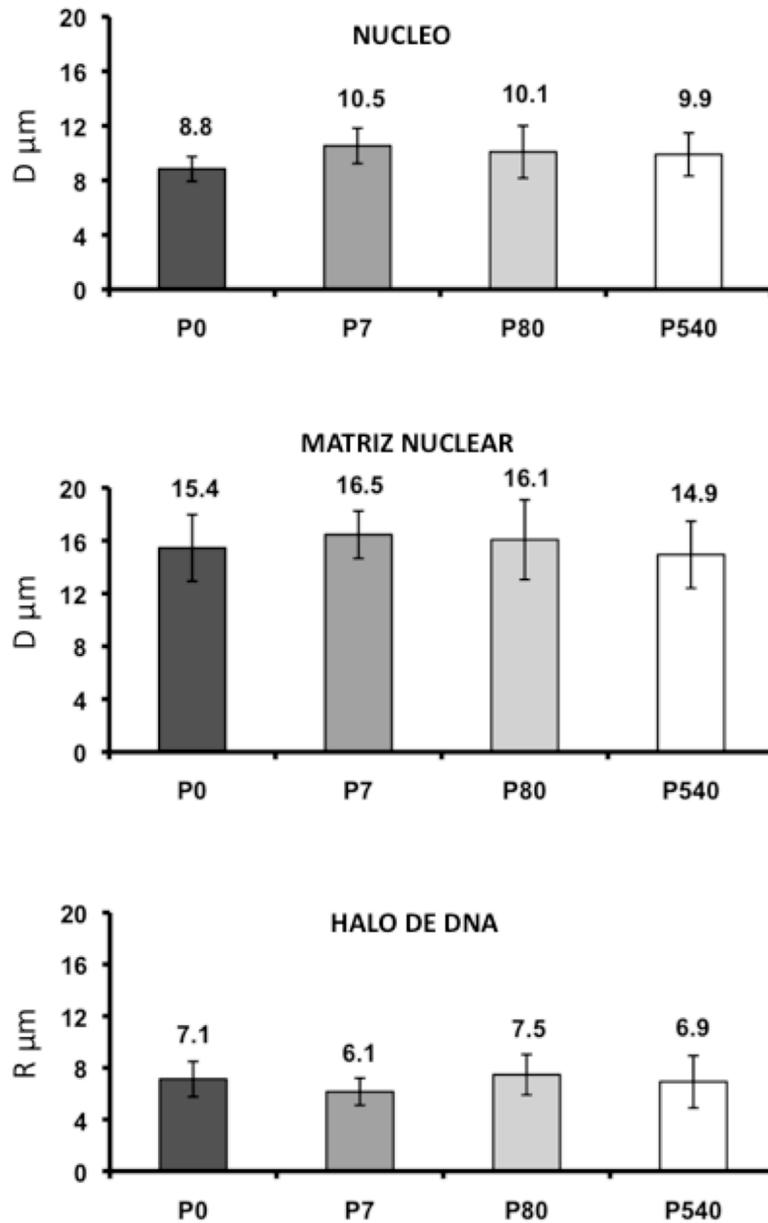


**Figura 14.** Micrografías de nucleoides neuronales de rata en diferentes edades postnatales, tratados con 80µg/ml de EtBr para inducir el desenrollamiento y relajación de los bucles de DNA. Cero segundos (0s) y 30 segundos (30s) corresponden a la primera y última micrografía respectivamente de un video de 30s tomado en tiempo real, donde se muestra la estabilidad de los nucleoides neuronales cuando el DNA se desenrolla por acción del EtBr en los cuatro estadios postnatales. (CF) Contraste de fases, (P0) ratas recién nacidas, (P7) de 7 días postnatales, (P80) adultas y (P540) viejas. Barra=10µm.

### **6.3 Dimensiones de los núcleos, la MN y halos de DNA en función de la edad.**

Dado que la MN y los halos de DNA que se forman son muy estables después del tratamiento de los nucleoides con EtBr, fue posible medir el diámetro de los núcleos, la MN y el radio de los halos de DNA (en el punto de máxima expansión) en las neuronas de corteza cerebral de ratas P0, P7, P80 y P540. Con los datos obtenidos, se realizó un análisis estadístico (prueba *T student*) con el fin de establecer si existen diferencias significativas en el tamaño del núcleo, la MN y los halos de DNA entre los diferentes estadios postnatales estudiados.

Los resultados muestran un aumento significativo en el tamaño del núcleo de P0 a P7, pero de P7 en adelante permanece sin cambios, ya que no se observa ningún cambio significativo de P7 a P80, ni de P80 a P540 (Fig. 15A y Tabla 4), utilizando un intervalo de confianza del 99% ( $P < 0.01$ ). Sin embargo, el tamaño de la MN permanece sin cambios significativos en todos los estadios postnatales estudiados (Fig. 15B y Tabla 4), utilizando un intervalo de confianza del 99% ( $P < 0.01$ ). Esto significa que el tamaño de la MN no cambia durante el desarrollo postnatal y el envejecimiento natural de las neuronas. Un dato interesante es que la MN es significativamente más grande que su núcleo correspondiente ( $P < 0.01$ ), lo cual sugiere que la MN es contráctil (resilente), ésto se ha observado previamente en eucariotes inferiores (Wunderlich y Herlan, 1977), dicha resiliencia de la MN se mantiene desde las ratas recién nacidas hasta las viejas, apoyando la idea de que esta característica puede contribuir directamente a su gran estabilidad. Por otro lado, el tamaño promedio del halo de DNA es muy pequeño desde P0 hasta P540 (Fig. 15C) y se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño promedio del halo de DNA de P0 a P7 y de P7 a P80, pero no entre P80 a P540, utilizando un intervalo de confianza del 99% ( $P < 0.01$ ) (Tabla 4).



**Figura 15:** Diámetro promedio (D) del núcleo y la MN y radio promedio (R) del halo de DNA de neuronas de rata en diferentes edades postnatales. Las barras representan el promedio de 50 determinaciones experimentales para el núcleo, la matriz nuclear y el halo de DNA medidos por microscopía de contraste de fases o de fluorescencia. Nótese el incremento en el diámetro de la MN con respecto al tamaño del núcleo en todas las edades postnatales. (P0) ratas recién nacidas, (P7) de 7 días postnatales, (P80) adultas, y (P540) viejas.

VALORES P DE LA PRUEBA DE T STUDENT			
TAMAÑO	NP0 & NP7	NP7 & NP80	NP80 & NP540
NÚCLEO	0.0001	0.1732	0.5877
	Significativo	No Significativo	No Significativo
MATRIZ	0.0243	0.4438	0.0448
	No Significativo	No Significativo	No Significativo
NUCLEAR	0.0001	0.0001	0.1283
	Significativo	Significativo	No Significativo

**Tabla 4:** Valores P obtenidos a partir de la prueba de *T student* para establecer posibles diferencias en el tamaño del núcleo, la matriz nuclear o el halo de DNA de las neuronas durante diferentes edades postnatales. Nivel de significancia de 99% ( $P < 0.01$ ).

Utilizando las mediciones del tamaño del halo de DNA después de la máxima expansión, se estimó el tamaño promedio del bucle para las neuronas durante los distintos estadios del desarrollo postnatal estudiados, ya que es posible convertir el tamaño del halo de DNA en micras a pares de bases utilizando la conversión de  $0.34\mu\text{m}/1000\text{pb}$  (Smith y Wood, 1992; Razin et al., 1995; Lemaitre et al., 2005). Los resultados indican que el tamaño promedio del bucle de DNA en neuronas de corteza cerebral de rata es muy pequeño de 36 a 44 kpb (Tabla 5) y sufre algunos cambios de P0 a P80, pero no existen cambios significativos en el tamaño del bucle de DNA relacionados con el envejecimiento (P80-P540). En contraste con lo reportado en hepatocitos de ratas en donde el tamaño promedio del bucle disminuye 36% de P80 a P540 (Maya-Mendoza et al., 2005).

<b>EDAD POSTNATAL</b>	<b>TAMAÑO PROMEDIO DEL BUCLE DE DNA</b>
P0	42 kpb $\pm$ 4.02
P7	36 kpb $\pm$ 3.05
P80	44 kpb $\pm$ 4.6
P540	40.6 kpb $\pm$ 5.9

**Tabla 5:** Tamaño promedio del bucle de DNA en neuronas de corteza cerebral de ratas (P0) recién nacidas, (P7) de 7 días postnatales, (P80) adultas y (P540) viejas. El tamaño promedio del bucle fue estimado a partir de las mediciones del tamaño promedio del halo de DNA en micras, obtenidas después de la máxima expansión del halo provocada por el EtBr (80 $\mu$ g/ml).

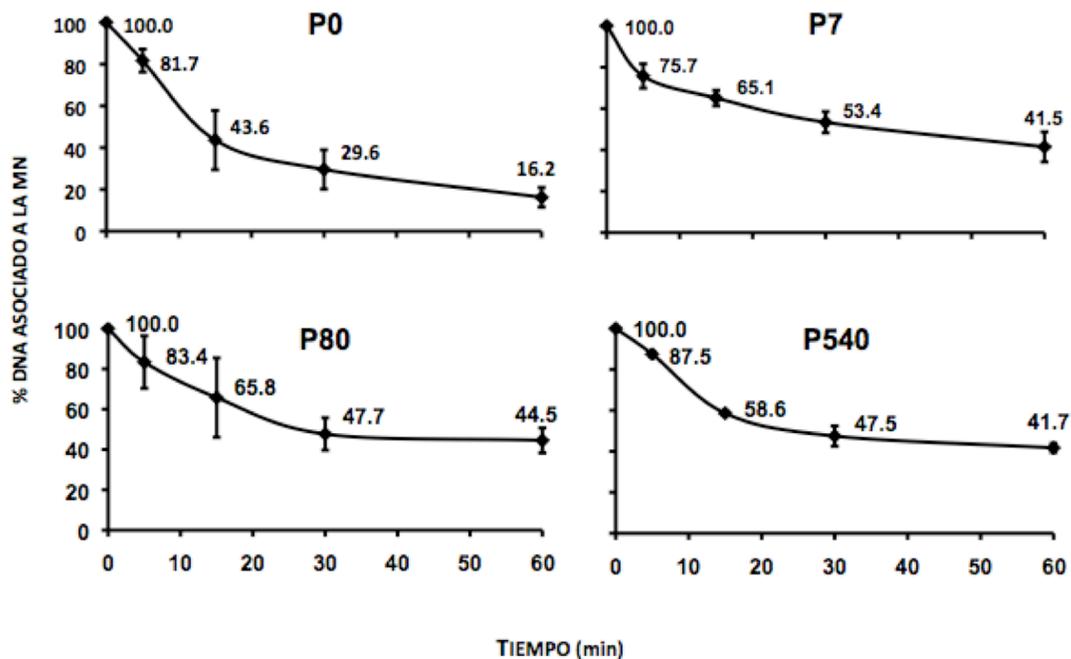
El tamaño del genoma haploide de la rata se ha estimado en 2.75 Gpb (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004). Al considerar el promedio estimado del número de MARs (1 MAR/30,000 pb of DNA) en el genoma de mamífero (Boulikas, 1995), debe haber aproximadamente 180,000 MARs en el genoma diploide de la rata. Estos datos sugieren un número similar de bucles de DNA si todos los MARs estuvieran anclados a la MN. De acuerdo al tamaño promedio del bucle de DNA obtenido en las neuronas de los diferentes estadios del desarrollo y la cantidad promedio de MARs estimada para el genoma de mamífero se puede establecer que el genoma diploide de las neuronas contiene aproximadamente 131,000 MARs unidos a la MN (LARs) al momento del nacimiento, 152,000 en las neuronas P7, y entre 125,000-135,000 en las neuronas P80 y P540. Dichas cifras son muy cercanas al número teórico de bucles posibles de DNA en el genoma diploide de la rata, lo cual sugiere que la mayoría de los MARs potenciales se encuentran unidos a la MN en las neuronas formando LARs.

#### **6.4 Cinéticas de digestión del DNA en neuronas durante distintas etapas del desarrollo postnatal.**

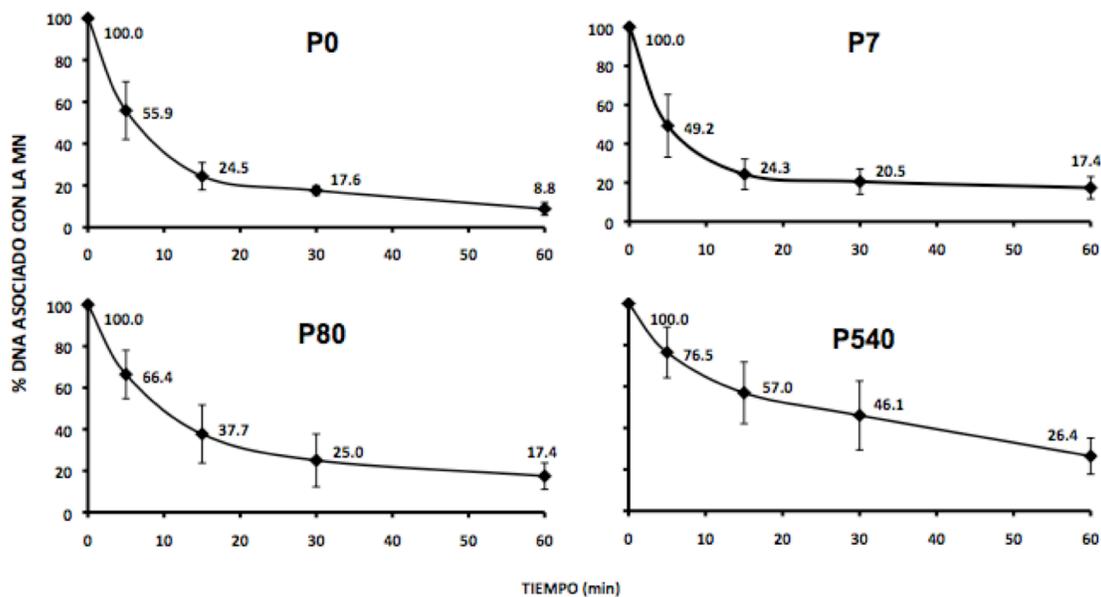
Previamente se ha descrito que en preparaciones de nucleoides la resistencia relativa de una secuencia a la digestión con concentraciones limitadas de DNasa I en un bucle dado de DNA, es directamente proporcional a su proximidad con respecto al punto de anclaje a la MN (Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003; Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010). Esta propiedad del DNA de los bucles está dada por dos factores principales: el impedimento estérico resultante de la estructura proteica de la MN que actúa como una barrera física que protege al DNA que se

encuentra cercano a la MN de la acción de las endonucleasas; y el grado de hiperenrollamiento local, el cual es menor en la porción distal del bucle y mayor en la región próximal a la MN. Ambos factores le confieren al DNA del bucle una resistencia relativa, pero no absoluta al corte por la DNasa I. Por lo tanto, en una muestra de nucleoides expuestos a una concentración limitada de DNasa I existe una tendencia a que las regiones de los bucles de DNA distales al punto de anclaje con la MN se digieran primero, mientras que las regiones cercanas a la MN se digieren después. Las regiones de DNA embebidas profundamente dentro de la MN son muy resistentes a la acción de la DNasa I, esta fracción corresponde a aproximadamente el 2% del DNA total que es básicamente no digerible incluso cuando se expone a altas concentraciones de la enzima (Berezney y Buchholtz, 1981). Estas regiones representan probablemente los MARs actualizados (LARs) anclados a la MN.

Con el fin de observar el comportamiento de los nucleoides neuronales a bajas concentraciones de enzima, se utilizaron nucleoides de neuronas de rata de distintas edades postnatales y se trataron con 0.5 U/ml de DNasa I, que es la concentración utilizada en hepatocitos de rata por Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo (2003). Los resultados muestran que el DNA de los nucleoides neuronales de P0 es más resistente al corte por la DNasa I que el de los hepatocitos P0. Mientras que en nucleoides de neuronas P0 se llega al 16% del DNA residual después de 60 min de tratamiento con DNasa I, en hepatocitos P0 se llega al 5% de DNA residual anclado a la MN (Maya-Mendoza et al., 2005). En los otros estadios de P7-P80 las cinéticas muestran que el DNA es aún más resistente al corte y llegan sólo alrededor del 41% del DNA total residual a los 60 min, mientras que en hepatocitos este grado de resistencia sólo se observa en las ratas P540 (Maya-Mendoza et al., 2005). Esto significa que el DNA de los nucleoides neuronales es muy resistente al corte por la DNasa I en todos los estadios estudiados.



**Figura 16:** Cinéticas de digestión del DNA con DNasa I (0.5U/ml) en nucleoides neuronales. Se muestran las cinéticas de digestión en nucleoides de neuronas P0, P7, P80 y P540. Nótese la gran resistencia del DNA al corte por la DNasa I a partir del estadio P7 y hasta P540, en donde después de 60 min de digestión no es posible digerir más allá del 41% del DNA total anclado a la MN. Para obtener cinéticas de digestión con un menor porcentaje de DNA anclado a la MN después de 60 min, se decidió incrementar la concentración de DNasa I a 0.92 U/ml (Fig. 17). Con esta cantidad de enzima se obtiene menos del 10% de DNA residual anclado a la MN en neuronas P0. En P7 y P80, las cinéticas son muy similares, ya que después de 60 min de digestión se obtiene alrededor del 17% del DNA residual anclado a la MN. Sin embargo, es importante mencionar que la primera fase de la cinética de digestión es un poco más rápida en P7 que en P80. En las ratas P540, la cinética es mucho más lenta desde el inicio y se llega a un menor porcentaje de corte después de 60 min de digestión (26% aproximadamente), lo cual nos indica que existe un aumento en la resistencia del DNA al corte por la DNasa I relacionado con el envejecimiento del animal (Fig. 17). En conclusión, los nucleoides de las neuronas P0 son los más sensibles al corte por la DNasa I con ambas concentraciones de enzima, mientras que los de P540 son los más resistentes al corte (Fig. 16-17). Asimismo, en los diferentes estadios postnatales se observa una importante fracción residual de DNA anclado a la MN que es muy resistente al corte por la DNasa I, sugiriendo que no es accesible a la enzima, ya que se encuentra protegido por la cercanía directa con la MN (Fig. 17).



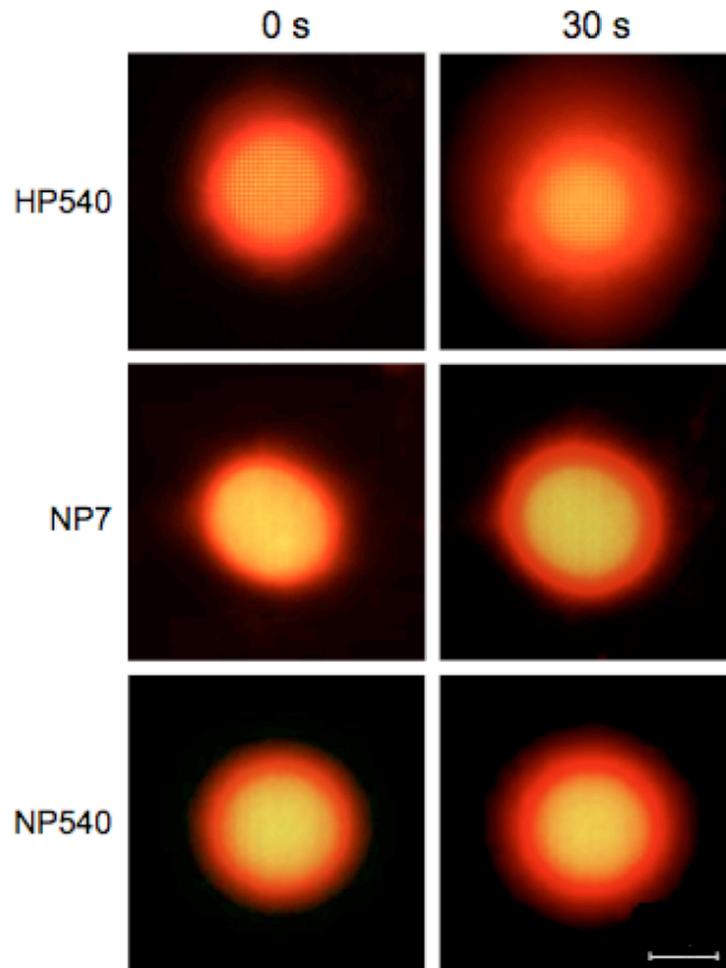
**Figura 17:** Cinéticas de digestión del DNA con de DNasa I (0.92U/ml) en nucleoides neuronales. Se muestran las cinéticas promedio de la digestión en nucleoides de neuronas P0 n=4; P7 n=5; P80 n=5 y P540 n=4. Nótese que los nucleoides neuronales de P540 presentan una cinética más lenta y se obtiene un porcentaje mayor de DNA anclado a la MN después de 60 min de digestión.

### 6.5 Comparación del OSODNA entre las células postmitóticas y las células senescentes.

Se ha descrito que durante el envejecimiento de los hepatocitos las interacciones DNA-MN son muy estables y el tamaño promedio del halo de DNA se reduce significativamente, lo cual se ha relacionado con el hecho de que éstas células tienden a perder su potencial proliferante en función de la edad y se dirigen hacia la diferenciación terminal (Maya-Mendoza et al, 2005). Existen algunas características similares entre los nucleoides de neuronas postmitóticas y los de hepatocitos de las ratas senescentes (P540) como lo son el reducido tamaño promedio del bucle de DNA y la gran resistencia al corte por la DNasa I, siendo más evidentes del estadio P7 en adelante. Por tal motivo, se decidió realizar la comparación específica de las características reportadas en este trabajo para neuronas P7 y P540 con lo reportado anteriormente para hepatocitos senescentes (P540), esto con el fin de establecer similitudes y diferencias a nivel del OSODNA entre las células postmitóticas (neuronas P7 y P540) y las células con bajo potencial proliferante (hepatocitos P540).

## **6.6 Evaluación comparativa de la estabilidad de las interacciones DNA-MN entre neuronas (P7 y P540) y hepatocitos P540.**

Como se mencionó anteriormente, en los nucleoides de las neuronas P7 y P540 el tratamiento con EtBr genera halos muy estables, de dimensiones pequeñas y la MN de estos nucleoides permanece sin cambios después del desenrollamiento (Fig. 18). En contraste, en hepatocitos las fuerzas liberadas por el desenrollamiento de los bucles inducido por el EtBr produce la desintegración o severa fractura de la MN en los nucleoides de P0 y P7. Sin embargo, en nucleoides de hepatocitos P540 la relajación de los bucles producida por el EtBr genera halos de DNA bien definidos que rodean a la MN, la cual permanece intacta (Maya-Mendoza et al., 2005), similar a lo que sucede en las neuronas (Fig. 18). Estos datos sugieren que los nucleoides de las neuronas P7 y P540 son tan estables como los nucleoides de los hepatocitos senescentes (P540), pues son capaces de soportar las fuerzas expansivas generadas por la relajación y desenrollamiento de los bucles inducida por el EtBr.

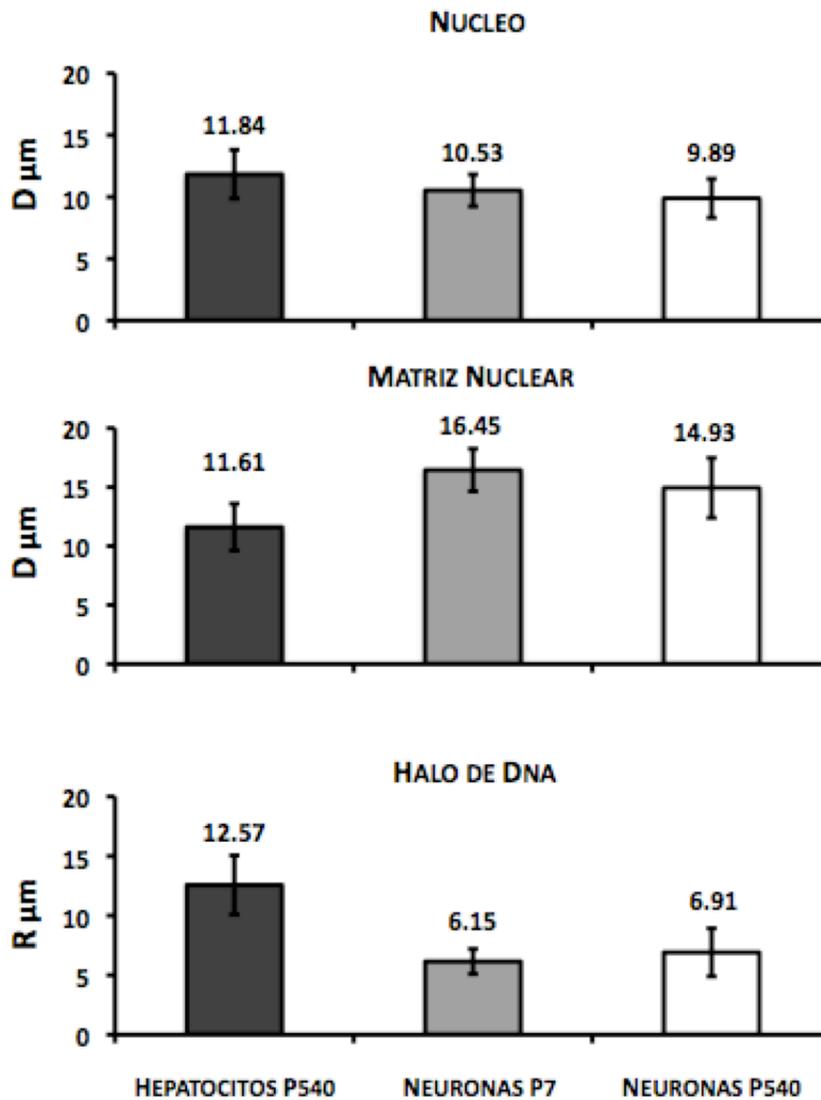


**Figura 18.** Micrografías en fluorescencia de nucleoides de hepatocitos de ratas senescentes (HP540) y de neuronas de ratas de 7 días postnatales (NP7) y senescentes (NP540) tratados con 80µg/ml de EtBr para inducir el desenrollamiento y relajación de los bucles de DNA que forman un halo alrededor de la MN. 0s y 30s corresponden a la primera y última micrografía de un video de 30 seg tomado en tiempo real que confirma la gran estabilidad de las interacciones DNA-MN y que la MN correspondiente permanece sin cambios después del desenrollamiento causado por el EtBr. Barra=10µm.

### **6.7 Comparación del tamaño promedio del núcleo, la MN y el halo de DNA entre neuronas (P7 y P540) y hepatocitos P540.**

Dado que los nucleoides neuronales P7 y P540 y los nucleoides de hepatocitos P540 presentan una gran estabilidad a altas concentraciones de EtBr, fue posible medir y comparar el tamaño de los núcleos, la MN y los halos de DNA entre ambos tipos celulares. Los resultados de estas mediciones muestran que el tamaño promedio del núcleo en las neuronas, tanto en P7 como en P540 es menor que el de los hepatocitos P540 (Fig. 19). Sin embargo, el diámetro de la MN de las neuronas P7 y P540 es mayor que la de los hepatocitos P540. Es importante mencionar que en las neuronas P7 y P540 la MN aumenta de tamaño cuando se remueve la envoltura nuclear por medio de la lisis, mientras que en los hepatocitos P540 la MN conserva el tamaño del núcleo. Este dato sugiere que la MN de las neuronas P7 y P540 es resiliente o contráctil lo cual podría contribuir a su gran estabilidad. Las mediciones del tamaño promedio del halo de DNA muestran que las neuronas P7 y P540 presentan halos de DNA mucho más pequeños que los halos en hepatocitos P540 (Fig. 19).

El análisis estadístico (Prueba *T student*) de todos los datos anteriores revela que existen diferencias significativas en el tamaño promedio del núcleo, la MN y el halo de DNA entre las neuronas P7 y P540 y los hepatocitos P540 (Tabla 6). Por lo tanto, el núcleo de las neuronas P7 y P540 es significativamente más pequeño que el núcleo de los hepatocitos P540. En contraste, la MN de las neuronas P7 y P540 es significativamente mayor que la MN de los hepatocitos P540. Asimismo, las neuronas P7 y P540 forman halos de DNA significativamente más pequeños que los hepatocitos P540.



**Figura 19.** Diámetro promedio (D) del núcleo y la MN, y radio promedio (R) del halo de DNA correspondiente a los nucleoides de hepatocitos de ratas senescente (P540) y neuronas de ratas de 7 días postnatales (P7) y senescentes (P540). Las barras representan la desviación estándar correspondiente (hepatocitos n=300; neuronas n=50 ) de las mediciones llevadas a cabo en microscopía de contraste de fases (núcleos y MN) y fluorescencia (halo de DNA).

---

**VALORES P DE LA PRUEBA DE T STUDENT**

---

TAMAÑO	HP540 & NP7	HP540 & NP540	NP7 & NP540
NUCLEO	0.0004*	0.0001*	0.02549
MATRIZ NUCLEAR	0.0001*	0.0008*	0.001*
HALO DE DNA	0.0001*	0.0001*	0.0193

---

**Tabla 6:** Valores P obtenidos a partir de la prueba *T student* para establecer posibles diferencias en el tamaño del núcleo, la matriz nuclear o el halo de DNA entre hepatocitos viejos (HP540) y neuronas en diferentes edades postnatales (NP7 y NP540). \* Diferencia estadísticamente significativa. Nivel de significancia de 99% ( $P < 0.01$ ).

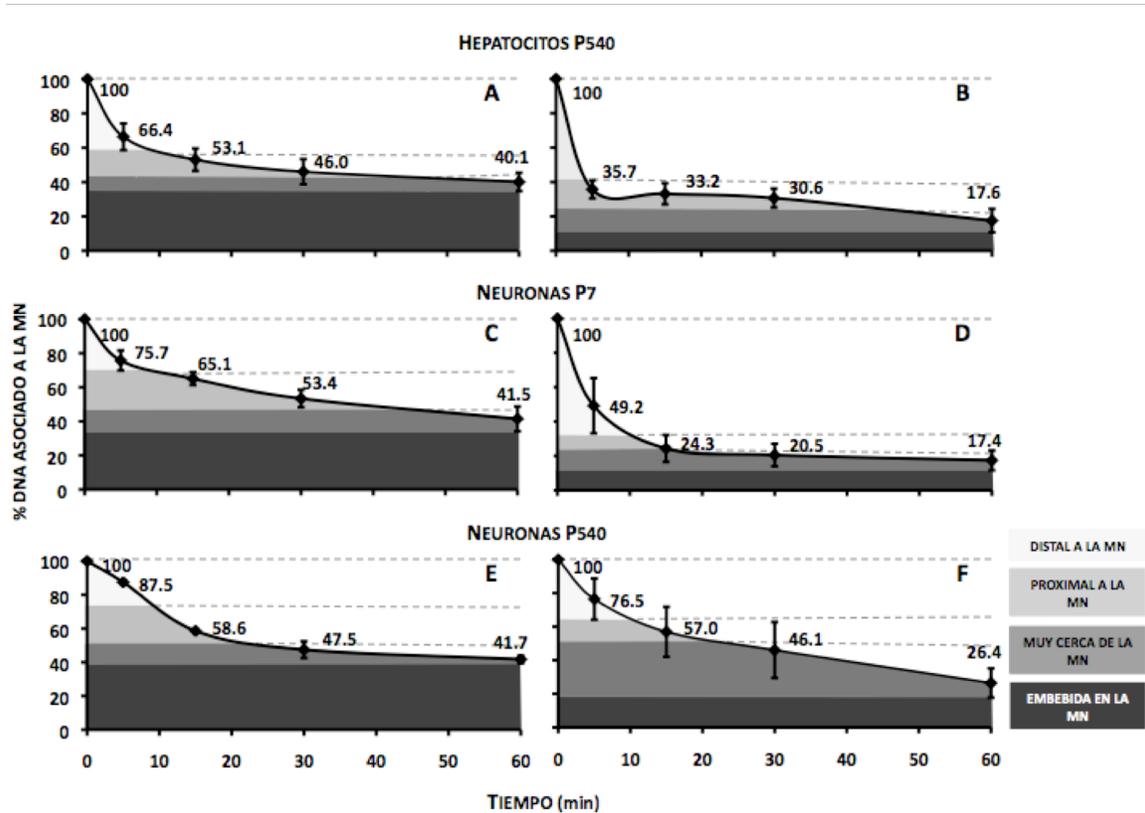
Convirtiendo el tamaño del halo de DNA en micras a pares de bases se observa que en las neuronas P7 el tamaño promedio estimado del bucle de DNA corresponde a 18 kpb de la punta a la base, o bien, 36 kpb en el bucle completo y en neuronas P540 el tamaño promedio estimado para el bucle es de 20.3 kpb de la punta a la base, que corresponden a 40.6 kpb en el bucle completo. Sin embargo, en hepatocitos de ratas P540 se ha estimado que el tamaño promedio del bucle de DNA es de 31kpb de la punta a la base, que corresponde a 62 kpb aproximadamente en un bucle completo (Maya-Mendoza et al, 2005). Estos resultados indican que los bucles de DNA en las neuronas (P7 y P540) son significativamente más pequeños que los reportados en los hepatocitos senescentes (P540) ( $P < 0.01$ ), no obstante que el diámetro de la MN en las neuronas (P7 y P540) sea de mayor tamaño que en los hepatocitos P540. En estos últimos el tamaño del núcleo y de la MN es el resultado de un incremento gradual que se lleva a cabo desde el nacimiento hasta la vejez (Maya-Mendoza et al., 2005). Este incremento en el diámetro promedio de los núcleos en hepatocitos P540 se ha correlacionado con la presencia de 40% de hepatocitos tetraploides en las ratas P540 (Jack et al, 1990), mientras que en las neuronas, la cantidad de células tetraploides es menor al 12% (Mosch et al., 2007; Currais et al., 2009) y no existen reportes de aumento en las ploidías relacionado con el envejecimiento.

## **6.8 Comparación de las cinéticas de digestión con DNasa I entre neuronas (P7 y P540) y hepatocitos P540.**

Con el fin de establecer si existen similitudes en el comportamiento de los nucleoides a diferentes concentraciones de DNasa I entre neuronas (P7 y P540) y hepatocitos P540, los nucleoides tanto de neuronas, como de hepatocitos fueron tratados con una concentración inicial de 0.5U/ml de DNasa I. Los resultados muestran cinéticas de corte en los bucles de DNA que son muy similares entre las neuronas P7 y P540 y los hepatocitos P540 (Fig. 20A, 20C y 20E). Las cinéticas obtenidas constan de tres fases, la primera de ellas corresponde a una fase relativamente rápida, donde se elimina de 20-40% del DNA unido a la MN durante los primeros 5 min de digestión, que corresponde a la fracción de DNA que se encuentra más alejada de la MN. En la segunda fase, se observa una cinética más lenta que dura alrededor de 10 min, en la cual se elimina aproximadamente 20% más del DNA que aún se encuentra unido a la MN. La tercera fase es la más lenta, con duración aproximada de 30 min, en la cual sólo es posible cortar entre 5-10% más del DNA residual anclado a la MN, correspondiente a la fracción de DNA que se encuentra muy cerca de la MN. Después de 60 min de digestión se obtiene una fracción de DNA que permanece resistente al corte por la DNasa I y por lo tanto se encuentra protegida de la acción de la enzima debido al impedimento estérico que representa la MN, dicha fracción de DNA es un poco mayor al 40% en las cinéticas realizadas con 0.5U/ml de DNasa I (Fig. 20A, C y E).

Al aumentar la cantidad de DNasa I a 0.92U/ml se observó que en los nucleoides de las neuronas P7 y los hepatocitos P540 la cinética de corte es más rápida y solo se observan dos fases, la primera de ellas es muy rápida y se logra eliminar aproximadamente el 70% del DNA anclado a la MN durante los primeros 15 min de digestión, la segunda fase es muy lenta y sólo es posible eliminar otro 15% aproximadamente del DNA anclado a la MN en los siguientes 45 min de digestión (Fig. 20B y D). En los nucleoides de las neuronas P540 la cinética es más lenta y se observan tres fases, durante la primera fase es posible eliminar aproximadamente 40% del DNA anclado a la MN en los primeros 5 min de digestión. La segunda fase de la cinética es un poco más lenta, logrando eliminar otro 20% del DNA residual anclado a la MN. La tercera fase es la más lenta, logrando eliminar sólo 13% más del DNA anclado (Fig. 20F). La fracción de DNA que permanece anclada a la MN después de 60 min de digestión corresponde al DNA que se encuentra protegido de la acción de la enzima por su cercanía con la MN, el cual para las neuronas P540 es mayor cuando se compara con la misma fracción de DNA residual en las neuronas P7 o en los hepatocitos P540. Esto sugiere que cantidades similares de DNA se

encuentran interactuando con la MN tanto en los nucleoides de las neuronas P7 como en los hepatocitos P540, sin embargo también sugiere que una mayor cantidad de DNA se encuentra interactuando con la MN en las neuronas P540 (Fig. 20F).



**Figura 20.** Cinéticas de digestión con DNasa I en nucleoides de hepatocitos de 540 días postnatales (A, B), nucleoides de neuronas P7 (C, D) y P540 (E, F). Los nucleoides fueron tratados con DNasa I a 0.5 U/ml (A, C, E) o 0.92 U/ml (B, D, F). Los valores de cada tiempo de digestión corresponden a la media de diferentes experimentos utilizando animales independientes como fuente para la obtención de los nucleoides (n=4). Las zonas topológicas relativas a la MN para cada cinética fueron establecidas considerando las pendientes locales entre los distintos puntos de digestión (Tabla 7) y las desviaciones estándar correspondientes (ver sección 6.9).

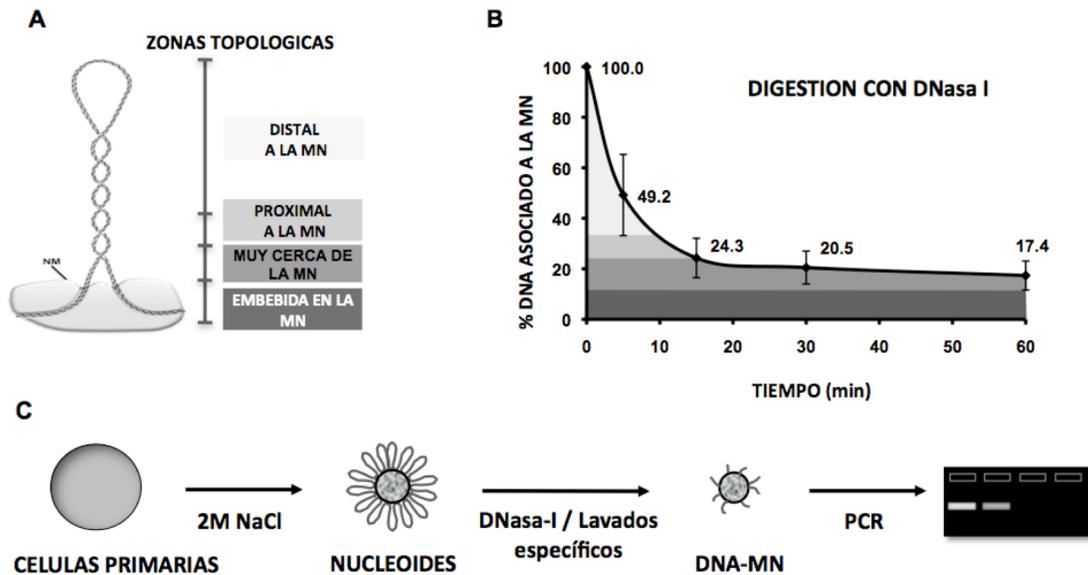
## **6.9 Mapeo posicional de secuencias génicas con respecto a la MN.**

Los bucles de DNA desnudo anclados a la MN son equivalentes topológicamente a estructuras de DNA circular, bajo estas condiciones la molécula de DNA sufre estrés estructural que se disipa espontáneamente por el enrollamiento de la hebra sobre su propio eje lo cual genera hiperenrollamiento negativo de forma similar a lo que se observa en el cable de los teléfonos antiguos (Nelson y Cox, 2000; Calladine et al., 2004). Los bucles de DNA desnudos despliegan un gradiente de hiperenrollamiento de menor a mayor grado desde la punta hasta la base del bucle (Fig. 21A). Tomando en cuenta las propiedades topológicas de los bucles de DNA anclados a la MN y el patrón diferencial de corte por las nucleasas, un bucle típico puede ser dividido en cuatro zonas topológicas de acuerdo a su proximidad relativa con respecto a la MN, cada una de estas zonas manifiesta un comportamiento identificable cuando se expone a nucleasas inespecíficas como la DNasa I que es sensible a la topología local del DNA (Fig. 21A y B).

Basados en las propiedades topológicas de los bucles de DNA anclados a la MN y el patrón diferencial de sensibilidad a la digestión con DNasa I se ha diseñado un método para establecer la organización estructural del DNA al interior del núcleo con respecto a la MN (Rivera-Mulia y Aranda-Anzaldo, 2010), el cual depende de la determinación de la posición relativa con respecto a la MN de ciertas secuencias de DNA. El mapeo de dichas posiciones relativas se basa en la digestión progresiva de los bucles de DNA anclados a la MN con DNasa I, de tal forma que se obtienen muestras de nucleoides parcialmente digeridos, los cuales son posteriormente sometidos a reacciones de amplificación por PCR de secuencias específicas que son posicionadas en las distintas zonas topológicas de acuerdo a su patrón de amplificación (Fig. 21C).

Utilizando esta misma estrategia experimental y basándonos en las pendientes locales (Tabla 7) obtenidas entre cada punto dentro de las cinéticas de digestión realizadas a distintas concentraciones de DNasa I y sus desviaciones estándar correspondientes para cada tipo celular, se establecieron cuatro zonas topológicas relativas a la MN: distal con respecto a la MN, proximal con respecto a la MN, muy cercana a la MN y embebido en la MN (Fig. 21A). La zona distal a la MN comprende al DNA que se encuentra más alejado de la MN y que presenta un menor grado de hiperenrollamiento, por lo cual es más sensible al corte por la DNasa I. La zona proximal a la MN corresponde al DNA que tiene un mayor grado de hiperenrollamiento, por lo que la cinética de digestión es lenta. La zona muy cercana a la MN corresponde al DNA que es poco sensible al corte por la DNasa I, por lo que su cinética de digestión es la más lenta, debido a que la MN actúa

como barrera estérica que protege al DNA contra la acción de la enzima. Finalmente, el DNA que permanece asociado a la MN después de 60 minutos de digestión, corresponde a la zona embebida en la MN, ya que este DNA no es sensible al corte con la DNasa I. Dichas zonas topológicas fueron utilizadas posteriormente para determinar la posición relativa con respecto a la MN de las diferentes secuencias blanco.



**Figura 21.** Método utilizado para el mapeo posicional de las secuencias génicas con respecto a la MN. A) Propiedades estructurales del bucle de DNA desnudo anclado a la MN y sus zonas topológicas correspondientes relativas a la MN. B) Cinética de digestión de los bucles de DNA desnudo correlacionadas con las zonas topológicas. C) Procedimiento para el mapeo posicional de secuencias génicas con respecto a la MN. Nucleoides frescos aislados de células primarias son incubados con una concentración limitada de DNasa I para digerir progresivamente los bucles de DNA. Las muestras obtenidas de nucleoides parcialmente digeridos con diferentes cantidades de DNA unido a la MN son usadas como templado para la amplificación por PCR de secuencias blanco. Los amplicones se resuelven en gels de agarosa y se analiza la presencia (+) o ausencia (-) de la señal de amplificación mediante un programa de análisis de imágenes. El siguiente paso es posicionar cada secuencia con respecto a la MN en función del tiempo de digestión y de acuerdo a las zonas topológicas establecidas en B.

	HEPATOCITOS P540		NEURONAS P7		NEURONAS P540	
TIEMPO (min)	Porcentaje de DNA total anclado a la MN	Pendiente	Porcentaje de DNA total anclado a la MN	Pendiente	Porcentaje de DNA total anclado a la MN	Pendiente
Cinéticas de digestión con 0.5U/ml de DNasa I						
0	100.0		100.0		100.0	
5	66.4	-6.7	87.5	-2.5	87.5	-2.5
5	66.4		87.5		87.5	
15	53.1	-1.3	58.6	-2.9	58.6	-2.9
15	53.1		58.6		58.6	
30	46.0	-0.5	47.5	-0.7	47.5	-0.7
30	46.0		47.5		47.5	
60	40.1	-0.2	41.7	-0.2	41.7	-0.2
60	40.1		41.7		41.7	
Cinéticas de digestión con 0.92U/ml de DNasa I						
0	100.0	-12.8	100.0	-10.2	100.0	-4.7
5	35.7		49.2		76.5	
5	35.7	-0.2	49.2	-2.5	76.5	-2.0
15	33.1		24.3		57.0	
15	33.1	-0.1	24.3	-0.3	57.0	-0.7
30	30.6		20.5		46.1	
30	30.6	-0.4	20.5	-0.1	46.1	-0.7
60	17.6		17.4		26.4	

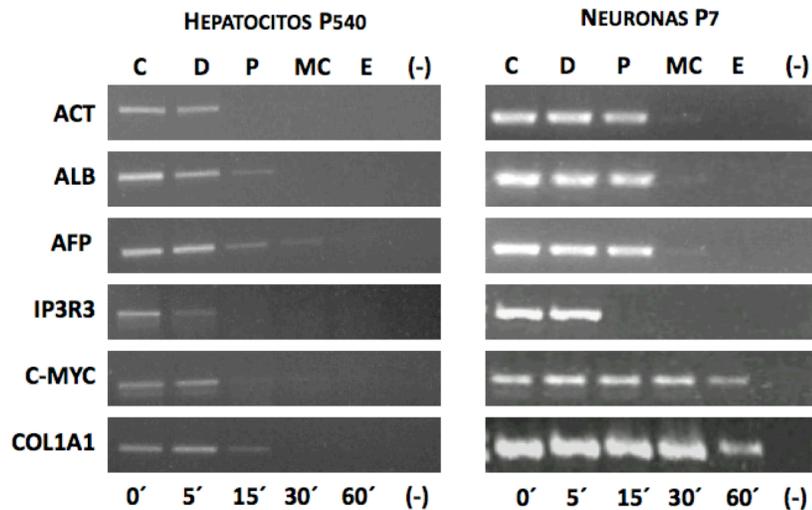
**Tabla 7.** Pendientes locales entre los distintos puntos de digestión de las cinéticas correspondientes a la digestión de los bucles de DNA en nucleoides de hepatocitos senescentes (P540) y neuronas postmitóticas (P7 y P540) tratadas con 0.5 y 0.92U/ml de DNasa I.

### **6.10 Mapeo posicional comparativo de secuencias génicas con respecto a la MN entre neuronas P7 y hepatocitos P540.**

Para establecer si la organización estructural del DNA al interior del núcleo es similar entre las neuronas de ratas P7 y los hepatocitos de ratas P540, fue necesario determinar la posición relativa con respecto a la MN de diferentes secuencias blanco, las cuales han sido mapeadas previamente en hepatocitos P540 (Maya-Mendoza et al., 2005), y que corresponden a los genes de: (ACT) actina, (ALB) albúmina, (AFP)  $\alpha$ -fetoproteína, (C-MYC) c-myc, (COL1A1) colágena tipo-1- $\alpha$ -1

y (IP3R3) receptor de inositol-1,4,5-trifosfato tipo 3, los cuales se localizan en 5 cromosomas diferentes (ver Tabla 1 en materiales y métodos), por lo que representan territorios cromosomales distintos dentro del núcleo celular (Meaburn y Misteli, 2007).

En mapeos preliminares realizados en neuronas P7 basados en las cinéticas de digestión con 0.5U/ml de DNasa I se observó que todas las secuencias blanco se encontraban en la zona embebida dentro de la MN. Por lo tanto, los mapeos posicionales se llevaron a cabo utilizando muestras de nucleoides parcialmente digeridos obtenidos a partir de las cinéticas de digestión con 0.92U/ml en las neuronas P7 y con 0.5U/ml de DNasa I en los hepatocitos P540, los cuales fueron sometidos de manera independiente a reacciones de PCR (ver materiales y métodos). Los resultados de las amplificaciones muestran que la mayoría de las seis secuencias mapeadas en las neuronas P7 presentan señal de amplificación hasta los últimos tiempos de digestión, mientras que en los hepatocitos P540 presentan señal de amplificación únicamente en los primeros tiempos de digestión (Fig. 22).



**Figura 22.** Amplificación representativa de las seis secuencias mapeadas con respecto a las zonas topológicas relativas a la MN en hepatocitos P540 y neuronas P7. (ACT) Actina, (ALB) albumina, (AFP)  $\alpha$ -fetoproteína, (C-MYC) c-myc, (COL1A1) colágena tipo1- $\alpha$ -1, (IP3R3) receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 3. Las amplificaciones fueron clasificadas como positivas o negativas por un sistema de análisis de imágenes (*Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 system*) usando las condiciones preestablecidas por el programa y posicionando las secuencias génicas dentro de una zona topológica definida de acuerdo a las cinéticas de digestión correspondientes. C = control (tiempo cero de digestión), D = distal a la NM, P = proximal a la NM, MC = muy cerca de la NM, E = embebido en de la NM, (-) control negativo sin DNA.

Determinando la posición de las secuencias estudiadas relativas a las zonas topológicas preestablecidas en el bucle de DNA se observa que la mayoría de las secuencias estudiadas en las neuronas P7 se encuentran entre las zonas muy cercana o embebida dentro de la MN (Tabla 8), en contraste con lo observado en los hepatocitos P540, donde ninguna secuencia se encuentra más allá de la región proximal a la MN (Tabla 8), a pesar de que la cantidad de DNA embebido en la MN es mucho mayor en los hepatocitos P540 (Fig. 20A).

Amplicon	Zonas topológicas relativas a la NM							
	D	P	MC	E	D	P	MC	E
	Hepatocitos P540				Neuronas P7			
ACT	+	-	-	-	+	+	+	-
ALB	+	+	-	-	+	+	+	-
AFP	+	+	-	-	+	+	+	-
IP3R3	+	-	-	-	+	-	-	-
C-MYC	+	+	-	-	+	+	+	+
COL1A1	+	+	-	-	+	+	+	+

**Tabla 8.** Localización diferencial de las secuencias blanco estudiadas dentro de las diferentes zonas topológicas, definidas de acuerdo a la cinética de digestión correspondiente para hepatocitos P540 (Fig. 20A) o neuronas P7 (Fig. 20D). Las secuencias blanco fueron registradas como positivas o negativas para cada zona topológica en función del análisis de detección realizado por el sistema *Kodak 1D image analysis software 3.5*. C = control (tiempo 0' de digestión) D = distal a la NM, P = proximal a la NM, MC = muy cerca de la NM, E = embebido en la NM.

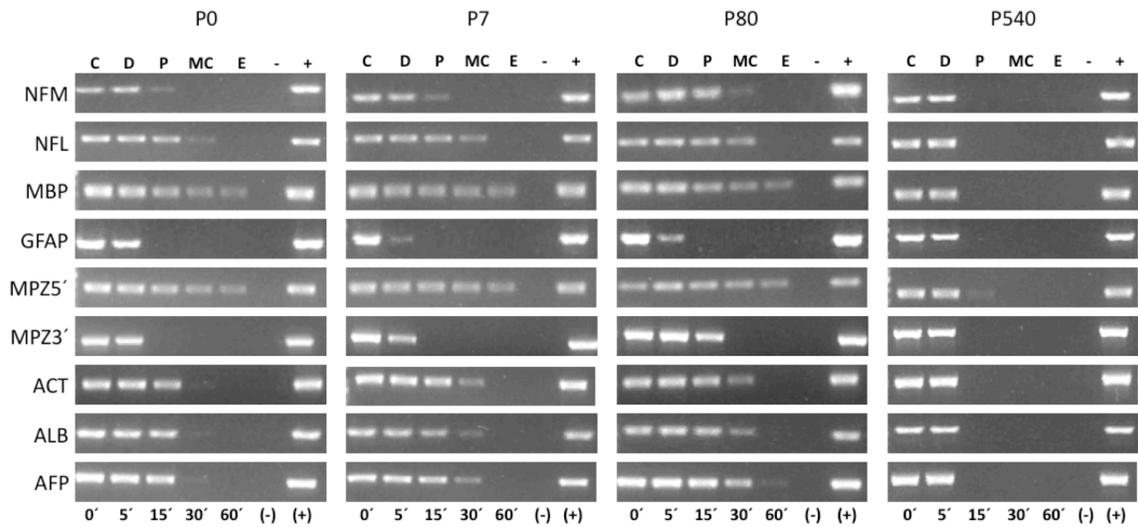
Con todos estos datos se puede establecer que las neuronas postmitóticas tempranas (P7) comparten ciertas características estructurales con los hepatocitos senescentes (P540), como son la gran estabilidad de las interacciones DNA-MN y la gran resistencia al corte por nucleasas inespecíficas como la DNasa I. Sin embargo, la organización estructural del DNA al interior del núcleo es diferente en estos dos tipos celulares, ya que las neuronas tienen bucles de DNA significativamente más pequeños que los hepatocitos senescentes y la posición relativa de diferentes secuencias blanco es esencialmente diferente entre las neuronas P7 y los hepatocitos P540.

### **6.11 Mapeo posicional de secuencias génicas con respecto a la MN durante el desarrollo postnatal y el envejecimiento natural de las neuronas.**

Hasta el momento, se ha mostrado que las neuronas postmitóticas P7 presentan ciertas similitudes con los hepatocitos P540, pero de manera interesante, la organización estructural del DNA al interior del núcleo es diferente en ambos tipos celulares. Un factor importante que no ha sido tomado en cuenta es el hecho de que las neuronas P7 aunque son células postmitóticas, se encuentran todavía en un proceso de diferenciación terminal y no son células senescentes, puesto que provienen de un organismo joven. Por tal motivo para nosotros fue relevante establecer la organización estructural del DNA al interior del núcleo durante diferentes etapas del desarrollo postnatal en las neuronas, que abarca desde el nacimiento (P0) hasta la vejez (P540).

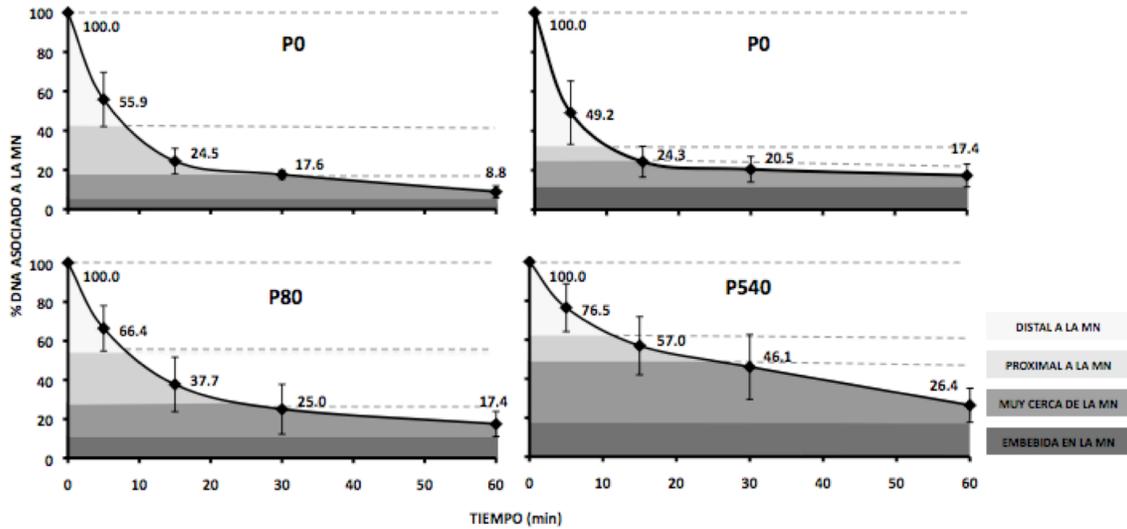
Para ello, se determinó la posición relativa de diferentes secuencias génicas con respecto a la MN en neuronas de ratas P0, P7, P80 y P540. Se realizaron ampliaciones de secuencias blanco en muestras de nucleoides parcialmente digeridos a distintos tiempos con 0.92U/ml de DNasa I (Fig. 17). Las secuencias estudiadas corresponden a los genes de neurofilamento medio (NFM), neurofilamento ligero (NFL), proteína básica de mielina (MBP), proteína ácida glial fibrilar (GFAP), proteína cero de mielina región 5' (MPZ5'), proteína cero de mielina región 3' (MPZ3'), actina (ACT), albúmina (ALB) y  $\alpha$ -fetoproteína (AFP), algunos de los cuales se expresan de manera diferencial en las neuronas de corteza cerebral y otros no se expresan, además de que se localizan en cromosomas diferentes (ver Tabla 1 en materiales y métodos) y por lo tanto, representan territorios cromosomales distintos dentro del núcleo celular (Meaburn y Misteli, 2007).

Los resultados muestran que la mayoría de las secuencias estudiadas en los nucleoides de las neuronas de ratas P0, P7 y P80 presentan señal de amplificación en los últimos tiempos de digestión (30' y 60'), con excepción de GFAP y MPZ3' que sólo amplifican hasta los 5 min de digestión en P0 y P7 y hasta los 15 min en P80. A diferencia de las neuronas de las ratas P540 donde se observa que todas las secuencias amplifican únicamente en los primeros dos tiempos de digestión (0' y 5') (Fig. 23).



**Figura 23:** Amplificaciones representativas de las nueve secuencias blanco mapeadas en nucleoides neuronales de diferentes edades postnatales. Los amplicones fueron establecidos como positivos o negativos dependiendo de si fueron o no detectados por el sistema de análisis de imágenes y posicionados de acuerdo a las zonas topológicas correspondientes relativas a la MN previamente establecidas en cada una de las cinéticas de digestión (ver Fig. 24). (C) El tiempo cero fue establecido como control positivo de amplificación para el DNA anclado a la MN, (D) el 5' representa la zona distal relativa a la MN, (P) 15' representa la zona proximal relativa a la MN, (MC) 30' representa la zona muy cercana a la MN y (E) 60' se estableció como la zona embebida en la MN; (-) control negativo sin DNA, (+) control positivo con DNA genómico. (NFM) Neurofilamento medio, (NFL) neurofilamento ligero, (MBP) proteína básica de mielina, (GFAP) proteína ácida glial fibrillar, (MPZ5') proteína cero de mielina región 5', (MPZ3') proteína cero de mielina región 3', (ACT) actina, (ALB) albúmina y (AFP)  $\alpha$ -fetoproteína. (P0) ratas recién nacidas, (P7) de 7 días postnatales, (P80) adultas, y (P540) viejas.

Para establecer las posiciones relativas de las secuencias estudiadas con respecto a la MN en los diferentes estadios del desarrollo postnatal se tomaron en cuenta las propiedades topológicas de los bucles de DNA previamente descritas en la sección 6.9, así como la pendientes locales (Tabla 9) y las desviaciones estándar correspondientes a las cinéticas de digestión obtenidas para cada estadio del desarrollo (Fig. 17). Las cuatro zonas topológicas con respecto a la MN se observan en la Fig. 24.



**Figura 24:** Zonas topológicas establecidas para cada una de las cinéticas de digestión de nucleoides en diferentes edades postnatales. Los nucleoides fueron tratados con 0.92U/ml de DNasa I por 60 minutos. Cada punto de digestión corresponde al promedio de experimentos independientes P0 n=4; P7 n=5; P80 n=5 y P540 n=4. Las zonas topológicas fueron establecidas de acuerdo a las pendientes (Tabla 9) y a los valores de las desviaciones estándar en cada una de las cinéticas establecidas. Las barras indican la desviación estándar correspondiente.

Nucleoides											
P0			P7			P80			P540		
TIEMPO (min)	% of DNA anclado a la MN	P	% of DNA anclado a la MN	P	% of DNA anclado a la MN	P	% of DNA anclado a la MN	P			
0	100.0	-8.8	100.0	-10.2	100.0	-6.7	100.0	-4.7			
5	55.9	-3.1	49.2	-2.5	66.4	-2.9	76.5	-2.0			
15	24.5	-2.2	24.3	-0.3	37.7	-0.8	57.0	-0.7			
30	17.6	-3.4	20.5	-0.1	25.0	-0.3	46.1	-0.7			
60	8.8		17.4		17.4		26.4				

**Tabla 9.** Porcentaje de DNA anclado a la MN y pendientes locales entre los diferentes puntos de las cinéticas de digestión de los nucleoides neuronales tratados con 0.92 U/ml de DNasa I durante distintas edades postnatales. Las zonas topológicas relativas a la MN fueron establecidas de acuerdo a estas pendientes. (P0) ratas recién nacidas, (P7) de 7 días postnatales, (P80) adultas y (P540) viejas. (P) Pendiente.

Considerando el patrón de amplificación (Fig. 23) y las zonas topológicas establecidas en las cinéticas de digestión (Fig. 24) para cada estadio del desarrollo postnatal, se establecieron las posiciones relativas con respecto a la MN de cada una de las secuencias estudiadas. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 10. Se observa que en los nucleoides de neuronas P0 la mayoría de las secuencias génicas se encuentran entre las zonas muy cercana y embebida dentro de la MN (NFL, NFM, MBP, MPZ5', ACT, ALB y AFP) y sólo las secuencias correspondientes a GFAP y MPZ3' se encuentran en las zonas proximal y distal con respecto a la MN. En los nucleoides de las neuronas P7 GFAP y MPZ3' se recorren hacia la zona distal del bucle, mientras que ACT, ALB, AFP se encuentran en la zona topológica muy cercana a la MN, el resto de las secuencias permanecen sin cambios aparentes. En los nucleoides neuronales de las ratas P80 se observa un acercamiento de las secuencias correspondientes a los genes de GFAP y MPZ3' que ahora mapean entre las zonas proximal y muy cercana relativas a la MN, el resto de las secuencias en las ratas P80 permanecen sin cambios aparentes. Sin embargo, en los nucleoides de las ratas viejas (P540) se observa un alejamiento con respecto a la MN de todas las secuencias en estudio, posicionándose entre las zonas proximal y distal con respecto a la MN, con excepción de MBP que se encuentra entre la zona proximal y muy cercana con respecto a la MN (Tabla 10).

Amplificación	Zonas Topológicas Relativas a la MN															
	D	P	VC	E	D	P	VC	E	D	P	VC	E	D	P	VC	E
	P0				P7				P80				P540			
NFM	+	+	+	-	+	+	±	-	+	+	±	-	+	±	-	-
NFL	+	+	+	±	+	+	±	-	+	+	+	±	+	±	-	-
MBP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+	±	±	-
GFAP	+	±	-	-	+	-	-	-	+	+	±	-	+	-	-	-
MPZ5'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
MPZ3'	+	±	-	-	+	-	-	-	+	+	±	-	+	-	-	-
ACT	+	+	+	±	+	+	+	-	+	+	+	-	+	±	-	-
ALB	+	+	+	±	+	+	+	-	+	+	+	-	+	±	-	-
AFP	+	+	+	±	+	+	+	-	+	+	+	-	+	±	-	-

**Tabla 10.** Posiciones relativas de las secuencias blanco amplificadas con respecto a la MN. (D) distal respecto a la MN, (P) proximal a la MN, (MC) muy cercano a la MN (E) embebido en la MN. Nótese que en P0 la mayoría de las secuencias génicas fueron encontradas en la zona embebida dentro de la MN

y en las neuronas de ratas viejas (P540) todas las secuencias génicas se encuentran en las zonas proximal y distal con respecto a la MN. (P0) ratas recién nacidas, (P7) de 7 días postnatales, (P80) adultas, y (P540) viejas. (NFM) Neurofilamento medio, (NFL) neurofilamento ligero, (MBP) proteína básica de mielina, (GFAP) proteína ácida glial fibrillar, (MPZ5') proteína cero de mielina región 5', (MPZ3') proteína cero de mielina región 3', (ACT) actina, (ALB) albúmina y (AFP)  $\alpha$ -fetoproteína.

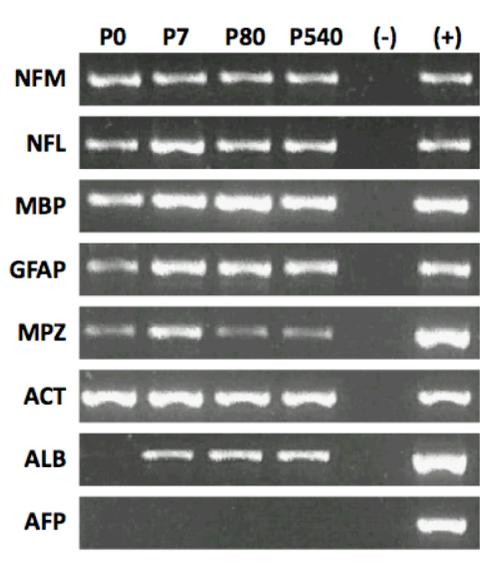
### **6.12 Mapeo posicional de las regiones 5' y 3' del gen MPZ.**

Previamente en hepatocitos P80 se hicieron mapeos posicionales de secuencias blanco del gen  $\beta$ -actina, separados por 320 pb, reportando que la secuencia ubicada hacia la región 5' se encuentra invariablemente orientada hacia el punto de anclaje con la MN y la secuencia ubicada hacia la región 3' del gen se encuentra hacia la parte distal con respecto a la MN y que esta orientación se mantiene cuando el gen se acerca o aleja de la MN (Maya-Mendoza et al., 2004). Por lo tanto, con el fin de conocer la orientación del gen MPZ con respecto a la MN en las neuronas de corteza cerebral de rata, se analizó la posición de dos secuencias diferentes en el gen MPZ, una cercana al extremo 3' y otra ubicada hacia la región 5' del gen, en los distintos estadios postnatales; ambas secuencias se encuentran separadas por 2687pb. Los resultados muestran que mientras la región 5' del gen se ubica en una posición relativamente cercana con respecto a la MN, la región ubicada hacia el 3' del gen se encuentra más alejada de ésta (Tabla 10). Es importante mencionar que esta orientación se conserva durante el desarrollo y envejecimiento del animal, siendo en todas las edades la región 5' del gen la más cercana a la MN y la región 3' del gen la más distal con respecto a la MN, aún cuando todas las secuencias sufren un drástico alejamiento con respecto a la MN en P540 (Fig. 23 y Tabla 10).

### **6.13 Expresión de los genes mapeados en neuronas durante diferentes edades postnatales.**

Anteriormente se tenía la idea de que los genes activamente transcritos se encontraban estrechamente asociados con la MN (Ciejek et al., 1983; RamanaMurty et al., 1988). Sin embargo, estudios más recientes han mostrado que la posición relativa de los genes con respecto a la MN es independiente de su estatus transcripcional (Maya-Mendoza et al., 2004). Por lo tanto, con el fin de establecer si existe alguna relación entre la posición de los genes mapeados con respecto a la MN y la actividad transcripcional de los mismos durante el desarrollo y

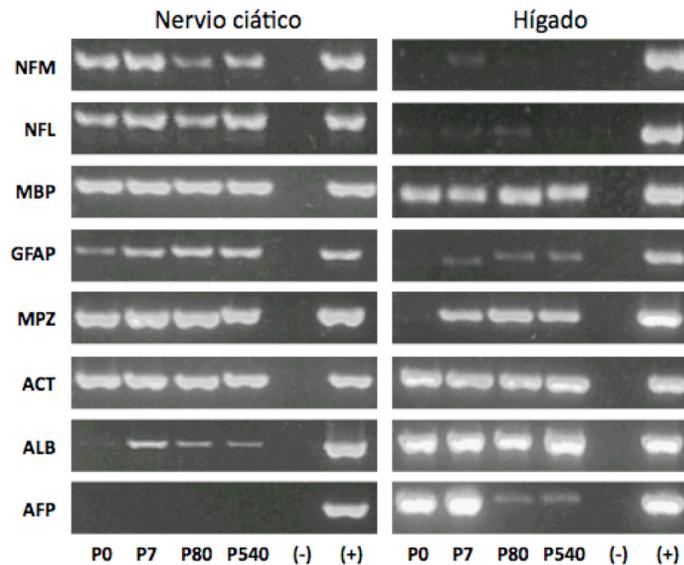
envejecimiento natural de las neuronas de corteza cerebral de rata, se analizó por RT-PCR la expresión de los genes estudiados. Los resultados muestran que en la corteza cerebral de las ratas P0, P7, P80 y P540 se expresan los genes que codifican para las proteínas de MBP, NFM, NFL, GFAP, y ACT. Contrario a lo esperado MPZ también se expresa en la corteza cerebral. Como caso particular ALB no se expresa en P0 y sí en los demás estadios. El único gen estudiado que no se expresa en corteza cerebral es AFP (Fig. 25).



**Figura 25.** Expresión de los 8 genes previamente mapeados con respecto a la MN en corteza cerebral, monitoreados mediante RT-PCR. (P0) ratas recién nacidas, (P7) de 7 días postnatales, (P80) adultas, y (P540) viejas. (NFM) Neurofilamento medio, (NFL) neurofilamento ligero, (MBP) proteína básica de mielina, (GFAP) proteína ácida glial fibrillar, (MPZ) proteína cero de mielina, (ACT) actina, (ALB) albúmina y (AFP)  $\alpha$ -fetoproteína. (+) Control positivo con RNA tejido específico, (-) control negativo sin RNA.

También se analizó la expresión de estos genes en hígado y nervio ciático de rata, los cuales sirvieron como controles positivos o negativos según sea el caso para la expresión de las diferentes secuencias en estudio. En el hígado de las ratas P0 y P7 se expresan los genes que codifican para las proteínas de MPZ, MBP, GFAP, AFP, ALB y ACT, mientras que en el hígado de las ratas P80 se expresan sólo GFAP, ALB y ACT. Contrario a lo esperado MPZ y MBP también se expresan en el hígado. En el hígado de ratas P80 la expresión de AFP es de muy baja intensidad comparada con los estadios P0 y P7. En las ratas P540 se encontró una expresión

similar a la de P0 y P7 con la diferencia de que la banda para AFP es de menor intensidad que en los estadios tempranos P0 y P7 (Fig. 26). En el nervio ciático se expresan los genes MPZ, MBP, NFM, NFL, GFAP y ACT en todos los estadios estudiados (Fig. 26); la intensidad de la banda de amplificación para el gen de NFM disminuye en el estadio P80 y P540, con respecto a los estadios anteriores. También se observa un incremento en la intensidad de la señal en el caso del gen GFAP del estadio P0 al P80. En el nervio ciático no se aprecia expresión de AFP en todas las etapas estudiadas.



**Figura 26.** Expresión de los 8 genes previamente mapeados con respecto a la MN en hígado y nervio ciático, monitoreados mediante RT-PCR. (P0) ratas recién nacidas, (P7) de 7 días postnatales, (P80) adultas, y (P540) viejas. (NFM) Neurofilamento medio, (NFL) neurofilamento ligero, (MBP) proteína básica de mielina, (GFAP) proteína ácida glial fibrillar, (MPZ) proteína cero de mielina, (ACT) actina, (ALB) albúmina y (AFP)  $\alpha$ -fetoproteína. (+) Control positivo con RNA tejido específico, (-) control negativo sin RNA.

Los resultados de la expresión de los ocho genes mapeados en los tres tejidos diferentes se resume en la Tabla 11. Al analizar los resultados de la expresión en corteza cerebral y relacionarlos con los resultados del mapeo posicional nos damos cuenta de que no existe ninguna relación entre la posición de las secuencias génicas con respecto a la MN y su estatus transcripcional, ya que las secuencias se expresan de manera independiente a su posición con respecto a la MN, lo cual coincide con reportes anteriores (Maya-Mendoza et al., 2004). Por

ejemplo: el gen de albúmina no se expresa en corteza cerebral de P0, pero sí se expresa en P7, P80 y P540. Sin embargo, dicha secuencia se encuentra en la misma posición (muy cercana o embebida en la MN) en P0, P7 y P80 y se aleja de la MN en P540. El gen de  $\alpha$ -fetoproteína no se expresa en ninguno de los estadios estudiados en corteza cerebral de rata y sin embargo se encuentra en una posición muy cercana con respecto a la MN en los estadios P0, P7 y P80 (ver Tabla 11 y Fig. 25). GFAP se expresa en todos los estadios estudiados y se encuentra relativamente alejada de la MN, mientras que actina, que es un gen constitutivo, está cercano a la MN en P0, P7 y P80 pero se aleja en P540.

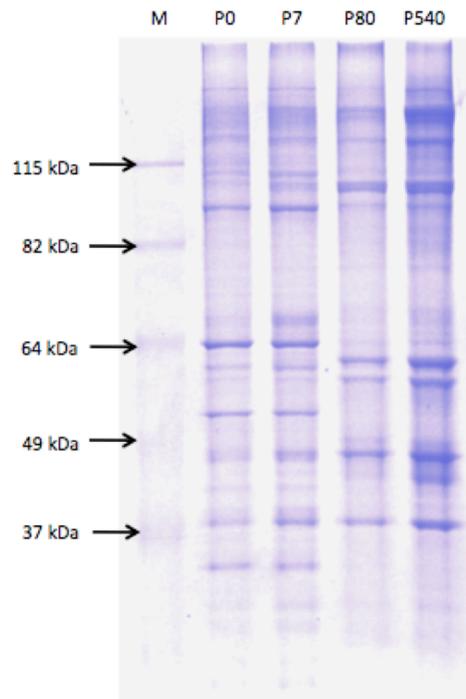
Gen	Corteza cerebral				Hígado				Nervio Ciático			
	P0	P7	P80	P540	P0	P7	P80	P540	P0	P7	P80	P540
NFM	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
NFL	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
MBP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GFAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MPZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ACT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALB	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AFP	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-

**Tabla 11.** Expresión de los ocho genes mapeados en los diferentes estadios del desarrollo postnatal estudiados en corteza cerebral, hígado y nervio ciático. (P0) ratas recién nacidas, (P7) de 7 días postnatales, (P80) adultas, y (P540) viejas. (NFM) Neurofilamento medio, (NFL) neurofilamento ligero, (MBP) proteína básica de mielina, (GFAP) proteína ácida glial fibrillar, (MPZ) proteína cero de mielina, (ACT) actina, (ALB) albúmina y (AFP)  $\alpha$ -fetoproteína. (+) Genes que se expresan, (-) genes que no se expresan.

#### 6.14 Perfil proteico de la MN durante el desarrollo postnatal de las neuronas.

Con el propósito de establecer si existen cambios en la composición proteica de la MN durante el desarrollo y envejecimiento natural de las neuronas, se aislaron proteínas de MN a partir de nucleoides de neuronas de corteza cerebral de ratas P0, P7, P80 y P540 sometidos a digestión exhaustiva con DNasa I. Dichas proteínas fueron sometidas a electroforesis SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie para obtener los perfiles proteicos que se muestran en la Fig. 27. Aquí se

puede apreciar que existen grandes cambios tanto cualitativos como cuantitativos en la composición proteica de la MN, aunque los perfiles proteicos son muy semejantes entre P0 y P7 y entre P80 y P540, por lo que los cambios cualitativos más relevantes se llevan a cabo de P7 a P80 (Fig. 27), que es justamente el intervalo de tiempo en el cual las neuronas alcanzan la diferenciación terminal (Blue y Parnavelas, 1983a, 1982b; Cohen-Cory, 2002). Cambios importantes se observan en la zona de corrimiento correspondiente a las láminas nucleares A, B y C (69, 66 y 62 kDa), ya que se aprecia una drástica disminución en la cantidad de una proteína alrededor de los 64 kDa en los estadios P80 y P540. Asimismo se observa la presencia de una proteína en el estadio P80 y P540 alrededor de los 62kDa que no se observa en P0 y P7. Por el contrario, arriba de los 49kDa y abajo de los 37kDa se observan unas bandas en P0 y P7, que desaparecen en P80 y P540. También se observa la disminución en la intensidad de una banda de P7 a P80 en la región de corrimiento entre los 82 y 115 kDa.



**Figura 27:** Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE de las proteínas de MN de neuronas en diferentes edades postnatales. Se cargaron 15µg de proteínas de MN de ratas P0, P7, P80 y P540. Nótese los cambios tanto cuantitativos como cualitativos en la composición proteica de la MN entre P0-P7 y P80-P540. (P0) ratas recién nacidas, (P7) de 7 días postnatales, (P80) adultas, y (P540) viejas. (M) Marcador de peso molecular.

## 7.0 DISCUSIÓN.

El primer paso en la realización de este trabajo de investigación consistió en establecer la cantidad de contaminación glial presente en los núcleos aislados a partir de corteza cerebral de ratas en los distintos estadios del desarrollo postnatal (P0, P7, P80 y P540), ya que era necesario tener un porcentaje mayor al 85% de núcleos neuronales para obtener resultados confiables, dado que la cantidad de células gliales presentes en el SNC de un organismo adulto es mayor que el número de neuronas (Brodal, 1992). Hasta hace algunos años, la diferenciación entre núcleos neuronales y núcleos gliales obtenidos a partir de métodos basados en gradientes de sacarosa se hacía mediante el análisis de sus características morfológicas, tomando en cuenta el tamaño y la forma de los núcleos, además de la cantidad de nucleolos que posee cada uno de ellos (Lovtrup-Rein y McEwen, 1966; Thompson, 1973). Los núcleos neuronales así como los astrocíticos son redondos, de aproximadamente el mismo tamaño, pero se distinguen por la cantidad de nucleolos presentes, ya que los núcleos neuronales tienen un prominente y único nucleolo, en contraste con el núcleo de los astrocitos que pueden tener dos o más nucleolos. Los núcleos de los oligodendrocitos son de forma oval y de menor tamaño con respecto a los núcleos neuronales (Lovtrup-Rein y McEwen, 1966). Sin embargo, se sabe que la cantidad de nucleolos varía con la edad, dado que en las neuronas de organismos en estadios postnatales tempranos los núcleos llegan a presentar más de un aparato nucleolar (Buschmann y La Velle, 1981). Thompson (1973) utilizó cerebros de conejo adulto y desarrolló un método para aislar núcleos en donde obtuvo dos poblaciones nucleares, que denominó N1 y N2. Bajo criterios morfológicos N1 está compuesta en su mayoría por núcleos neuronales y N2 por núcleos gliales.

Sin embargo, para tener una forma más precisa de determinar la cantidad de núcleos neuronales, en este trabajo se utilizó el anticuerpo que reconoce a la proteína NeuN, la cual se expresa de manera específica en los núcleos de las neuronas desde estadios embrionarios tempranos (Mullen, et al., 1992). El anticuerpo contra NeuN se ha utilizado ampliamente como un marcador específico de núcleos neuronales. Recientemente se identificó como el producto del gen Fox-3 (Kim et al., 2009), que funciona como un regulador del procesamiento alternativo (splicing) y es un componente intrínseco de la MN en neuronas de corteza cerebral de rata, siendo un marcador específico de “speckles” en neuronas (Dent et al., 2010).

Los resultados mostraron que la contaminación glial en las poblaciones neuronales oscila entre el 18-22% en N1 y 19-27% en N2. Los resultados obtenidos en la población N1 coinciden con lo

reportado por Thompson (1973), en donde se reporta que en N1 la contaminación cruzada con glía es de  $22\% \pm 5$ ; pero nuestros resultados difieren en la población N2 en donde Thompson (1973) reporta un enriquecimiento de núcleos gliales mayor al 92%, mientras que la población N2 en este trabajo también está enriquecida en núcleos neuronales (73-81%). Esto puede deberse a que Thompson sólo utilizó criterios morfológicos para diferenciar los núcleos gliales de los neuronales mientras que en el presente trabajo se utilizó un marcador específico de núcleos neuronales (NeuN).

Dado que los nucleoides son la materia prima de este trabajo, se realizó el conteo diferencial entre nucleoides neuronales y gliales. Los resultados muestran una reducción en la cantidad de contaminación glial en todas las poblaciones y en todos los estadios estudiados, siendo la población neuronal mayor al 90%. Esto significa que los núcleos gliales no resisten las condiciones de lisis empleadas para el aislamiento de los nucleoides. Por lo tanto, se omitió la separación de las poblaciones N1 y N2 dado que la población de nucleoides utilizada es mayoritariamente neuronal (>90%) y por lo tanto la contaminación glial no es significativa en nuestros experimentos.

Las interacciones DNA-MN en los nucleoides neuronales son muy estables en todos los estadios postnatales estudiados, ya que la exposición de los nucleoides al EtBr produce un halo pequeño y homogéneo alrededor de la MN, la cual no es afectada por las fuerzas de tracción centrífuga causadas por el desenrollamiento de los bucles de DNA. Estos datos sugieren que la MN de las neuronas es estable y madura desde estadios postnatales tempranos (Fig. 14). Esto difiere de lo observado en nucleoides de hepatocitos de rata, donde se ha mostrado que las interacciones DNA-MN son muy frágiles en los nucleoides de los hepatocitos P0 y P7, dado que la exposición a altas concentraciones de EtBr origina la liberación completa del DNA y la destrucción o fractura severa de la MN. Mientras que en nucleoides de hepatocitos de ratas P80 y P540 la exposición de los nucleoides a la misma concentración de EtBr produce un halo extenso, simétricamente organizado alrededor de la MN, la cual no es afectada por las fuerzas de tracción centrífuga causadas por el desenrollamiento de los bucles de DNA (Maya-Mendoza et al., 2005).

También se midió el diámetro de los núcleos y la MN y el radio del halo de DNA que se forma en los nucleoides después de la máxima expansión causada por el EtBr en neuronas P0, P7, P80 y P540. Los resultados muestran un aumento significativo en el diámetro de los núcleos de P0 a P7 pero no desde P7 hasta P540 (Tabla 4), lo cual indica que el crecimiento celular en las neuronas

no termina con el establecimiento del estado postmitótico (anterior a P0) sino continúa por más tiempo, probablemente hasta que las neuronas alcanzan la diferenciación terminal (alrededor de la cuarta semana postnatal) (Blue y Parnavelas, 1983a, 1983b). Asimismo, no existen cambios significativos en el tamaño del núcleo relacionados con el envejecimiento natural (Tabla 4).

Estudios en diferentes áreas citoarquitectónicas del cerebro de rata durante distintas edades postnatales han revelado que durante el envejecimiento existe una disminución moderada, pero significativa en el área del soma y del núcleo de las neuronas principalmente en las capas II-IV de la corteza cerebral (Peinado et al., 1997). Este y otros estudios han afirmado que el envejecimiento produce atrofia neuronal que cursa con disminución en el tamaño del soma, núcleo y nucleolos, así como degeneración de dendritas y axones (Terry et al., 1987; Vincent et al., 1989; Finch, 1993; Peters et al., 1994). Sin embargo, nuestros resultados muestran que no existe una disminución significativa en el tamaño del núcleo de las neuronas de corteza cerebral de rata durante el envejecimiento, y que existe un aumento en el tamaño del núcleo neuronal durante la primera semana postnatal que se correlaciona con el inicio del desarrollo de los procesos axonales (Blue y Parnavelas, 1983a, b).

Por otro lado, el tamaño promedio de la MN en las neuronas no muestra ningún cambio significativo desde P0 hasta P540. En las neuronas P7 y P540 la MN es significativamente más grande que en hepatocitos P540. Sin embargo, es importante hacer notar que en todos los estadios postnatales estudiados cuando se remueve la envoltura nuclear por medio de lisis, la MN correspondiente es significativamente de mayor tamaño que el núcleo original. A diferencia de los hepatocitos en los cuales la MN conserva el tamaño del núcleo. Esto sugiere que la MN de las neuronas es resiliente o contráctil, esta propiedad no cambia durante el desarrollo del animal y se conserva sin cambios durante el envejecimiento. Esta propiedad de la MN ha sido reportada anteriormente para el caso de los eucariotes inferiores (Wunderlich y Herlan, 1977) y en este caso es probable que dicha resiliencia esté relacionada con la gran estabilidad que presenta la MN de las neuronas desde estadios postnatales tempranos.

Dado que el halo de DNA en las neuronas es muy estable desde estadios postnatales tempranos, se midieron las dimensiones del halo en todos los estadios postnatales estudiados (ver sección 6.3). El análisis estadístico de estos datos sugiere que existe una disminución significativa en el tamaño del halo de DNA entre P0 y P7, seguido de un aumento significativo entre P7 y P80 pero no se observa ningún cambio de P80 a P540 (Fig. 15 y Tabla 4). Aunque en las neuronas los

cambios en el tamaño promedio del halo de DNA son sutiles durante las primeras semanas de vida postnatal, es posible que dichos cambios puedan estar relacionados con el proceso de diferenciación terminal que ocurre durante esta etapa del desarrollo. Sin embargo, no se observan cambios a partir del estadio P80, ésto se correlaciona con el hecho de que en los estadios P80 y P540 las neuronas ya se encuentran totalmente diferenciadas. Por lo tanto, no existen cambios significativos en el tamaño del halo de DNA relacionados con el envejecimiento.

Se ha propuesto que el tamaño promedio del halo de DNA tiene una relación estrecha con el tamaño promedio del bucle de DNA (Pienta y Coffey, 1984; Jackson, et al., 1990; Razin et al., 1995). Al calcular el tamaño promedio del bucle de DNA en las neuronas se observa que éste es muy pequeño en P0, P7, P80 y P540 y equivale a 42, 36, 44 y 40.6 kpb respectivamente para el bucle completo de DNA. Al comparar el tamaño promedio del bucle de DNA entre las neuronas se aprecia que en P0 es 14% más pequeño que en P7, los bucles de P7 son 18% más pequeños que los de P80, mientras que los bucles de P540 son 8% más cortos que los de P80, sin embargo esta última diferencia no es estadísticamente significativa por lo que no se puede decir que existan cambios en el tamaño del bucle de DNA entre P80 y P540. Esto sugiere que interacciones muy estables DNA-MN y un tamaño reducido en los bucles de DNA son características presentes tanto en las células postmitóticas tempranas (neuronas inmaduras), como en las células completamente diferenciadas (neuronas maduras). En los hepatocitos de rata el tamaño promedio del bucle completo de DNA es de 97.8 kpb y 62.0 kpb en P80 y P540 respectivamente (Maya-Mendoza et al., 2005). Al comparar estos datos con los obtenidos en neuronas se observa que el tamaño promedio del bucle de DNA en neuronas de ratas P80 es 63.2% más pequeño que en hepatocitos de la misma edad y en P540 es 64.5% más pequeño que su contraparte en hepatocitos.

El tamaño del genoma haploide de la rata se ha estimado en 2.75 Gpb (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004). Se ha estimado que existen en promedio 1 MAR por cada 30,000 pb de DNA en el genoma de mamífero (Boulikas, 1995; Hakes y Berezney, 1991), por lo tanto, en promedio debe haber aproximadamente 180,000 MARs en el genoma diploide de la rata si todos los MARs estuvieran anclados a la MN. De acuerdo al tamaño promedio del bucle de DNA obtenido en las neuronas en los diferentes estadios postnatales y la cantidad de MARs estimada para el genoma de mamífero se estableció que la cantidad de MARs anclados a la MN en las neuronas es de 135,000 aproximadamente similar al número teórico de posibles bucles de DNA, por lo tanto la mayoría de los MARs potenciales en las neuronas se encuentran probablemente unidos a la MN formando LARs. Contrario a lo reportado para hepatocitos de ratas P540, en

donde se ha estimado que existen aproximadamente 16 bucles en 1Mpb de DNA, lo cual es compatible con un total de 92,000 bucles de DNA en el genoma diploide, que corresponde aproximadamente a la mitad de los MARs potenciales presentes en el genoma (Maya-Mendoza et al., 2005). Por lo tanto, el establecimiento del estado postmitótico se correlaciona con modificaciones en el OSODNA que resulta en el aumento significativo de la cantidad de MARs anclados a la MN, generando una mayor cantidad de bucles de DNA aunque de menor tamaño.

Al evaluar la sensibilidad de los nucleoides neuronales a diferentes concentraciones de DNasa I en las distintas etapas postnatales, se observó que dichos nucleoides digeridos con 0.5U/ml de DNasa I presentan gran resistencia al corte por la enzima, ya que después de 60 min de digestión no fue posible digerir más del 40% del DNA de los bucles en P7, P80 y P540 (Fig. 17). Los nucleoides neuronales de ratas P0 presenta un comportamiento diferente ya que con ésta cantidad de DNasa I (0.5U/ml) fue posible digerir más del 80% del DNA de los bucle. Al comparar este comportamiento con el de hepatocitos de la misma edad se observa que en los hepatocitos P0 a los 20 min de digestión se ha cortado el 95% del DNA y se digiere hasta el 30 % en P7 y P80 y hasta el 50% en P540 (Maya-Mendoza, et al., 2005). Al aumentar la cantidad de enzima a 0.92U/ml, se obtuvieron cinéticas más rápidas donde después de 60 min de digestión se corta entre el 80 y 90% del DNA de los bucles en los nucleoides de las neuronas de todas las edades. Por lo tanto, el DNA de los nucleoides neuronales es en general más resistentes al corte por la DNasa I que el correspondiente a hepatocitos en edades equivalentes. La gran resistencia al corte por la DNasa I en el DNA de los nucleoides neuronales nos indica la presencia de un mayor grado de hiperenrollamiento en los bucles de estas células y se correlaciona con el tamaño de los bucles, ya que a menor tamaño del bucle, mayor hiperenrollamiento (Calladine et al., 2004). Los bucles son más pequeños y homogéneos y una gran cantidad del DNA correspondiente a estos bucles se encuentra más cerca de la MN. Esto genera un mayor impedimento estérico que le impide a la DNasa I realizar el corte.

Los hepatocitos de mamífero adulto son células que raramente se dividen, pues se encuentran arrestadas en G0. Sin embargo, durante una hepatectomía parcial al menos 97% de los hepatocitos residuales entran al ciclo celular de manera sincronizada para regenerar el hígado y posteriormente regresan al estado quiescente (Sigal et al., 1995; 1999). En los animales viejos, el porcentaje de hepatocitos residuales capaces de re-entrar al ciclo celular después de una hepatectomía parcial se encuentra reducido significativamente (Michalopoulos y De France, 1997), por lo tanto existe una reducción progresiva en el potencial proliferante de los hepatocitos

en función de la edad. Por otro lado, durante el envejecimiento de los hepatocitos, las interacciones DNA-MN se estabilizan y el tamaño promedio del halo de DNA se reduce significativamente, este hecho se ha correlacionado con la tendencia de estas células hacia la diferenciación terminal y la pérdida de su potencial proliferante. (Maya-Mendoza et al., 2005).

Los datos obtenidos hasta el momento en las neuronas como la gran estabilidad de las interacciones DNA-MN, el pequeño tamaño del halo de DNA y la gran resistencia a la digestión con DNasa I desde estadios postnatales tempranos sugiere que el DNA de las neuronas presenta un arreglo similar al de los hepatocitos senescentes. Al realizar la comparación directa entre neuronas P7 y P540 y hepatocitos P540, se encontró que las interacciones DNA-MN son muy estables en los nucleoides de las neuronas P7 y P540 ya que estos no sufren rupturas por las fuerzas liberadas durante la inducción de la formación del halo de DNA mediante EtBr (Fig. 18), que es similar a lo observado en hepatocitos P540, en contraste con el comportamiento de los nucleoides de hepatocitos P0 y P7 los cuales se destruyen por el tratamiento con EtBr (Maya-Mendoza et al., 2005).

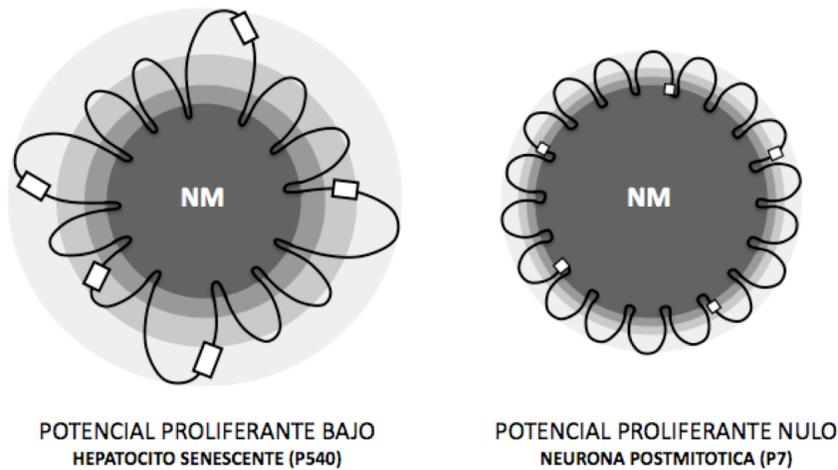
Es interesante resaltar que en los hepatocitos se observa un aumento gradual del tamaño del núcleo que toma desde el nacimiento hasta la vejez para llevarse a cabo (Maya-Mendoza et al., 2005), lo cual se ha correlacionado con la pérdida de deformabilidad nuclear que ocurre conforme la célula se acerca hacia la diferenciación terminal (Pajeroski et al., 2007) y con la reducción en el potencial proliferante que sufren los hepatocitos con la edad (Michaelopoulos y De Frances, 1997). Asimismo, el aumento en el volumen nuclear de los hepatocitos P540 se ha relacionado directamente con un incremento en la poliploidía celular (Jack et al., 1990), lo cual se encuentra ligado estrechamente con el cese de la actividad mitótica, la diferenciación terminal y la senescencia celular (Sigal et al., 1995; Gandillet et al., 2003). Sin embargo, el incremento en el volumen nuclear también ocurre en hepatocitos diploides envejecidos, indicando que las poliploidías como tales no son la causa del crecimiento nuclear (Maya-Mendoza et al., 2005). De hecho, existe una tendencia general hacia un volumen nuclear más grande y un incremento en la redondez del mismo con la edad, que se ha observado también en otros tipos celulares que no sufren poliploidías con la edad, como los fibroblastos (Angello et al., 1987; Pienta et al., 1992; Macieira-Coelho, 1995). En neuronas hay evidencia disponible que muestra la existencia de neuronas poliploides (Curreis et al., 2009; Zekanowski y Wojda, 2009). Sin embargo, la cantidad de éstas no aumenta con el envejecimiento natural (Zekanowski y Wojda, 2009; Zhu et al., 2008). El tamaño del núcleo en las neuronas sólo sufre un aumento significativo durante la primer

semana postnatal (P0-P7, Tabla 4). Por lo tanto, es poco probable que las poliploidías estén relacionadas de alguna manera con el tamaño del núcleo neuronal presente desde estadios postnatales tempranos y más bien apoya la idea de que el aumento en el tamaño del núcleo celular está relacionado con la pérdida del potencial proliferante y la tendencia de las células hacia la diferenciación terminal, ya que las neuronas son postmitóticas desde estadios embrionarios tempranos. Por otro lado, el tamaño promedio del núcleo en las neuronas aunque es significativamente más pequeño que el de los hepatocitos senescentes (Fig. 15 y Tabla 4) también es significativamente más grande que el de los hepatocitos P0, P7 y P80.

Por otro lado, el tamaño promedio del halo de DNA es significativamente más corto en las neuronas P7 y P540 comparado con el halo de DNA en los hepatocitos P540 (acortamiento aproximado del 50% Fig. 19), por lo tanto, el tamaño promedio del bucle es también significativamente más corto en las neuronas (P7 y P540) que en los hepatocitos (P540), estos datos sugieren que en las neuronas existe una mayor cantidad de bucles anclados a la MN, los cuales en promedio serían de la mitad de tamaño que los bucles en hepatocitos senescentes. En las neuronas de ratas P7 el tamaño promedio del bucle de DNA fue estimado en 36kpb (Tabla 5), lo que es compatible con 27 bucles de DNA/Mb y por lo tanto con 153,000 bucles de DNA por núcleo neuronal. En contraparte, en hepatocitos de ratas P540 el tamaño promedio del bucle se ha estimado en aproximadamente 60kpb (Maya-Mendoza et al., 2005), lo cual es compatible con 16 bucles de DNA/Mb y por lo tanto aproximadamente 92,000 bucles por genoma diploide. Esto sugiere que en las neuronas postnatales tempranas la mayoría de los MARs potenciales se encuentran actualmente unidos a la MN formando LARs (Fig. 28).

Los bucles de DNA en los nucleoides de las neuronas P7 son muy resistentes a la acción de la DNasa I (0.5 y 0.92U/ml) de manera similar a los hepatocitos P540 (Fig. 20). Sin embargo, las neuronas P540 presentan mayor resistencia al corte por la DNasa I (0.92U/ml, Fig. 20F), sugiriendo que en las neuronas P540 existe una mayor cantidad de DNA profundamente embebido dentro de la MN y es probable que una mayor cantidad de éste DNA interactúe directamente con la MN. El mapeo posicional de secuencias específicas mostró que la mayoría de ellas se encuentran ubicadas en la región muy cercana o embebida en la MN en las neuronas P7, mientras que las mismas secuencias en los hepatocitos P540 se localizan entre las zonas proximal y distal con respecto a la MN (Tabla 8), lo cual sugiere que el OSODNA dentro del núcleo neuronal es diferente al de los hepatocitos senescentes.

Como se mencionó anteriormente, en las ratas senescentes menos del 75% de los hepatocitos remanentes después de una hepatectomía parcial son capaces de entrar al ciclo celular durante la regeneración hepática (Michalopoulos y De Frances, 1997), por lo que al menos 20% de la población de hepatocitos quiescentes ha perdido su capacidad proliferante con la edad (hepatocitos postmitóticos). Sin embargo, estos hepatocitos pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo de manera similar a las neuronas postmitóticas. En este trabajo se ha observado que las neuronas postmitóticas tempranas (P7) presentan un bucle de DNA muy pequeño, el cual es altamente resistente a la DNasa I por encontrarse embebido en la MN, sugiriendo que la mayoría de los MARs potenciales se encuentran formando LARs en la MN. El hecho de que cantidades similares de DNA total se encuentren embebidas dentro de la MN en las neuronas P7 y los hepatocitos P540 (Fig. 20B y D) y que todas las secuencias génicas mapeadas se encuentren muy cercanas a la MN en los nucleoides de las neuronas P7 tratadas con una concentración más alta de DNasa I (Tabla 8), mientras que las mismas secuencias mapean en posición distal a la MN en nucleoides de hepatocitos de ratas P540, puede ser una evidencia de que una mayor proporción de ese DNA embebido dentro de la MN no se encuentre sólo embebido, sino que pueda estar formando LARs en la MN de las neuronas (Fig. 28). En los hepatocitos quiescentes existe una tendencia hacia la actualización de los MARs potenciales como LARs en función de la edad (Maya-Mendoza et al., 2005), este hecho sugiere que la mayoría de los MARs potenciales podrían eventualmente unirse a la MN en los hepatocitos si las ratas pudieran vivir el tiempo suficiente. Sin embargo, se ha especulado que la fracción de los hepatocitos viejos que es incapaz de proliferar es aquella en la cual las interacciones potenciales DNA-MN se han actualizado de manera estocástica más allá de un valor crítico, permitiendo un OSODNA al interior del núcleo similar, aunque no igual al observado en las neuronas postmitóticas tempranas (Fig. 28), pero hasta el momento no existe una metodología confiable para poder aislar estos “*hepatocitos postmitóticos*” del resto de la población de hepatocitos quiescentes presentes en el hígado de las ratas viejas.



**Figura 28:** Modelo que representa el orden superior de organización del DNA al interior del núcleo que resulta de las interacciones promedio entre el DNA y la MN en nucleoides de hepatocitos de ratas P540 y neuronas P7. Las zonas topológicas relativas a la MN están representadas por sombreado en diferentes tonos de gris, en donde el gris más oscuro corresponde a la MN (nótese el tamaño comparativamente más grande de la MN además del tamaño reducido del bucle de DNA en las neuronas P7). Los cuadros blancos representan a las secuencias blanco correspondientes a genes dentro de los bucles. Nótese que los bucles de DNA en los nucleoides de neuronas P7 son más pequeños, más numerosos y homogéneos en tamaño cuando se comparan con los de los hepatocitos P540, los cuales aún presentan heterogeneidad en el tamaño. Por lo tanto, la cantidad relativa de DNA que se encuentra interactuando con la MN en forma de LARs es significativamente mayor en los nucleoides de las neuronas P7 (postmitóticas) que en los hepatocitos P540 (células con bajo potencial proliferante).

En conclusión, las células postmitóticas y las células senescentes comparten ciertas características estructurales, como la gran estabilidad de sus interacciones DNA-MN, la disminución en el tamaño del bucle de DNA y la resistencia al corte por la DNasa I. Sin embargo la posición de diferentes secuencias génicas específicas es fundamentalmente diferente entre estos dos tipos de células, dado que en las neuronas P7 las secuencias génicas estudiadas se encuentran en una posición cercana con respecto a la MN, mientras que en los hepatocitos P540 estas mismas secuencias se encuentran alejadas de la MN. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que las neuronas P7 aunque son postmitóticas aún no están completamente diferenciadas y tienen la capacidad de sobrevivir por largos periodos de tiempo.

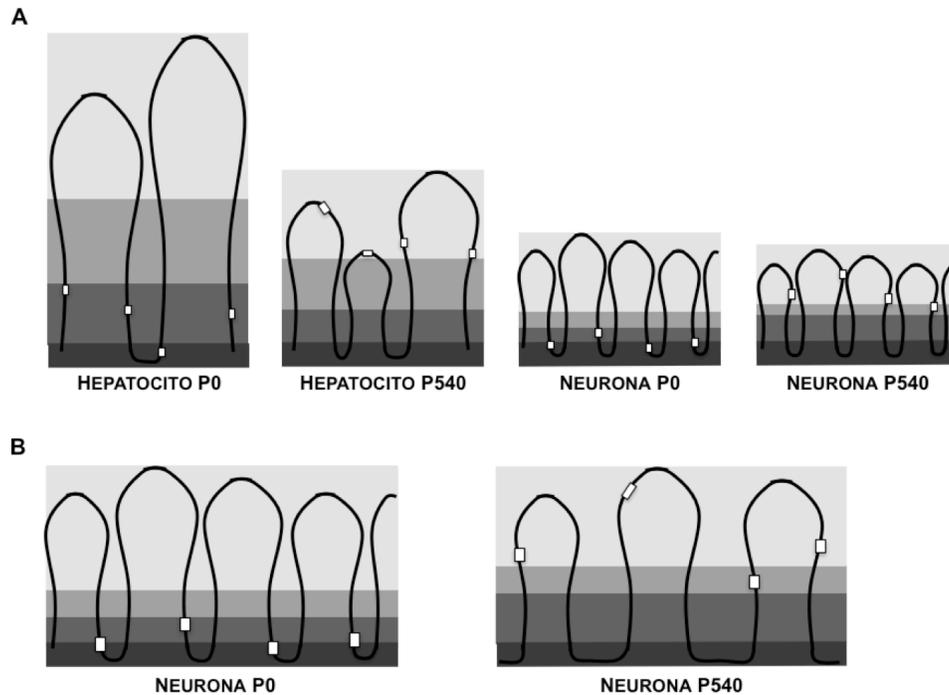
Con el fin de establecer si existen cambios en el OSODNA de las neuronas relacionado con la diferenciación terminal y el envejecimiento natural, se realizó el mapeo posicional de diferentes secuencias génicas en los distintos estadios del desarrollo postnatal. Los resultados mostraron que en las neuronas P0, P7 y P80 los genes de NFM, NFL, MBP, MPZ5', ACT, ALB y AFP se encuentran en una posición muy cercana o embebida en la MN, mientras que GFAP y la región 3' de MPZ están fluctuando entre las posiciones muy cercana, proximal y distal con respecto a la MN en estos estadios del desarrollo (Tabla 10). En contraparte, en las neuronas P540 todas las secuencias estudiadas presentan un marcado alejamiento con respecto a la MN ubicándose entre las zonas proximal y distal. Estos resultados son similares a lo observado en hepatocitos, donde también se aprecia un alejamiento progresivo de los genes con respecto a la MN en función de la edad, lo cual se ha correlacionado con la pérdida de su capacidad proliferante y la tendencia hacia la diferenciación terminal (Maya-Mendoza et al., 2005); pero en el caso de las neuronas el alejamiento no es gradual y se observa de P80 a P540.

Estos resultados sugieren que el OSODNA en las neuronas sufre cambios importantes durante el envejecimiento, ya que las secuencias génicas que entre P0 y P80 se encontraban en posiciones muy cercanas con respecto a la MN y posteriormente se alejan de ésta cuando el animal envejece (P540). Sin embargo, este cambio no puede estar relacionado con la pérdida del potencial proliferante, dado que las neuronas son células postmitóticas desde estadios embrionarios y tampoco está asociado con la diferenciación terminal, dado que las neuronas alcanzan su diferenciación terminal alrededor de la cuarta semana postnatal (Blue y Parnavelas, 1983a y b).

Se ha sugerido que la proliferación a largo plazo en las células normales depende de su capacidad para reorganizar el genoma, dado que con cada división celular se acumulan cambios tanto cualitativos como cuantitativos en la cromatina limitando su potencial para futuros rearrreglos (Macieira-Coelho y Puvion-Dutilleul, 1985). Por lo que un núcleo celular muy estable como el que se observa en las neuronas es poco probable que sea la base para las transiciones dinámicas necesarias para la mitosis, el rearrreglo de los territorios cromosómicos y los dominios de cromatina que ocurren durante la fase G1 temprana (Thomson et al, 2004), por lo tanto es posible que bajo tales condiciones, el costo energético para la activación de la mitosis sea demasiado alto (Aranda-Anzaldo, 2009). Desde un punto de vista estructural, la organización estructural del DNA basada en el uso selectivo de un grupo limitado de MARs potenciales, como el que se observa en los núcleos de los hepatocitos P0 y P7 (Maya-Mendoza et al, 2005) es altamente asimétrico y la tendencia natural de los sistemas físicos es hacia la reducción de las asimetrías, de

tal forma que los sistemas se vuelven cada vez más simétricos conforme pasa el tiempo (Whyte, 1949; Thom, 1989; Saunders, 1995). Una configuración estructural en la cual la mayoría de los MARs potenciales se encuentran realmente unidos a la MN, genera bucles de DNA más cortos y más estables los cuales constituirían un atractor estructural altamente simétrico. Por otra parte, una distribución bastante uniforme de bucles de DNA cortos anclados a la MN satisface la segunda ley de la termodinámica, ya que el estrés estructural a lo largo de la molécula de DNA se dispersa de manera más uniforme dentro del volumen nuclear incrementando el número de interacciones estables DNA-MN. Sin embargo, un sistema físico altamente estable es resistente a los cambios y por lo tanto su potencial dinámico es muy reducido, lo cual podría explicar la incapacidad de las neuronas para entrar al ciclo celular (Aranda-Anzaldo, 2009).

El rearrreglo del DNA observado durante el envejecimiento natural de las neuronas correlaciona con el hecho de que las cinéticas de digestión en las ratas P540 son más lentas y se obtiene un mayor porcentaje de DNA anclado a la MN. Esto puede explicarse de dos formas: 1) Con base en una mayor homogeneidad en el tamaño de los bucles de DNA, si tomamos en cuenta que en los hepatocitos P0 los bucles de DNA son muy grandes y heterogéneos y que éstos tienden a homogenizar su tamaño conforme las células pierden su capacidad proliferante (Maya-Mendoza et al., 2005), de tal forma que al llegar al estado postmitótico semejante al de las neuronas P0, los bucles de DNA son más simétricos, estables y resistentes al cambio. Sin embargo, el OSODNA constituye un sistema estructural que sigue evolucionando en el tiempo en función de limitantes termodinámicas (Aranda-Anzaldo, 2009), hasta formar un sistema cada vez más homogéneo (simétrico) que se ve reflejado en la mayor estabilidad de las interacciones DNA-MN y en la reducción y homogenización del tamaño promedio del halo de DNA (Fig. 29A). 2) Con base en la presencia de una mayor cantidad de DNA unido a la MN, haciendo más extensos los anclajes ya existentes que forman LARs sobre la MN (Fig. 29B). Sin embargo, técnicamente es difícil evaluar de manera confiable cambios en el tamaño de los LARs actuales, dado que la MN debe ser destruida para poder liberar el DNA unido a ella y este proceso resulta en la erosión o ruptura de los fragmentos originales correspondientes a los LARs.



**Figura 29:** Modelo que representa el orden superior de organización del DNA al interior del núcleo que resulta de la homogenización en el tamaño promedio de los bucles de DNA. (A) En las células con alto potencial proliferante (hepatocitos P0) los bucles de DNA son muy grandes y heterogéneos en tamaño con las secuencias génicas ubicadas muy cerca de la MN, conforme avanza la edad, las células pierden su potencial proliferante (hepatocitos P540) el tamaño promedio del bucle de DNA se reduce, los bucles se vuelven más homogéneos y las secuencias génicas se ubican hacia las regiones distales del bucle. En el estado postmitótico (neurona P0) el tamaño promedio del bucle disminuye a la mitad aproximadamente del observado en hepatocitos P540. Sin embargo aún es posible observar heterogeneidad en el tamaño promedio del bucle, la cual se reduce progresivamente con la edad (neurona P540) formando un sistema mucho más simétrico y homogéneo, en el cual las secuencias génicas ahora se ubican en las regiones proximal y distal con respecto a la MN. (B) También es posible que el rearrreglo del orden superior de organización del DNA observado en las neuronas P540 se deba a una mayor cantidad de DNA directamente unido a la MN formando LARs de mayor extensión que en P0. Las zonas topológicas relativas a la MN están representadas por sombreado en diferentes tonos de gris, el gris más oscuro corresponde a la MN. Los cuadros blancos representan secuencias blanco correspondientes a genes dentro de los bucles. En las neuronas P0 todas las secuencias génicas se ubican muy cerca de la MN, a diferencia de las neuronas P540 en donde el DNA sufre rearrreglos y los genes se posicionan en la zona distal con respecto a la MN. Nótese que los bucles de DNA

en los nucleoides de neuronas P540 son de menor tamaño que en las neuronas P0, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa (Tabla 4).

Todos estos datos sugieren que el OSODNA en el estado postmitótico es muy estable y más simétrico. Sin embargo, en el curso del tiempo el OSODNA llega a su máximo grado de estabilidad en donde el sistema se encuentra muy homogéneo y por lo tanto casi no hay asimetrías. Estos datos son consistentes con el modelo de tensegridad propuesto para las interacciones DNA-MN en función de la edad que trata de explicar las bases físicas comunes para la senescencia replicativa estocástica y el estado postmitótico, en el cual un proceso estocástico dependiente del tiempo genera un aumento significativo en las interacciones DNA-MN que establece un complejo muy estable, en el cual las proteínas y el DNA interactúan para crear una estructura altamente estable (Aranda-Anzaldo, 2009). Aparentemente el OSODNA en las neuronas, determinada por las interacciones DNA-MN, satisface este modelo y constituye un sistema estructural integral que de manera natural pero inexorable evoluciona hacia un estado muy estable (simétrico) y que por lo tanto es muy resistente al cambio. Como hemos visto, este proceso ocurre en células con diferente origen embrionario como las neuronas derivadas de células del ectodermo y los hepatocitos que se generan de las células del endodermo, sugiriendo que este fenómeno es común para distintos tipos celulares *in vivo*.

Por otro lado, existe evidencia experimental de que los genes dentro del genoma se encuentran ubicados en regiones de la cromatina que forman bucles de DNA de menor tamaño al promedio (Rivera-Mulia et al., 2010; Rivera-Mulia et al., en preparación), por lo que es posible que las secuencias mapeadas en el presente trabajo se encuentren ubicadas en estas regiones de la cromatina y por lo tanto las observamos muy cercanas a la MN en las etapas postnatales tempranas, cuando aún existe heterogeneidad en el tamaño del bucle. Sin embargo, con la edad, al rearrreglarse el genoma y alcanzar el máximo grado de homogeneidad en el tamaño promedio del bucle de DNA, las secuencias génicas que antes observábamos muy cerca de la MN ahora las vemos en la región distal con respecto a la MN como resultado de dicho rearrreglo.

Durante la embriogénesis existen cambios en la sincronía de los eventos de algunos linajes celulares con respecto a otros, a lo que se conoce como heterocronía, por lo que distintos linajes celulares se desarrollan con índices diferentes. Los tejidos vivos son ensamblajes arquitectónicos con inherente distribución de fuerzas las cuales pueden ser informativas en la regulación del crecimiento tanto de las células como de los tejidos, a través de la modulación de la forma celular

(Aranda-Anzaldo, 1989; Wang et al., 2009). La mecanotransducción durante la morfogénesis del tejido puede inducir cambios en el estado de diferenciación de las células y estas modificaciones pueden afectar las trayectorias morfogénicas limitando el repertorio de cambios en el tamaño y la forma de las células. Por lo tanto, es posible que la heterocronía altere la distribución de probabilidad de eventos estocásticos tales como los índices de actualización de interacciones DNA-MN, de tal forma que en diferentes tejidos la estabilización de estas interacciones pueda ocurrir a diferentes ritmos. Por lo tanto, algunos tipos celulares pueden volverse postmitóticos y alcanzar la diferenciación terminal muy temprano en su vida, como en el caso de las neuronas, dependiendo de su trayectoria morfogénica, mientras que otras células pueden de manera azarosa alcanzar o no el estado posmitótico y la diferenciación terminal dentro de la vida normal del sistema (hepatocitos de rata). En cualquier caso, en este trabajo los resultados indican que las interacciones DNA-MN muy estables son una característica común entre las células postmitóticas, las células completamente diferenciadas y las células senescentes, *in vivo*.

El análisis de la posición de dos regiones distintas del gen MPZ reveló que la región 5' del gen se ubica en una posición más cercana a la MN y la región 3' del gen se encuentra más alejada de la MN en todos los estadios estudiados, lo cual es consistente con lo reportado por Maya-Mendoza y colaboradores (2003), quienes al realizar el mapeo posicional con respecto a la MN del gen  $\beta$ -actina en dos regiones diferentes, ubicadas una en la región 3' del gen y otra en la región 5' del gen, mostraron que la región 5' se encuentra más cerca de la MN que la región 3' y que esta topología relativa a la MN se mantiene durante procesos que implican el acercamiento transitorio del gen a la MN. En este trabajo se observa que, aunque los bucles de DNA en las neuronas sufren rearrreglos durante el envejecimiento, existe una organización del DNA con respecto a la MN que se mantiene sin cambios, como lo es la orientación de los genes con respecto a la subestructura proteica, pues aún cuando las secuencias se alejan de la MN ubicándose hacia las posiciones distales se mantiene una organización en la cual la región 5' se encuentra más cercana a la MN que la región 3' durante toda la vida del organismo.

El análisis de la expresión de los genes estudiados mostró que en la corteza cerebral de las ratas P0, P7, P80 y P540 se expresan los genes de MPZ, MBP, NFM, NFL, GFAP y ACT. El gen de ALB se expresa en los estadios P7, P80 y P540. Contrario a nuestras expectativas el gen MPZ se expresa en la corteza cerebral, ya que se ha reportado que MPZ es la principal proteína de mielina en el sistema nervioso periférico (SNP) y que no se expresa en SNC (Hudson, 1990). Sin embargo, la existencia del RNAm para MPZ en la corteza cerebral no necesariamente significa

que la proteína se esté traduciendo. Albúmina es la proteína plasmática más abundante, se sintetiza principalmente en el hígado por lo que representa el 25% de la síntesis de proteína hepática total. Sin embargo se ha demostrado que dicha proteína se expresa también en las células microgliales humanas tanto *in vitro* como *in vivo* (Sung-Min et al., 2008). Por lo tanto, dado que el aislamiento de RNA se hizo a partir de cerebros completos que contienen tanto neuronas como glía, la expresión de ALB en corteza cerebral es de esperarse. Los genes MBP, NFM, NFL y GFAP se han reportado en la corteza cerebral: MBP es una proteína de mielina muy importante en el SNC, los neurofilamentos son proteínas neuronales específicas y GFAP es una proteína específica de astrocitos. La expresión de ACT en todos los casos es constitutiva. De todos los genes analizados el único que no se expresa en la corteza cerebral es AFP, que a su vez nos sirvió como control negativo. Al relacionar estos resultados con el mapeo posicional con respecto a la MN se aprecia que no existe una correlación entre la posición de los genes con respecto a la MN y el estatus transcripcional, dado que todos los genes se encuentran en una posición relativamente cercana a la MN en los estadios P0, P7 y P80, y algunos genes como ALB en P0 y AFP en todos los estadios estudiados no se expresan a pesar de su cercanía a la MN. Lo mismo se ha observado en hepatocitos, en donde la expresión de los genes no correlaciona con su posición relativa con respecto a la MN (Maya-Mendoza et al., 2005)

El análisis del perfil proteico de la MN neuronal en las diferentes edades estudiadas muestra que existen diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en la composición proteica de la MN, dichas diferencias son muy evidentes entre el estadio P7 y P80 (Fig. 25), que es justo el intervalo de tiempo en el cual las neuronas llegan a la madurez. Estos datos sugieren que cambios en la composición proteica de la matriz nuclear se llevan a cabo durante la segunda y la onceava semana de vida postnatal, lo cual se correlaciona con la madurez de las neuronas y el establecimiento de la diferenciación terminal en este tipo de células (Blue y Parnavelas, 1983a, b). En contraste, en los hepatocitos el perfil proteico de la MN no mostró cambios cualitativos durante el desarrollo y envejecimiento. Sin embargo se observó un aumento progresivo en la cantidad de proteína de MN conforme el animal envejece (Ivanović-Matić, 2000; Maya-Mendoza et al., 2005).

## 8.0 CONCLUSIONES

- Las interacciones DNA-MN son muy estables en las neuronas de rata desde estadios postnatales tempranos.
- Existen cambios significativos en el tamaño promedio del núcleo entre las neuronas P0 y P7; así como también se observan cambios significativos referentes al tamaño del halo de DNA durante las primeras semanas postnatales. Sin embargo no hay cambios significativos en el tamaño promedio del núcleo ni del halo de DNA relacionados con el envejecimiento.
- El tamaño promedio del núcleo en las neuronas P7 es más pequeño que el de los hepatocitos de las ratas senescentes (P540), pero las interacciones DNA-MN son muy estables en ambas células. Por lo tanto, la estructura del orden superior de organización del DNA en las células postmitóticas tempranas (neuronas P7) es tan estable como en los hepatocitos envejecidos de manera natural (P540).
- El tamaño promedio del bucle de DNA en las neuronas es significativamente más pequeño que el observado en los hepatocitos viejos (P540), por lo que se sugiere que en las células postmitóticas la mayoría de los MARs potenciales se encuentran unidos a la MN formando LARs.
- Una estructura muy estable del orden superior de organización del DNA al interior del núcleo es una característica común entre las células postmitóticas, las células terminalmente diferenciadas y las células senescentes *in vivo*.
- Los nucleoides de las neuronas de ratas P540 presentan un mayor porcentaje de DNA profundamente embebido en la MN comparado con las neuronas de los demás estadios, por lo que algunos MARs adicionales pueden estar actualizando como LARs, o bien, el tamaño de los LARs existentes se incrementa con la edad.
- En las neuronas P0, P7 y P80 los genes blanco estudiados se encuentran posicionados en las zonas muy cercana y embebida en la MN, pero sufren un alejamiento durante el envejecimiento (P540), ubicándose en las zonas proximal y distal con respecto a la MN, sugiriendo que dicho alejamiento está relacionado directamente con el envejecimiento celular.

- La organización del DNA al interior del núcleo celular sufre cambios durante el envejecimiento de las neuronas, puestos en evidencia por el alejamiento de las secuencias blanco con respecto a la MN. Sin embargo, los genes conservan su orientación topológica con respecto a la subestructura protéica, dado que cuando las secuencias se alejan de la MN se mantiene una organización en la cual la región 5' del gen está más cerca al sitio de anclaje con la MN que la región 3' correspondiente.
- La posición de los genes con respecto a la MN no están relacionados con el estatus transcripcional de los mismos.
- La composición proteica de la MN en las neuronas sufre cambios cualitativos y cuantitativos posiblemente relacionados con la diferenciación terminal de estas células.

## **9.0 PERSPECTIVAS.**

En el presente trabajo se mostró que la organización del DNA al interior del núcleo en las células postmitóticas es muy estable desde estadios postnatales tempranos, sin embargo, dichas células se vuelven postmitóticas desde estadios embrionarios tempranos cuando dejan la zona ventricular para migrar hacia su posición final en el cerebro. Por lo tanto sería interesante estudiar la organización del DNA al interior del núcleo en progenitores neuronales, así como en neuronas postmitóticas embrionarias, con el fin de determinar si la estabilidad de las interacciones DNA-MN se correlaciona específicamente con el establecimiento del estado postmitótico.

Sería interesante establecer si los LARs en las neuronas viejas en realidad son de mayor tamaño, tal como se ha sugerido en el presente estudio, para lo cual se podrían aislar los LARs de las neuronas P80 y P540 cortando los bucles de DNA por su base y obtener sólo el DNA unido a la MN, el cual podría analizarse para medir su longitud.

Sería interesante investigar si en las neuronas postmitóticas tempranas las regiones del genoma que contienen a los genes también se encuentran formando bucles de DNA de menor tamaño al promedio, como se ha sugerido en estudios recientes.

Se ha mostrado que la composición proteica de la MN sufre cambios drásticos durante el

establecimiento de la diferenciación terminal de las neuronas, sin embargo, sería importante establecer cuáles son las proteínas que sufren estos cambios y cuál sería su relación con respecto a la estabilidad de la MN en estas células y su relación con la diferenciación terminal.

## **10.0 ANEXO**

**ALVA-MEDINA, J., DENT, M. A. R., ARANDA-ANZALDO, A. 2010.**

## Aged and post-mitotic cells share a very stable higher-order structure in the cell nucleus in vivo

Janeth Alva-Medina · Myrna A. R. Dent ·  
Armando Aranda-Anzaldo

Received: 2 March 2010 / Accepted: 13 May 2010  
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

**Abstract** In the mammalian liver the quiescent primary hepatocytes preserve a proliferating potential in vivo, yet natural aging correlates with loss of proliferating potential and progression towards terminal differentiation of the hepatocytes. Thus aged, terminally-differentiated hepatocytes may survive in a *de facto* post-mitotic state, similarly to early post-mitotic cells, like neurons, suggesting that there might be a common factor linking both cellular states. In the interphase of metazoan cells the nuclear DNA is organized in supercoiled loops anchored to a proteinaceous substructure known as the nuclear matrix (NM). The DNA-NM interactions define a higher-order structure in the cell nucleus (NHOS). Natural aging of the rat liver correlates with a progressive strengthening of the NM framework and the stabilization of the DNA-NM interactions in the hepatocytes indicating that the NHOS becomes highly stable with age. We compared the NHOS of post-mitotic rat neurons with that of aged rat hepatocytes. Our results

indicate that a very stable NHOS is a common feature of both aged and post-mitotic cells in vivo.

**Keywords** DNA loops · Hepatocytes · Neurons · Nuclear matrix · Replicative senescence · Tensegrity

### Introduction

The cells of metazoans cultured in vitro complete a limited number of cell divisions and then enter a state of growth arrest known as replicative senescence (RS). Classical studies have shown that normal human fibroblasts in culture are heterogeneous with respect to their ability to divide and to synthesize DNA and the number of cells unable to divide increases exponentially with the age of the culture (Smith and Hayflick 1974). Therefore, there is a large variation in the number of cell divisions which normal primary cells can undergo and so the mechanism that determines the finite in vitro lifespan cannot be simply the number of cell divisions (Smith and Hayflick 1974; Martin 1977). Indeed, there is strong evidence that a stochastic process is involved in establishing the finite proliferating potential of primary cells in culture (Jones et al. 1985). Adult mammalian hepatocytes are cells that rarely divide as they are largely arrested in G<sub>0</sub>. Nevertheless, in young adult rats partial hepatectomy leads to liver regeneration inducing the synchronous entry into the

---

J. Alva-Medina · M. A. R. Dent ·  
A. Aranda-Anzaldo (✉)  
Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias,  
Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado  
de México, Apartado Postal 428, C.P. 50000 Toluca,  
Estado de Mexico, Mexico  
e-mail: arandoa10@gmail.com; aaa@uaemex.mx

J. Alva-Medina · M. A. R. Dent · A. Aranda-Anzaldo  
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas,  
IFC-UNAM, Apartado Postal 70-243,  
C.P. 04510 Mexico City, DF, Mexico

cell cycle of some 97% of the residual hepatocytes, with subsequent return to quiescence of the hepatocytes after liver regeneration (Sigal et al. 1995, 1999). However, there is a progressive reduction in the proliferating potential of the hepatocytes as a function of age, and in older animals the percentage of residual hepatocytes able to re-enter the cell cycle after partial hepatectomy is significantly reduced (Michalopoulos and DeFrances 1997). This fact indicates that loss of cell proliferating potential *in vivo* is not directly linked to a cell-division counting mechanism (and certainly not to telomere erosion since rats have very large telomeres and express telomerase in somatic tissues) and that a stochastic mechanism that limits the proliferating potential as a function of age occurs even in cells arrested in G0. The spontaneous, permanent cell-cycle arrest observed in primary cells and the post-mitotic state characteristic of early, terminally-differentiated cells such as neurons, are remarkably stable and compatible with long-term cell survival. Both states seem to be non-reversible and so independent of soluble regulatory factors acting in *trans*, suggesting that there might be a common factor linking both cellular states (Aranda-Anzaldo, 2009).

In the interphase, nuclear DNA of metazoan cells is organized in supercoiled loops anchored to a nuclear substructure known as the nuclear matrix (NM) that is a non-soluble complex of ribonucleoproteins obtained after extracting the nucleus with high salt and treatment with DNase (Nickerson 2001; Tsutsui et al. 2005). The DNA is anchored to the NM by means of non-coding sequences of variable length known as matrix attachment regions or MARs. Yet there is no consensus sequence for a priori identification of MARs although they are generally rich in A-T and repetitive sequences (Ottaviani et al. 2008). MARs are operationally classified in structural-permanent, resistant to high-salt extraction and functional-facultative, non-resistant to high-salt extraction (Razin 2001; Maya-Mendoza et al. 2003). However, not all potential MARs are actually bound to the NM constituting true loop attachment regions or LARs (Razin 2001). For example, it has been estimated that in the rat diploid genome there should be some 180,000 potential MARs, yet the average structural DNA-loop size in young adult rat hepatocytes is 80 kbp and this figure is compatible with some 60,000 structural DNA loops, indicating that the

actual number of LARs in the young rat is roughly one-third of the potential MARs present in the genome (Berezney and Buchholtz 1981; Maya-Mendoza et al. 2005). The naked DNA loops plus the NM constitute a nucleoid in which the structural loops remain topologically constrained and thus supercoiled even after complete extraction of histones and other chromatin proteins (Cook et al. 1976; Roti-Roti et al. 1993). We have previously shown in nucleoids from freshly isolated rat hepatocytes that there is significant reduction of the average DNA loop size as a function of animal age and this correlates with, increase in the nuclear volume, reduction of the cell proliferating potential and progression towards terminal hepatocyte differentiation with age, even though such quiescent but aged hepatocytes have not undergone repeated cell divisions. Moreover, the larger average number of DNA-NM interactions observed in hepatocytes of naturally senescent rats correlates with a dramatic strengthening of the NM framework and the stabilization of such DNA-NM interactions (Maya-Mendoza et al. 2005).

In the present work we compared the global properties of the higher-order structure in the cell nucleus (NHOS) defined by the DNA-NM interactions, in nucleoids of primary hepatocytes from naturally aged rats (540 post-natal days) and nucleoids from baby (7 post-natal days) and aged (540 post-natal days) post-mitotic rat neurons. Our results suggest that a highly stable NHOS resulting from the actualization of very numerous potential DNA-NM interactions is a common structural feature of both, naturally aged and post-mitotic cells *in vivo*.

## Materials and methods

### Animals

Male Wistar rats were used for isolation of rat hepatocytes and neuronal nuclei. All animals were used in accordance with the official Mexican norm for production, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999).

### Hepatocytes

Primary rat hepatocytes were obtained from aged (540 post-natal days) male rat livers, using the

protocol previously described (Maya-Mendoza et al. 2003). Briefly, the livers were washed *in situ* by perfusion with PBS without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS-A) at 37°C for 5 min at 15 ml/min. Next the tissue was perfused with a solution of collagenase IV, Sigma (0.025% collagenase with 0.075% of  $\text{CaCl}_2$  in HEPES buffer, pH 7.6) for 8 min. Viable hepatocytes were counted in a haemocytometer and used immediately for preparing the nucleoids.

#### Preparation of nucleoids from hepatocytes

The DNA loops plus the nuclear substructure constitute a ‘‘nucleoid’’, a very large nucleoprotein aggregate generated by gentle lysis of a cell at pH 8 in non-ionic detergent and the presence of high salt concentration. Nucleoids were prepared as previously described (Aranda-Anzaldo et al. 1999; Maya-Mendoza and Aranda-Anzaldo 2003). Briefly, freshly isolated washed hepatocytes were suspended in ice-cold PBS-A, aliquots of 50  $\mu\text{l}$  containing  $3.5 \times 10^5$  cells were gently mixed with 150  $\mu\text{l}$  of a lysis solution containing 2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, 0.6% Triton-X 100 (pH 8.0). After 20 min at 4°C, the mixture was washed in 14 ml of PBS-A at 4°C for 4 min at 3,000 rpm (1,500 $\times g$ ). The pellet was recovered in a volume ranging from 200 to 300  $\mu\text{l}$ .

#### Neuronal nuclei isolation

Neuronal nuclei from cerebral cortex of baby (7 post-natal days) and aged (540 post-natal days) rats were isolated as described by Thompson (1973) with some modifications. The cerebral cortex was dissected from the rat brain and it was homogenized with 1 ml of 2.0 M sucrose (1 mM  $\text{MgCl}_2$  + 0.25 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The homogenate was transferred to a fresh tube containing 5 ml of 2.0 M sucrose forming a two phase gradient. The gradients were spun at 4°C for 60 min at 49,000 $\times g$  in a KR 25i centrifuge. The pellet was washed with 10 ml of 0.32 M sucrose (1 mM  $\text{MgCl}_2$  + 0.25 mM PMSF) and spun for 5 min at 1,500 $\times g$ . The pellet was resuspended in 1 ml of 0.32 M sucrose. The isolated neuronal nuclei were counted in a haemocytometer and used immediately for preparing nucleoids.

#### Preparation of nucleoids from neuronal nuclei

Freshly isolated neuronal nuclei were suspended in 0.32 M sucrose and aliquots of 50  $\mu\text{l}$  containing  $5 \times 10^5$  nuclei were gently mixed with 150  $\mu\text{l}$  of lysis solution (2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, 0.6% Triton-X 100, pH 8.0). After 10 min at 4°C a small aliquot was stained with ethidium bromide (EB) 80  $\mu\text{g/ml}$  and examined by fluorescence microscopy for assessing their integrity and DNA-loop supercoiling (Aranda-Anzaldo and Dent 1997). The mixture was washed with 14 ml of PBS-A at 4°C for 5 min at 1,500 $\times g$ . The nucleoids pellet was recovered in a volume of 200–300  $\mu\text{l}$ .

#### Differential identification of nuclei and nucleoids from neurons

In nuclei and nucleoid preparations obtained from cells of rat cerebral cortex the neuron specific nuclei and nucleoids were detected using a monoclonal mouse antibody against the neuron-specific nuclear protein NeuN (Chemicon). 100  $\mu\text{l}$  of freshly isolated nuclei or nucleoids were mounted and dried onto gelatine-coated slides for 90 min at room temperature. Mounted nuclei or nucleoids were fixed with ice-cold acetone for 10 min and washed three times in ice-cold PBS-A. Non specific binding sites were blocked with 10% non-fat skimmed milk powder in PBS-A overnight, prior to incubation with NeuN antibody (1:500) in PBS-A containing 0.01% Tween 20 at 4°C for 2 h. After washing three times in PBS-A for 5 min, the samples were incubated with anti-mouse-Rhodamine antibody (1:1000, ICN Pharmaceuticals) in PBS-A at 4°C for 30 min. Next, after washing three times in PBS-A for 5 min the samples were mounted with DABCO and examined by epifluorescence microscopy. Negative controls were performed by omission of the primary antibody. The percentage of neuron specific nuclei and nucleoids was estimated by counting positive-stained nuclei/nucleoids against non-stained. In fresh nuclei preparations obtained from rat cerebral cortex the contamination by NeuN-negative nuclei (glial-cell nuclei) was <27%. However, after extracting the rather mixed nuclei samples of cerebral cortex for obtaining the corresponding nucleoids, the contamination by NeuN-negative nucleoids fell to <8%, indicating that most glial-cell nuclei are unable to

**Table 1** Primers used for PCR-amplification of chosen target sequences from six different genes in MN-bound templates from either P540 hepatocytes or P7 neurons

Amplicon	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length	Access number
ACT	5'AACACCCAGCCATGTACG3'	5'ATGTCACGCACGATTTCCC3'	254 bp	M10277
ALB	5'GGGATTTAGTTAAACAACCTT3'	5'AAAGGTTACCCACTTCATTG3'	206 bp	M16825.
AFP	5'ACCCATGCATCTGTGACATA3'	5'AGTAAAATGCATGTTGCCTG3'	252 bp	J02816
IP3R3	5'GGTGAGCGGCGAGGGCGAGG3'	5'GCAGTCTGCACGTCCACGA3'	480 bp	L06096
C-MYC	5'TATAATCCGGGGTCTGCGC3'	5'CCCTCTGTCTCTCGCTGGAA3'	227 bp	Y00396
COL1A1	5'CATACCTGGGCCACACCAT3'	5'CTTGCACTTTCCTTCTGGGA3'	261 bp	J04464

withstand the nucleoid extraction procedure. Hence the resulting nucleoid preparations are highly enriched (>92%) in neuron-specific nucleoids and so it is possible to use the freshly isolated nuclei from the cerebral cortex for obtaining nucleoid preparations that are highly enriched in neuronal nucleoids.

#### DNase I digestion of nucleoids

The washed nucleoids were pooled ( $2.3 \times 10^6$  in 1.2 ml PBS-A) for setting up the DNase I digestion curves and mixed with 5.1 ml of DNase I digestion buffer containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM 2-Mercaptoethanol, 50 mM Tris at pH 7.2. The digestions were carried out at 37°C with either 0.5 or 0.92 U/ml DNase I (Sigma) from a stock (0.15 M NaCl, 50% Glycerol, 2,300 U/ml DNase I). For each digestion time point an aliquot of 1 ml containing  $3.6 \times 10^5$  nucleoids was used and the digestion was stopped by adding 200 µl of stop buffer containing 0.2 M EDTA, 10 mM Tris at pH 7.5. After digestion the samples were spun for 10 min at  $9,000 \times g$  at 4°C. The pellet was washed once with 1 ml of PBS-A, stirred, and centrifuged for 10 min at  $9,000 \times g$  at 4°C, washed twice with 1 ml of ice-cold double-deionised water (dd-H<sub>2</sub>O) and centrifuged again as above. The final pellet was resuspended in 100 µl of dd-H<sub>2</sub>O to be used directly as template for PCR. The DNA amount present in samples from each digestion time-point was determined by spectrometry.

#### PCR amplification

Standard PCR was carried out using 1.25 U GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) and 300 ng of nuclear matrix-bound DNA obtained from each DNase I digestion point, using an Applied

Biosystems 2,720 thermal cycler, and the same amplification program was used for all pairs of primers (Table 1): initial denaturing step at 94°C for 5 min, denaturing step at 94°C for 45 s, annealing at 56°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min for 35 cycles, with a final extension at 72°C for 10 min. The identity of all the amplicons was confirmed by restriction analysis with the appropriate restriction enzymes. Amplicons were electrophoresed on 2% agarose gels and visualized using EB staining (0.5 µg/ml), recorded and analyzed using a Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 system. Amplicons were scored as positive or negative on partially digested nucleoid samples, depending on whether they are detected or not by the software using its default settings.

#### Fluorescence microscopy

All procedures involving epifluorescence microscopy were carried out using an Olympus BX60 microscope fitted with an Evolution MP Colour camera for image and video acquisition. Images and videos were processed with the Image-Pro Plus digital image analysis system Version 4.5 (Media-Cybernetics).

#### Nucleoid fluorescent halo assay

Hepatocyte or neuronal nucleoids aliquots (10 µl) were deposited directly on a slide and stained with 10 µl of EB at 160 µg/ml (final concentration 80 µg/ml) and examined by fluorescence microscopy after 30 s of DNA-halo expansion for assessing the nucleoid DNA integrity and supercoiling (Aranda-Anzaldo and Dent 1997). Average DNA halo radii were estimated from the core nucleoid contour to the outer limit of the DNA halo using the Image-Pro-Plus

image-analysis software. For real-time nucleoid videos, selected representative nucleoids were focused under phase contrast and a sequence of 30 fluorescent images was captured using the minimum possible time interval.

#### Nuclear and nuclear matrix measurements

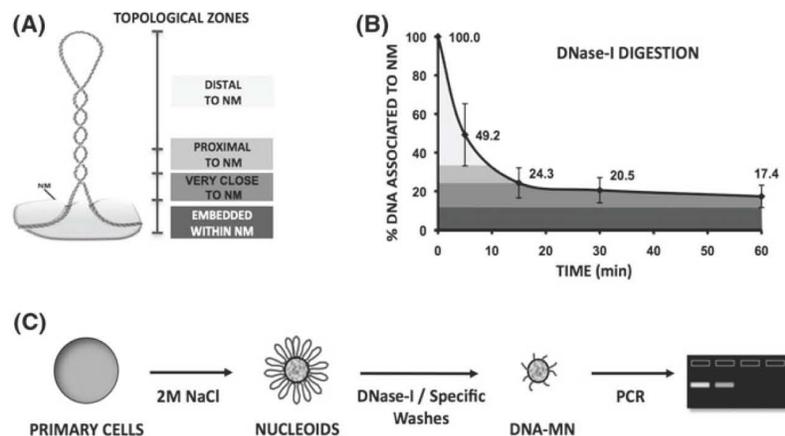
The diameter ( $D$ , expressed in  $\mu\text{m}$ ) of either isolated nuclei or nuclear matrix phase-contrast images was measured using the Image-Pro-Plus image-analysis software.

### Results

Comparison of the average DNA-loop size of P7 and P540 neurons with that of P540 hepatocytes and assessment of their respective NM stability

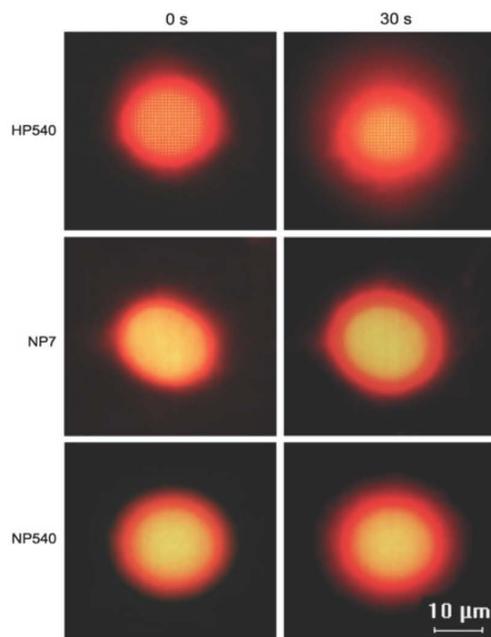
The DNA loops plus the NM constitute a nucleoid. Under the conditions of lysis employed to generate nucleoids the DNA remains essentially intact but it lacks the nucleosome structure because of the dissociation of histones and other chromatin proteins; yet the naked DNA loops remain topologically

constrained and supercoiled (Cook et al. 1976; Roti-Roti et al. 1993) as shown in Fig. 1a. Indeed, nucleoids are also known as nuclear halos since exposure of such structures to DNA-intercalating agents like ethidium bromide (EB) leads to unwinding of the DNA loops that form a DNA halo around the NM periphery. The EB acts as a molecular lever causing the unwinding of loop DNA and this process induces strong tearing forces that impinge upon the NM as the DNA rotates and expands during unwinding. In nucleoids from newborn (P0) and baby (P7) rat hepatocytes, the forces liberated by the EB-induced DNA unwinding lead to disintegration or severe fracturing of the NM framework. However, in nucleoids from senescent-rat (P540) hepatocytes the EB releases the DNA loops creating well-defined DNA halos that surround the undisturbed NM framework (Maya-Mendoza et al. 2005). The average DNA halo size has been correlated with the average DNA-loop size, therefore by measuring the average DNA-halo radius after maximum halo expansion (Fig. 2) it is possible to estimate the average DNA-loop size (Razin et al. 1995; Lemaitre et al. 2005), which in nucleoids from primary P540 hepatocytes is around 31 kbp from tip to base or some 60 kbp whole length (Maya-Mendoza et al. 2005).



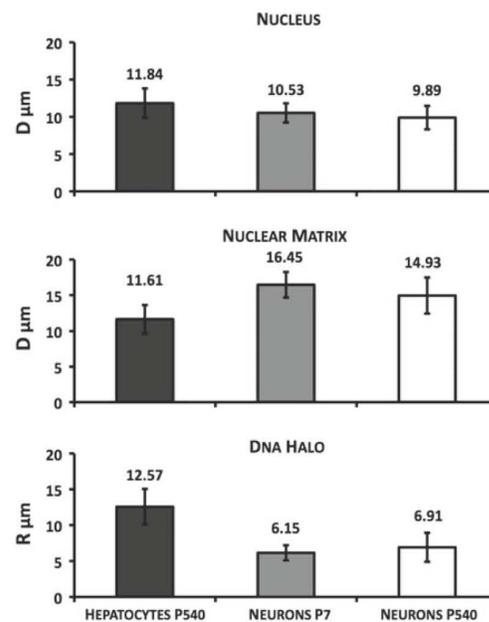
**Fig. 1** **a** Structural properties of a naked DNA loop attached to the nuclear matrix (NM) and its corresponding topological zones relative to the NM. **b** Kinetics of loop DNA digestion correlated with the topological zones in **a**. **c** Procedure for mapping the position of loop DNA sequences relative to the NM. Nucleoids from freshly isolated primary cells (P540 hepatocytes or P7 neurons) are incubated with a limited concentration of DNase I so as to progressively digest the loop

DNA. Partially-digested nucleoid samples with differential amounts of NM-bound DNA are used as templates for PCR amplification of chosen target DNA sequences. The amplicons are resolved in agarose gels and scored as present (+) or absent (-) by an image analysis software. Next they are positioned relative to the NM as a function of the digestion time-point according to the topological zones established in **b**



**Fig. 2** Fluorescence micrographs of nucleoids from hepatocytes of aged rats (HP540) and from neurons of 7 and 540 day-old rats (NP7; NP540), treated with 80 µg/ml of ethidium bromide (EB) in order to induce loop DNA unwinding and relaxation that creates a DNA halo around the NM contour. 0 and 30 s correspond to the first and last micrographs of 30 s real-time videos that confirm the high stability of the DNA-NM interactions and the corresponding NM that remain unperturbed after the EB-induced loop DNA unwinding. Size bar = 10 µm

Using the same approach for estimating the average DNA-loop size in nucleoids from P7 and P540 rat neurons (Fig. 2) it was found that the DNA loops are much shorter than those in nucleoids of P540 hepatocytes, corresponding to around 18–20 kbp from tip to base or some 36–40 kbp whole length (Fig. 3). Real-time videos monitoring the effect of EB-induced DNA halo expansion corroborated that nucleoids of P7 and P540 neurons are highly stable, similarly to the nucleoids from P540 hepatocytes, and so the NM remains undisturbed by the effect of DNA unwinding (Fig. 2). This situation correlates with the fact that the nuclear diameter in early post-mitotic neurons (P7) is almost as big as that of P540 hepatocytes (Fig. 3). However, in the last case the actual nuclear diameter results from a 1.5 fold increase in diameter that took from P0 to P540 to



**Fig. 3** Average diameter ( $D$ ) of the nucleus and the average radius ( $R$ ) of the corresponding nucleoid-DNA halo from aged-rat hepatocytes (P540) and 7 and 540 day-old rat neurons. See Table 2 for the statistical analysis of data. The corresponding average DNA loop size can be deduced from the measurement of the DNA halos (Razin et al. 1995; Lemaitre et al. 2005; Maya-Mendoza et al. 2005): it is 60 kbp for P540 hepatocytes and 36–40 kbp for both P7 and P540 neurons. Bars represent the corresponding standard deviations (P540 hepatocytes  $n = 300$ ; P7 neurons  $n = 50$ ; P540 neurons  $n = 50$ ) of the measurements carried out under phase contrast (nuclei and NM) and fluorescent (DNA halo) microscopy at 40 $\times$

occur (Maya-Mendoza et al. 2005) whereas in neurons nuclear diameter remains unchanged from P7 to P540 (Fig. 3 and Table 2). Interestingly, since the nuclear membrane is removed as a consequence of the extraction procedure for NM preparation, the resulting NM of neurons displays a significant increase in average diameter when compared with that of the original neuronal nuclei and also with that of the NM from P540 hepatocytes (Fig. 3), suggesting that the neuronal NM is resilient as it has been described in lower eukaryotes (Wunderlich and Herlan 1977), and this property may contribute to its remarkable stability even in the early post-mitotic neurons. Thus, the DNA loops are shorter in P7 and P540 neurons compared to those of P540 hepatocytes while the stability of their respective NM is high and similar.

**Table 2** P values from Student's *T* test of paired data from Fig. 3 for establishing possible significant differences in the size of the nucleus, nuclear matrix and DNA halo from: aged hepatocytes (HP540), baby neurons (NP7), aged neurons (NP540)

<i>P</i> values from student's <i>t</i> test			
Size	HP540 and NP7	HP540 and NP540	NP7 and NP540
Nucleus	0.0004	0.0001	0.2549
	Significant	Significant	Non-significant
Nuclear matrix	0.0001	0.0008	0.001
	Significant	Significant	Significant
DNA halo	0.0001	0.0001	0.0193
	Significant	Significant	Non-significant

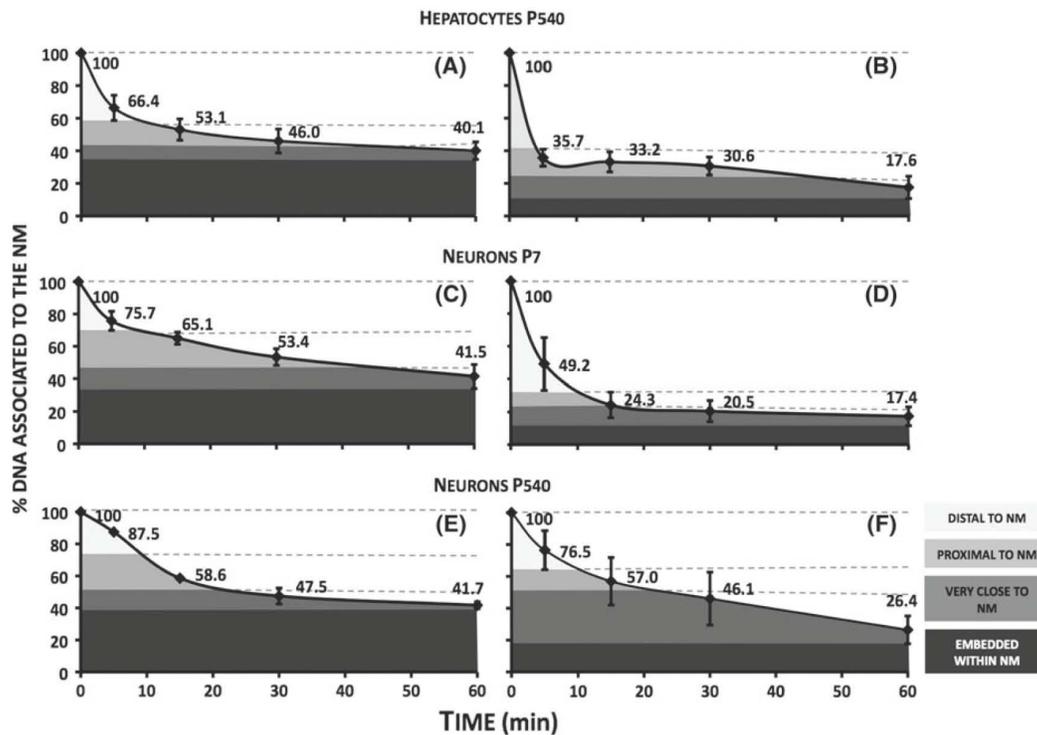
Significance level of 99% ( $P < 0.01$ )

#### Kinetics of DNase I digestion of loop DNA in nucleoids from aged hepatocytes and post-mitotic neurons

The naked DNA loops anchored to the NM are topologically equivalent to closed DNA circles. Under such condition the DNA molecule undergoes significant structural stress that is spontaneously dissipated by coiling the molecule upon its own axis thus achieving negative supercoiling in a similar fashion as a pulled house-telephone cord (Nelson and Cox 2000; Calladine et al. 2004). Thus the naked DNA loops display a gradient of supercoiling that goes from lower to higher from tip to base of the loop (Fig. 1a), save for the fact that the structural properties of MARs are such that they also function as buffers or sinks of negative supercoiling thus avoiding maximal supercoiling at the base of the loops (Benham et al. 1997). A typical DNA loop can be divided in four topological zones according to their relative proximity to the NM, each of these zones manifest and identifiable behaviour when exposed to a non-specific nuclease like DNase I that is sensitive to the local DNA topology (Fig. 1a). We have previously shown that in nucleoid preparations the relative resistance of a given loop-DNA sequence to a limited concentration of DNase I is directly proportional to its proximity to the NM anchoring point (Maya-Mendoza and Aranda-Anzaldo 2003; Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo 2010), two main factors determine such property: (1) Steric hindrance resulting from the proteinaceous NM that acts as a physical barrier that relatively protects the naked loop DNA that is closer to the NM from endonuclease action. (2) The local degree of loop DNA supercoiling that is

lower in the distal portions of the loop and higher in the regions proximal to the NM. Both factors only confer relative but not absolute DNase I-resistance to loop DNA. Thus in a large sample of nucleoids exposed to a limited concentration of DNase I there is a consistent trend in which the loop-DNA sensitivity to the enzyme is inversely proportional to its distance relative to the NM and so distal regions of the loop are digested first while the regions closer to the NM are digested later. Indeed, it is known that the DNA deeply embedded within the NM is very resistant to DNase I action and there is a fraction corresponding to some 2% of the total DNA that is basically non-digestible even when exposed to high concentrations of the enzyme. (Berezney and Buchholtz 1981), likely to represent the regions that include the actual MARs (LARs) anchored to the NM.

Treatment of nucleoids with a limited concentration of DNase I (0.5 U/ml) produces a highly reproducible kinetics of digestion of loop DNA that is remarkably similar for nucleoids from each source: P540 hepatocytes, P7 and P540 neurons (Fig. 4a, c, e). Indeed, the percentage of total DNA bound to the NM after 60 min of digestion is rather high (40%) in all preparations. In the corresponding DNase I digestion curves it is possible to identify three different phases (Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo 2010): the first corresponds to a relatively fast kinetics in which the DNA corresponding to the loop fraction distal to the NM is preferentially digested because in such a fraction minor DNA supercoiling is the only barrier to the endonuclease action. Moreover, as the enzyme nicks the loop DNA each nick becomes a point of further unwinding, thus increasing the reduction of loop supercoiling in time and so making more



**Fig. 4** Kinetics of loop DNA digestion with DNase I in nucleoids from 540-day rat hepatocytes (a, b) or nucleoids from 7-day (c, d) and 540-day rat neurons (e, f). Nucleoids were treated with DNase I at 0.5 U/ml (a, c, e) or 0.92 U/ml (b, d, f). Each time-point value corresponds to the average of

independent experiments using separate animals as the source of nucleoids (P540 hepatocytes  $n = 4$ ; P7 and P540 neurons  $n = 4$ ). The topological zones relative to the NM for the corresponding kinetics were established considering the local slopes between time points and the corresponding SD

accessible the loop DNA to the action of the enzyme. The second phase shows a slower kinetics of digestion resulting from a slower rate of supercoiling loss in the DNA proximal to the NM that slows down the action of the enzyme. The third is the longest and slowest phase resulting from two factors: the effect of any residual DNA supercoiling and fundamentally of the proximity between the loop DNA and the NM proteins that act as physical barriers against the free action of DNase I upon the loop DNA that is very close to the NM. Finally, there is a fraction of loop DNA that is resistant to DNase I even after long incubation times (the local slope of the digestion curve becomes very close to zero and remains unchanged in time), corresponding to the DNA that is actually embedded within the NM and so it is rather inaccessible to the limited concentration of

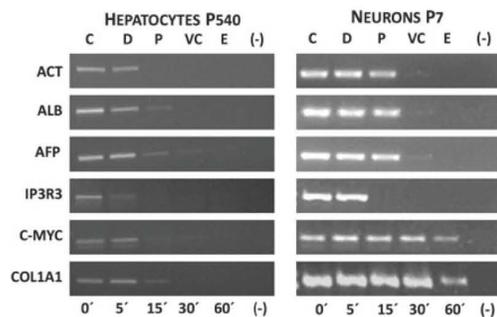
enzyme used. Therefore, the kinetics of loop DNA digestion suggest that similar amounts of DNA are interacting with the NM in the three kinds of nucleoids (Fig. 4a, c, e), either as DNA tracts just embedded within the NM or as LARs directly bound to the NM.

Comparative positional mapping of DNA sequences relative to the NM in P540 hepatocytes and P7 neurons

It is possible to exploit the aforementioned properties in order to map the position of any DNA sequence relative to the NM and so to determine its location within a given DNA-loop topological zone (Fig. 1a) by coupling the kinetics of DNase I digestion (Fig. 1b) with data from direct PCR amplification

of the target sequences in NM-bound templates from partially digested nucleoid samples corresponding to the time-points of the DNase I digestion curve (Fig. 1c). The detailed methodology for such a positional mapping has already been published (Maya-Mendoza and Aranda-Anzaldo 2003; Rivera-Mulia and Aranda-Anzaldo 2010). In order to establish whether the higher-order DNA structure corresponding to the pattern of LARs and DNA loops is similar or not between aged hepatocytes and early (P7) post-mitotic neurons we carried out a comparative positional mapping relative to the NM of six target sequences (Table 1) belonging to six different genes: actin (*Act*), albumin (*Alb*), alpha-fetoprotein (*Afp*), c-myc (*c-Myc*), collagen type 1 alpha-1 (*Col1A1*), inositol triphosphate receptor subtype 3 (*IP3R3*) that are located in five separate rat chromosomes (12, 14p22, 14p21, 7, 10, 20, respectively) and so represent a sample of different chromosome territories within the cell nucleus (Meaburn and Misteli 2007).

The results show that the target sequences mapped either to the distal or proximal regions relative to the NM in nucleoids from P540 hepatocytes (Fig. 5 and Table 3). However, preliminary mappings indicated



**Fig. 5** Representative amplification pattern of the chosen target sequences corresponding to the six genes mapped to topological zones relative to the NM: actin (*Act*), albumin (*Alb*), alpha-fetoprotein (*Afp*), c-myc (*c-Myc*), Collagen type 1 alpha-1 (*Col1A1*), inositol triphosphate receptor subtype 3 (*IP3R3*). The amplicons were scored as positive or negative by an image analysis system (Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 system) using its default settings and thus positioned within the specific topological zones defined according to the kinetics of nucleoid-DNA digestion (P540 hepatocytes Fig. 4a; P7 neurons Fig. 4d). *C* control (0' digestion time), *D* distal to the NM, *P* proximal to the NM, *VC* very close to the NM, *E* embedded within the NM, (-) negative control without DNA template

**Table 3** Differential location of the target sequences, corresponding to six separate genes, within the corresponding topological zones relative to the nuclear matrix (NM) defined according to the specific kinetics of nucleoid DNA digestion for P540 hepatocytes (DNase I 0.5 U/ml, Fig. 4a) and P7 neurons (DNase I 0.92 U/ml, Fig. 4d)

Amplicon	Topological zone relative to NM									
	C	D	P	VC	E	C	D	P	VC	E
	Hepatocytes P540					Neurons P7				
ACT	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
ALB	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
AFP	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
IP3R3	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
C-MYC	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
COL1A1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

*C* = control (0' digestion time) *D* distal to the NM, *P* proximal to the NM, *VC* very close to the NM, *E* embedded within the NM

that all the target sequences were basically embedded within the NM in nucleoids from P7 neurons (data not shown). Thus, it was decided to increase the concentration of enzyme used (0.92 U/ml) so as to obtain digestion curves in which the actual fraction of DNA deeply embedded within the NM were undoubtedly asserted. The results show that similar amounts of DNA are deeply embedded within the NM of P540 hepatocytes and P7 neurons (Fig. 4b, d). Moreover, under such conditions the percentage of NM-embedded DNA is a bit higher in P540 neurons (Fig. 4f).

Using the topological zones determined according to the kinetics of DNA digestion in nucleoids from P7 neurons treated with a higher concentration of DNase I (Fig. 4d) for positioning the six target sequences studied, it was confirmed that most sequences mapped to the zones closer to the NM (VC and E) in contrast to the situation in P540 hepatocytes where no sequence mapped beyond the proximal region to the NM despite the fact that a larger percentage of DNA is embedded within the NM in the nucleoids from hepatocytes treated with 0.5 U/ml of DNase I (Figs. 4a, 5 and Table 3). Indeed, no target sequence was amplifiable beyond the distal region in samples from P540 hepatocytes treated with 0.92 U/ml of DNase I (data not shown). Therefore, although similar amounts of DNA are deeply embedded within the NM from both P540 hepatocytes and P7 neurons (Fig. 4b, d) a larger amount of DNA is directly interacting (as LARs) with the NM in the nucleoids

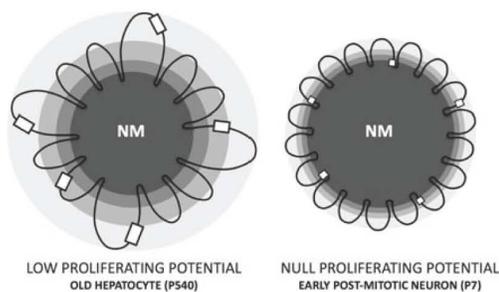
from P7 neurons, since despite the increase in the concentration of enzyme used for digesting the nucleoids (Fig. 4b, d) all the target sequences mapped remain close to the NM in nucleoids from P7 neurons (Table 3). This observation correlates with the fact that P7 post-mitotic neurons already have shorter DNA loops on average than the P540 hepatocytes (Fig. 3).

## Discussion

Rat hepatocytes have an upper replicative limit superior to most previously reported for other mammalian cell types (Overturf et al. 1997), hence most young-adult hepatocytes are considered non-terminally differentiated. The following observations, derived from our previous work with nucleoids of primary hepatocytes from newborn (P0), baby (P7), young adult (P80) and aged rats (P540), correlate age with wholesale changes in the NHOS: reduction of loop DNA sensitivity to DNase I, reduction of the average DNA-loop size, increase in the nuclear volume (Maya-Mendoza et al. 2005). These facts tie in with the reported reduction in nuclear deformability as the cells progress towards terminal differentiation (Pajerowski et al. 2007), and altogether correlate with the known reduction of the proliferating potential of the hepatocytes with age (Michalopoulos and DeFrances 1997), even when such cells have not undergone repeated cell-division cycles through the years. However, appearance of nuclear polyploidy is a critical step in hepatocyte differentiation and is associated with cessation of mitotic activity, terminal differentiation and cellular senescence (Sigal et al. 1995; Gandillet et al. 2003). Thus the adult mammalian liver normally contains mononuclear polyploid hepatocytes, the percentage of which depends on the age of the animal (Sanz et al. 1997; Gandillet et al. 2003). In hepatocytes an increase in nuclear volume with age somehow correlates with the increase in cell polyploidy (Jack et al. 1990), but such an increase in nuclear volume also occurs in aged diploid hepatocytes indicating that polyploidy per se is not the cause of nuclear growth (Maya-Mendoza et al. 2005). Indeed, a general trend towards bigger nuclear volume and increase in nuclear roundness with age has been observed in other cell types that certainly do not

become polyploid with age, such as fibroblasts (Angello et al. 1987; Pienta et al. 1992; Macieira-Coelho 1995). Mammalian cortical neurons are known to be stably diploid as they become post-mitotic since early embryonic stages when they migrate from the germinal centres located in the ventricular surface (Rackic 1974). Interestingly, the average nuclear diameter in diploid, post-mitotic P7 neurons is rather similar to that in aged (P540) hepatocytes (Fig. 3). Moreover, loop DNA in nucleoids from P7 neurons is relatively resistant to DNase I action in a similar fashion as that from P540 hepatocytes (Fig. 4). Also the interactions DNA-NM are very stable in nucleoids from P7 neurons since they are not perturbed by the tearing forces liberated during EB-induced loop-DNA unwinding, and this behaviour is similar to that of nucleoids from P540 hepatocytes (Fig. 2) but it is in contrast with the behaviour of nucleoids from P0 and P7 hepatocytes that are destroyed by the treatment with EB (Maya-Mendoza et al. 2005). Therefore the average NHOS in early post-mitotic neurons is already as stable as that in naturally aged P540 hepatocytes.

The size of the haploid rat genome has been estimated at 2.75 Gbp (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004) and the average density of MARs in the mammalian genome has been estimated at 1 MAR/30,000 bp (Boulikas 1995), while saturation experiments indicate the existence of some 150,000 salt-resistant DNA binding sites per mammalian NM (Hakes and Berezney 1991). These figures correspond to some 180,000–150,000 MARs per diploid rat genome and so to a similar maximum number of DNA loops if all potential MARs were actually attached to the NM. Since in young-adult rat hepatocytes the average DNA loop size is about 80 kbp (Berezney and Buchholtz 1981) there could be some 12 DNA loops/Mb and so around 60,000 loops per diploid genome. Yet in the hepatocytes from senescent rats (P540) the average loop size is 60 kbp (Maya-Mendoza et al. 2005) compatible with some 16 DNA loops/Mb or around 92,000 loops per diploid genome. Remarkably in neurons from P7 rats the average DNA loop size is some 36 kbp (Fig. 3) compatible with around 27 loops/Mb and some 153,000 loops per neuronal nuclei, suggesting that in such early post-mitotic cells most potential MARs are actually attached as LARs to the NM (Fig. 6). Indeed, the fact that similar amounts of total DNA are



**Fig. 6** Model representing the higher-order structure in the cell nucleus (NHOS) resulting from the average DNA-NM interactions in nucleoids from P540 hepatocytes and P7 neurons. The corresponding topological zones relative to the NM are represented by increasing shades of grey with dark grey corresponding to the NM (notice the comparatively larger average size of the NM as well as the reduced halo size in nucleoids from P7 neurons, according to data in Fig. 3 and Table 2). Clear boxes represent target sequences corresponding to some genes within the loops. Notice that the loops in the P7 nucleoids are shorter, more numerous and more homogeneous in size when compared to those in the P540 nucleoids which still display some heterogeneity in size. Thus, the relative amount of DNA directly interacting with the NM as LARs is significantly higher in the nucleoids of the P7 post-mitotic neurons than in the nucleoids from the P540 hepatocytes which on average display a low proliferating potential. The overall higher stability of the NHOS in P7 neurons might constitute a definitive physical barrier for mitosis since under such a stable and non-dynamic configuration the activation-energy cost of chromosome condensation, karyokinesis and nuclear disassembly may become limiting for the cell

deeply embedded within the NM from both P540 hepatocytes and P7 neurons (Fig. 4b and d) and yet all gene-target sequences mapped are found very close to the NM in nucleoid samples from the P7 neurons treated with a higher concentration of DNase I (Table 3), whereas the same sequences map distally to the NM in similarly-treated nucleoids from P540 hepatocytes, can be understood as evidence that a larger proportion of such NM-embedded DNA is not just embedded but actually forming LARs in the neuronal NM when compared to the situation in the NM of the P540 hepatocytes.

It has been suggested that long-term proliferation of normal cells depends upon the potential for reorganization of the genome as a self-limiting process, since at each cell division residual quantitative and qualitative changes would accumulate in chromatin limiting the long-term potential for further rearrangements (Macieira-Coelho and Puvion-Dutilleul

1985). Also there is important evidence that in cultures of primary normal cells, there is a stochastic loss of the cell proliferating potential that is not related to any cell-division counting mechanism nor to the action of cellular stressors (Smith and Hayflick 1974; Martin 1977; Jones et al. 1985). A structurally-stable cell nucleus is unlikely to be the seat of both the dynamic transitions necessary for mitosis and the rearrangement of chromosome territories and chromatin domains that occurs in early G1 (Thomson et al. 2004), since it is conceivable that under such conditions the high activation-energy cost of mitosis, that includes chromosome condensation and nuclear disassembly, would be limiting for the cell. From the structural perspective, the topological organization of higher-order DNA structure based on a selective use of a limited set of potential MARs, as seen in the nuclei from newborn and baby hepatocytes (Maya-Mendoza et al. 2005) is highly asymmetrical and the natural trend in physical systems is towards reducing asymmetries so that systems become more symmetrical in time (Whyte 1949; Thom 1989; Saunders 1995). A configuration in which most potential MARs are actually bound to the NM, resulting in shorter and more stable DNA loops is a highly symmetrical structural attractor. Moreover, since entropy is not a measure of disorder or chaos, but of energy diffusion, dissipation or dispersion in a final state compared to an initial state (Lambert 2002), a rather even distribution of short DNA loops anchored to the NM satisfies the second law of thermodynamics, since the structural stress along the DNA molecule is more evenly dispersed within the nuclear volume by increasing the number of stable DNA-NM interactions. However, highly stable physical systems are resistant to change and have a much reduced dynamic potential resulting from intrinsically high activation-energy barriers.

It has been estimated that in young adult rats subjected to partial hepatectomy at least 95% of the remaining hepatocytes re-enter the cell cycle and contribute to liver regeneration, whereas in old rats less than 75% of the remaining hepatocytes are able to re-enter the cell cycle during liver regeneration (Michalopoulos and DeFrances 1997). Hence at least 20% of the quiescent hepatocyte population becomes replicative-senescent as a function of age, yet such senescent cells may remain alive for long periods of time similarly to the post-mitotic neurons. The trend

in quiescent rat hepatocytes towards the actualization of potential MARS as LARs as a function of age (Maya-Mendoza et al. 2005) suggests that if rats were able to live long-enough then most potential MARS would eventually become attached to the NM in rat hepatocytes. In contrast, early post-mitotic neurons (P7) already have most of the potential MARS actually attached (as LARs) to the NM. The loop DNA within the NM is highly resistant to DNase I, such a DNA may be just embedded as DNA tracts loosely interacting with the NM or as LARs directly bound to NM proteins (Fig. 1a). The fact that in nucleoids from P540 neurons there is a bit larger percentage of DNA that is deeply embedded within the NM when compared to nucleoids from P7 neurons (Fig. 4d, f), suggests that some further MARS may have been actualized as LARs in the P540 neurons or that the average size of the LARs might have slightly increased in the aged neurons (the DNA adjacent to the previously NM-bound LARs may also become bound to the NM thus increasing the LAR size) indicating that continued stabilization of the NHOS occurs throughout postnatal life even in post-mitotic cells. Theoretically both situations might lead to a further reduction of the average DNA loop size in P540 neurons but our data show that there is no significant change in the average DNA loop size between P7 and P540 neurons (Fig. 3 and Table 2). On the other hand, it is technically difficult to reliably assess slight changes in the average size of the actual LARs since the NM must be destroyed for liberating the NM-bound DNA and this process results in erosion or rupture of the original LAR fragments. It may be speculated that the fraction of old hepatocytes unable to proliferate is that in which the potential DNA-NM interactions become stochastically actualized beyond a critical value thus achieving a NHOS similar if not equal to that in early post-mitotic neurons (Fig. 6). However, currently there is no reliable methodology for sorting out such *de facto* post-mitotic hepatocytes from the bulk quiescent-hepatocyte population in the aged rat liver.

Tensegrity is a term applied to structures composed of continuous tension elements and discontinuous compression elements in which structural stress is distributed to tension elements and so the structure becomes rather independent of gravity (Galli et al. 2005). It is a fact that tensegrity operates in both tissues and cells (Wang et al. 2009). A self-stabilizing

tensegrity model for DNA-NM interactions as a function of age, in which a stochastic but time-dependent (age-dependent) process leads to a significant increase of DNA-NM interactions that establish a structural complex similar to a hanging bridge in which beams (proteins) and tensors (DNA) interact for creating a highly stable overall structure, has been proposed for explaining a common physical basis for both the stochastic replicative senescence and the post-mitotic state (Aranda-Anzaldo 2009). The present observations are consistent with such a model. Apparently the NHOS determined by the interactions between DNA and NM constitutes an integral structural system that naturally but relentlessly evolves towards a highly stable state depending on thermodynamic constraints. That this process occurs in cells with different embryonic origin such as hepatocytes (derived from the endoderm) and neurons (derived from the ectoderm), suggests that it is a common phenomenon *in vivo*.

Heterochrony corresponds to developmental change in the timing of events. During embryogenesis there are changes in the rate or timing of development of some cell lineages in the body relative to others, so that different cell lineages develop at different rates. Living tissues are architectural assemblies with inherent distribution of forces which may be informative in the regulation of both cellular and tissue growth through modulation of cell shape (Aranda-Anzaldo 1989; Wang et al. 2009). Mechanotransduction during tissue morphogenesis may induce changes in the differentiation state of cells and this modification of the differentiation state affects the morphogenetic trajectory by limiting the repertory of changes in cellular size and shape. Therefore heterochrony might alter the distribution of probabilities of stochastic events such as the rate of actualization of DNA-NM interactions so that in different tissues the stabilization of the NHOS may occur at different rates. Thus some cell types may reach terminal differentiation and become post-mitotic very early (neurons), depending on their morphogenetic trajectory, while others may randomly achieve or not such a terminally-differentiated, post-mitotic state within the typical lifespan of the corresponding animal system (rat hepatocytes). In any case the present results indicate that a very stable NHOS is a common feature of aged and post-mitotic cells *in vivo*.

**Acknowledgments** This work was sponsored by CONACYT, México, grant 48447-Q (25506) to A. Aranda-Anzaldo, and Universidad Autónoma del Estado de México, México, grant 2212/2006 to A. Aranda-Anzaldo and M.A.R. Dent. J. Alva-Medina is a CONACYT Research Scholar registered within the Graduate Program in Biomedical Sciences at IFC-UNAM, México. We thank Dr. Juan Carlos Rivera-Mulia for helpful comments and discussion on the paper's manuscript.

## References

- Angello JC, Pendergrass WR, Norwood TH, Prothero J (1987) Proliferative potential of human fibroblasts: an inverse dependence on cell size. *J Cell Physiol* 132:125–130
- Aranda-Anzaldo A (1989) On the role of chromatin higher-order structure and mechanical interactions in the regulation of gene expression. *Speculat Sci Technol* 12:163–176
- Aranda-Anzaldo A (2009) A structural basis for cellular senescence. *Aging* 1:598–607
- Aranda-Anzaldo A, Dent MAR (1997) Loss of DNA-loop supercoiling and organization in cells infected by herpes simplex virus type 1. *Res Virol* 149:195–208
- Aranda-Anzaldo A, Orozco-Velasco F, García-Villa E, Gariglio P (1999) p53 is a rate-limiting factor in the repair of higher-order DNA structure. *Biochem Biophys Acta* 1446:181–192
- Benham C, Kowhi-Shigematsu T, Bode J (1997) Stress-induced duplex destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol Biol* 274:181–196
- Berezney R, Buchholtz LA (1981) Dynamic association of replicating DNA fragments with the nuclear matrix of regenerating liver. *Exp Cell Res* 132:1–13
- Boulikas T (1995) Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cytol* 162A:279–388
- Calladine CR, Drew HR, Luisi BF, Travers AA (2004) Understanding DNA. Elsevier-Academic Press, Boston
- Cook PR, Brazell I, Jost E (1976) Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci* 22:303–324
- Galli C, Guizzardi S, Passeri G, Macaluso GM, Scandroglio R (2005) Life on the wire: on tensegrity and force balance in cells. *Acta Bio Med* 76:5–12
- Gandillet A, Alexandre E, Holl V, Royer C, Bischoff P, Cinqualbre J, Wolf P, Jaeck D, Richert L (2003) Hepatocyte ploidy in normal young rat. *Comp Biochem Physiol* A134:665–673
- Hakes DJ, Berezney R (1991) DNA binding properties of the nuclear matrix and individual nuclear matrix proteins. *J Biol Chem* 266:11131–11140
- Jack EM, Bentley P, Bieri F, Muakkassah-Kelly SF, Staubli W, Suter J, Waechter F, Cruz-Orive LM (1990) Increase in hepatocyte and nuclear volume and decrease in the population of binucleated cells in preneoplastic foci of rat liver: a stereological study using the nucleator method. *Hepatology* 11:286–297
- Jones RB, Whitney RG, Smith JR (1985) Intramitotic variation in proliferative potential: stochastic events in cellular aging. *Mech Ageing Dev* 29:143–149
- Lambert F (2002) Disorder, a cracked crutch for supporting entropy discussions. *J Chem Education* 79:187–192
- Lemaitre J-M, Danis E, Pasero P, Vassetzky Y, Mechali M (2005) Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure. *Cell* 123:787–801
- Macieira-Coelho A (1995) The last mitoses of the human fibroblast proliferative life span, physiopathologic implications. *Mech Ageing Dev* 82:91–104
- Macieira-Coelho A, Puvion-Dutilleul F (1985) Genome reorganization during aging of dividing cells. *Adv Exp Med Biol* 190:391–419
- Martin GM (1977) Cellular aging—clonal senescence. A review. *Am J Pathol* 89:484–511
- Maya-Mendoza A, Aranda-Anzaldo A (2003) Positional mapping of specific DNA sequences relative to the nuclear substructure by direct polymerase chain reaction on nuclear matrix-bound templates. *Anal Biochem* 313:196–207
- Maya-Mendoza A, Hernández-Muñoz R, Gariglio P, Aranda-Anzaldo A (2003) Gene positional changes relative to the nuclear substructure correlate with the proliferating status of hepatocytes during liver regeneration. *Nucleic Acids Res* 31:6168–6179
- Maya-Mendoza A, Hernández-Muñoz R, Gariglio P, Aranda-Anzaldo A (2005) Natural ageing in the rat liver correlates with progressive stabilisation of DNA-nuclear matrix interactions and withdrawal of genes from the nuclear substructure. *Mech Ageing Dev* 126:767–782
- Meaburn KJ, Misteli T (2007) Cell biology: chromosome territories. *Nature* 445:379–381
- Michalopoulos GK, DeFrances MC (1997) Liver regeneration. *Science* 276:60–66
- Nelson DL, Cox MM (2000) Lehninger principles of biochemistry. Worth Publishers, New York
- Nickerson JA (2001) Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci* 114:463–474
- Ottaviani D, Lever E, Takousis P, Sheer D (2008) Anchoring the genome. *Genome Biol* 9:201. doi:10.1186/gb-2008-9-1-201
- Overturf K, Al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M (1997) Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 151:1273–1280
- Pajeroski JD, Dahl KN, Zhong FL, Sammak PJ, Discher DE (2007) Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15619–15624
- Pienta KJ, Getzenberg RH, Coffey DS (1992) Characterization of nuclear morphology and nuclear matrix in ageing human fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 62:13–24
- Rackic P (1974) Neurons in Rhesus monkey visual cortex: systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183:425–427
- Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428:493–521
- Razin SV (2001) The nuclear matrix and chromosomal DNA loops: is there any correlation between partitioning of the genome into loops and functional domains? *Cell Mol Biol Lett* 6:59–69
- Razin SV, Gromova IL, Iarovaia OV (1995) Specificity and functional significance of DNA interactions with the

- nuclear matrix: new approaches to clarify old questions. *Int Rev Cytol* 162B:405–448
- Rivera-Mulia JC, Aranda-Anzaldo A (2010) Determination of the in vivo structural DNA loop organization in the genomic region of the rat albumin locus by means of a topological approach. *DNA Res* 17:23–35. doi:10.1093/dnares/dsp027
- Roti-Roti JL, Wright WD, Taylor YC (1993) DNA loop structure and radiation response. *Adv Radiat Biol* 17: 227–259
- Sanz N, Díez-Fernández C, Alvarez A, Cascales M (1997) Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. *J Hepatol* 27:525–534
- Saunders PT (1995) An introduction to catastrophe theory. Cambridge University Press, Cambridge UK
- Sigal SM, Gupta S, Gebhard DF Jr, Holst P, Neufeld D, Reid LM (1995) Evidence for a terminal differentiation process in the rat liver. *Differentiation* 59:35–42
- Sigal SH, Rajvanshi P, Gorla GR, Sokhi RP, Saxena R, Gebhard DR Jr, Reid LM, Gupta S (1999) Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol* 276:G1260–G1272
- Smith JR, Hayflick L (1974) Variation in the life-span of clones derived from human diploid cell strains. *J Cell Biol* 62:48–53
- Thom R (1989) Structural stability and morphogenesis: an outline of a general theory of models. Addison-Wesley, Reading MA
- Thompson RJ (1973) Studies on RNA synthesis in two populations of nuclei from the mammalian cerebral cortex. *J Neurochem* 21:19–40
- Thomson I, Gilchrist S, Bickmore WA, Chubb JR (2004) The radial positioning of chromatin is not inherited through mitosis but is established de novo in early G1. *Curr Biol* 14:166–172
- Tsutsui KM, Sano K, Tsutsui K (2005) Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Med Okayama* 59:113–120
- Wang N, Tytell JD, Ingber DE (2009) Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix and the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:75–82
- Whyte LL (1949) The unitary principle in physics and biology. The Cresset Press, London
- Wunderlich F, Herlan GA (1977) A reversibly contractile nuclear matrix. Its isolation, structure, and composition. *J Cell Biol* 73:271–278

## 11.0 BIBLIOGRAFÍA.

1. **Aghajanian, G. K., Bloom, F. E.** (1967). The formation of synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative electron microscopic study. *Brain Res.* 6:716-727.
2. **Altman, J.** (1992). The early stages of nervous system development: neurogenesis and neuronal migration. En *Handbook of chemical neuroanatomy. Ontogeny of transmitters and peptides in the central nervous system.* Amsterdam. Elsevier. pp. 1-31.
3. **Angello, J. C., Pendergrass, W. R., Norwood, T. H., Prothero, J.** (1987). Proliferative potential of human fibroblasts: an inverse dependence on cell size. *J. Cell Physiol.* 132:125-130.
4. **Aranda-Anzaldo, A.** (1989). On the role of chromatin higher-order structure and mechanical interactions in the regulation of gene expression. *Speculat. Sci. Technol.* 12: 163-176.
5. **Aranda-Anzaldo, A.** (1997). *La complejidad y la forma.* Ed. Fondo de Cultura Económica. México D.F.
6. **Aranda-Anzaldo, A.** (2009). A structural basis for cellular senescence. *Aging* 1:598-607.
7. **Aranda-Anzaldo, A., Dent, M. A. R.** (1997). Loss of DNA supercoiling and organization in cells infected by herpes simplex type 1. *Res. Virol.* 148:397-408.
8. **Aranda-Anzaldo, A., Orozco-Velasco, F., García-Villa, E., Gariglio, P.** (1999). p53 is a rate-limiting factor in the repair of higher-order DNA structure. *Biochem. Biophys. Acta* 1446: 181-192.
9. **Benyajati, C., Worcel, A.** (1976). Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 9:393- 407.
10. **Berezney, R.** (1979). Dynamic properties of the nuclear matrix. In: Busch, H. (ed.), *The cell nucleus.* Orlando; Academic Press, p.p. 413-456.
11. **Berezney, R., Buchholtz, L. A.** (1981). Dynamic association of replicating DNA fragments with the nuclear matrix of regenerating liver. *Exp. Cell Res.* 132:1-13.
12. **Berezney, R., Mortillaro, M., Ma, H., Wei, X., Samarabandu, J.** (1995). The nuclear matrix: A structural mileau for nuclear genomic function. *Inter. Rev. Cyt.* 162A:1-54.
13. **Blue, M. E., Parnavelas, J. G.** (1983a). The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. I. Qualitative analysis. *J. Neurocytol.* 12:599-612.
14. **Blue, M. E., Parnavelas, J. G.** (1983b). The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. *Journal of Neurocytol.* 12:697-712.
15. **Boulder, C., Angevine, Jr., Bodian, D., Coulombre, A. J., Edds, Jr., Hamburger, V., Jacobson, M., Lyser, K. M., Prestige. M. C., Sidman, R. L., Varon, S., Weiss, P.** (1970). Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. *Anat.*

Rec. 166:257-262.

16. **Boulikas, T.** (1995). Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int. Rev. Cytol* 162A: 279-387.
17. **Brasch, K., Ochs, R. L.** (1992). Nuclear bodies (NBs): a newly 'rediscovered' organelle. *Exp. Cell Res.* 202:211-223
18. **Bridger, M. J., Boyle, S., Kill, I. R., Bickmore, W. A.** (2000). Re-modeling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Current Biology.* 10:149-152.
19. **Brodal, P.** (1992). *The Central Nervous System: Structure and Function.* Ed. Oxford University Press pp. 45-53, 398-424.
20. **Burke, A. P., Cowan, D., Virmani, R.** (1992). Primary sarcomas of the heart. *Cancer* 15:387-395.
21. **Buschmann, M. B., LaVelle, A.** (1981). Morphological changes of the pyramidal cell nucleolus and nucleolus in hamster frontal cortex during development and aging. *Mech. Ageing Dev.* 15:385-397.
22. **Calladine, C. R., Drew, H. R., Luisi, B. F., Travers, A. A.** (2004). *Understanding DNA.* Elsevier-Academic Press, Boston.
23. **Callaway, D. S., Hopcroft, J. E., Kleinberg, J. M., Newman, M. E., Strogatz, S. H.** (2001). Are randomly grown graphs really random? *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 64: 041902.
24. **Ciejek, E. M., Tsai, M. J., O'Malley, B. W.** (1983) Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix. *Nature*, 306:607-609.
25. **Cohen-Cory, S.** (2002). The Developing Synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. *Science* 298:770-776; DOI: 10.1126/science.1075510
26. **Cook, P.** (1991). The nucleoskeleton and the topology of replication. *Cell.* 66:627-635.
27. **Cook, P. R., Brazell, I. A.** (1975). Supercoils in human DNA. *J. Cell Sci.* 19:261-279.
28. **Cook, P., Brazell, I., Jost, E.** (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J. Cell Sci.* 22: 303-324.
29. **Cremer, T., Cremer, C.** (2006a). Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part I. The rise of chromosome territories. *Eur J Histochem* 50: 161-76. 50.
30. **Cremer, T., Cremer, C.** (2006b). Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present. *Eur J Histochem* 50: 223-72.
31. **Cremer, T., C. Cremer** (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet* 2: 292-301.

32. **Cristofalo, V., Volker, C., Francis, M., Tresini, M.** (1998). Age dependent modifications of gene expression in human fibroblast. *Crit. Rev. in Euk. Gene Exp.* 8:43-80.
33. **Currais, A., Hortobágyi, T., Soriano, S.** (2009). The neuronal cell cycle as a mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Aging* 1:363-371.
34. **Dent, M. A. R., Segura-Anaya, E., Alva-Medina, J., Aranda-Anzaldo, A.** (2010). NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS Lett.* doi:10.1016/j.febslet.2010.04.073.
35. **Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., Jackson, S. P.** (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426:194-198.
36. **Fey, E. G., Penman, S.** (1988). Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:121-125
37. **Finch, E. F.** (1993). Neuron atrophy during aging: Programmed or sporadic? *Trends Neurosci.* 16:104-110.
38. **Folkman, J., Moscona, A.** (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* 273: 345-349.
39. **Forsyth, N. R., Elder, F. F. B., Shay, J. W., Wright, W. E.** (2005). Lagomorphs (rabbits, pikas and hares) do not use telomere directed replicative aging in vitro. *Mech. Ageing Dev.* 126:685-691.
40. **Gandillet, A., Alexandre, E., Holl, V., Royer, C., Bischoff, P., Cin-qualbre, J., Wolf, P., Jaeck, D., Richert, L.** (2003). Hepatocyte ploidy in normal young rat. *Comp. Biochem. Physiol. A134:* 665-673.
41. **Hakes, D. J., Berezney, R.** (1991). DNA binding properties of the nuclear matrix and individual nuclear matrix proteins. *J. Biol. Chem.* 266:11131-11140
42. **Hansen, L. K., Ingber, D. E.** (1992). Regulation of nucleocytoplasmic transport by mechanical forces transmitted through the cytoskeleton. In *Nuclear Trafficking* (ed. Feldherr, C.), pp. 71-86. Academic Press: Orlando, FL.
43. **Harman, D.** (2000). The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:7124-7128.
44. **Hayflick, L.** (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* 37: 614-636.
45. **Hayflick, L.** (2000). The illusion of cell immortality. *Br. J. Canc.* 83:841-846.
46. **Hayflick, L., Moorhead, P. S.** (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell. Res.* 25:585-621.
47. **Heng, H., Goetze, S., Ye, C., Liu, G., Stevens, J. B., Bremer, S. W., Wykes, S. M., Bode, J., Krawetz, S. A.** (2004) Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci*, 117:999-1008.
48. **Howard, B. H.** (1996). Replicative senescence: Considerations relating to the stability of heterochromatin domains. *Exp. Gerontol.* 31:281-293.

49. **Hozák, P., Hassan, B., Jackson, D., Cook, P.** (1993). Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton. *Cell* 73: 361-373.
50. **Huang, S., Ingber, D. E.** (2000). Shape-dependent control of cell growth, differentiation and apoptosis: switching between attractors in cell regulatory networks. *Exp. Cell Res.* 261: 91-103.
51. **Hudson, L. D.** (1990). Molecular biology of myelin protein in the central and peripheral nervous systems. *Sem. Neurosci.* 2:483-496.
52. **Ingber, D. E.** (1993). Cellular tensegrity: Defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell. Sci* 104:613-627.
53. **Ingber, D. E.** (2003). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J. Cell Sci.* 116: 1157-1173.
54. **Ingber, D. E.** (2006). Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development. *Int. J. Dev. Biol.* 50:255-266.
55. **Ivanović-Matić, S., Dinić, S., Vujosević, Poznanović.** (2000). The protein composition of the hepatocyte nuclear matrix is differentiation-stage specific. *IUBMB Life.* 49:511-517.
56. **Jack, E. M., Bentley, P., Bieri, F., Muakkassah-Kelly, S. F., Staubli, W., Suter, J., Waechter, F., Cruz-Orive, L. M.** (1990). Increase in hepatocyte and nuclear volume and decrease in the population of binucleated cells in preneoplastic foci of rat liver: a stereological study using the nucleator method. *Hepatology* 11:286–297.
57. **Jackson, D. A.** (1991). Structure-function relationship in eukaryotic nuclei. *BioEssays.* 13:1-10.
58. **Jackson, D.A., Dickinson, P., Cook, P. R.** (1990). The size of chromatin loops in HeLa cells. *EMBO J.* 9:567–571.
59. **Jones, R. B., Whitney, R. G., Smith, J. R.** (1985). Intramitotic variation in proliferative potential: stochastic events in cellular aging. *Mech. Ageing Dev.* 29:143-149.
60. **Kauffman, S. A.** (1969). Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J. Theor. Biol.* 22:437-467.
61. **Kauffman, S. A.** (1993). *The Origins of Order.* Oxford Univ. Press, New York.
62. **Kim, K.K., Adelstein, R.S., y Kawamoto, S.** (2009). Identification of Neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J. Biol. Chem.* 284, 31052-31061.
63. **Kimura H, Tao Y, Roeder RG, Cook P. R.** (1999). Quantitation of RNA polymerase II and its transcription factors in an HeLa cell: little soluble holoenzyme but significant amounts of polymerases attached to the nuclear substructure. *Mol Cell Biol.* 19:5383-5392.
64. **Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L., Sharpless, N. E.** (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* 114:1299–1307.

65. **Lambert, F.** (2002). Disorder, a cracked crutch for supporting entropy discussions. *J. Chem. Education* 79:187–192.
66. **Lemaitre, J. M., Danis, E., Pasero, P., Vassetzky, Y., Mechali, M.** (2005). Mitotic remodeling of the replicon and chromosome structure. *Cell* 123:787–801.
67. **Lovtrup- Rein, H. y McEwen, B. S.** (1966). Isolation and fractionation of rat brain nuclei. *J. Cell Biol.* 30:405-415.
68. **Ma, H., Siegel, A. J., Berezney, R.** (1999). Association of chromosome territories with the nuclear matrix. Disruption of human chromosome territories correlates with the release of a subset of nuclear matrix proteins. *J Cell Biol*, 146:531-542.
69. **Macieira-Coelho, A.** (1995). The last mitoses of the human fibroblast proliferative life span, physiopathologic implications. *Mech. Ageing Dev.* 82: 91-104.
70. **Macieira-Coelho, A., Puvion-Dutilleul, F.** (1985). Genome reorganization during aging of dividing cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 190:391–419.
71. **Marcotte, E. M.** (2001). The path not taken. *Nat. Biotechnol* 19: 626-627.
72. **Marin, O., Rubenstein, J. L. R.** (2003). Cell migration in the forebrain. *Annu. Rev. Neurosci.* 26:441-486.
73. **Martin, G. M.** (1977). Cellular aging–clonal senescence. A review. *Am. J. Pathol.* 89:484–511.
74. **Martínez-Ramos, I., Maya-Mendoza, A., Gariglio, P., Aranda-Anzaldo, A.** (2005). A global but stable change in HeLa cell morphology induces reorganization of DNA structural loop domains within the cell nucleus. *J. Cell. Biochem.* 96:79–88.
75. **Maya-Mendoza, A., Aranda-Anzaldo, A.** (2003). Positional mapping of specific DNA sequences relative to the nuclear substructure by direct polymerase chain reaction on nuclear matrix-bound templates. *Anal. Biochem.* 313:196-207.
76. **Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz, R., Gariglio P., Aranda-Anzaldo, A.** (2004). Gene positional changes relative to the nuclear substructure during carbon tetrachloride-induce hepatic fibrosis in rats. *J. Cell Biochem.* 93:1089-1098.
77. **Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz. R., Gariglio, P., Aranda-Anzaldo. A.** (2005). Natural ageing in the rat liver correlates with progressive stabilisation of DNA nuclear matrix interactions and withdrawal of genes from the nuclear substructure. *Mech. Ageing Dev.* 126:767-782.
78. **Meaburn, K. J., Misteli, T.** (2007). Cell biology: chromosome territories. *Nature* 445:379–381.
79. **Michalopoulos, G. K., DeFrances, M. C.** (1997). Liver regeneration. *Science* 276:60-66.
80. **Mika, S., Rost, B.** (2005). NMPdb: database of nuclear matrix proteins. *Nucl. Acids Res.* 33: D160D163.
81. **Moore, K. A., Polte, T., Huang, S., Shi, B., Alsberg, E., Sunday, M. E., Ingber, D.**

- E. (2005). Control of basement membrane remodeling and epithelial branching morphogenesis in embryonic lung by Rho and cytoskeletal tension. *Developmental Dynamics* 232: 268-281.
82. **Mosch, B., Morawski, M., Mittag, A., Lenz, D., Tarnok, A., Arendt, T.** (2007). Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 27:6859–6867.
83. **Mullen, R.J., Buck, C.R., y Smith, A.M.** (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116:201-211.
84. **Nelson, D. L., Cox, M. M.** (2000). *Lehninger principles of biochemistry*. Worth Publishers, New York.
85. **Nelson, W., Pienta, K., Barrack, E., Coffey, D.** (1986). The role of the nuclear matrix in the organization and function of DNA. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 15:457-475.
86. **Nickerson, J. A.** (2001). Experimental observations of a nuclear matrix. *J. Cell Sci.* 114:463-474.
87. **Nickerson, J. A., Blencowe, B. J., Penman, S.** (1995). The architectural organization of nuclear metabolism. *Int. Rev. Cytol.* 162A:67-123.
88. **Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hara, E.,** (2004). The p16INK4a- RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J. Med. Invest.* 51:146–153.
89. **Ottaviani, D., Lever, E., Takousis, P., Sheer, D.** (2008). Anchoring the genome. *Genome Biol.* 9:201. doi: 10.1186/gb-2008-9-1-201.
90. **Pajerowski, J. D., Dahl, K. N., Zhong, F. L., Sammak, P. J., Discher, D. E.** (2007). Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:15619–15624.
91. **Parnavelas, J.G.,** Alifragis, P., Nadarajah, B. (2002). The origin and migration of cortical neurons. *Prog Brain Res.* 136:73-80.
92. **Parnavelas, J. G., Globus, A.** (1976). The effect of continuous illumination of the development of cortical neurons in the rat: a Golgi study. *Exp. Neur.* 51:637-647.
93. **Parrinello, S., Samper, E., Goldstein, J., Krtolica, A., Melov, S., Campisi, J.** (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative life span of murine cells. *Nature Cell Biol.* 5:741–747.
94. **Patil, C. K., Mian, I. S., Campisi, J.** (2005). The thorny path linking cellular senescence to organismal aging. *Mech. Ageing Dev.* 126:1040–1045.
95. **Peinado, M. A., Quesada, A., Pedrosa, J.A., Martínez, M., Esteban, F. J., Del Moral, M. L., Peinado, J. M.** (1997) Light Microscopic Quantification of Morphological Changes During Aging in Neurons and Glia of the Rat Parietal Cortex. *Anat Record* 247:420–425.
96. **Penrose, R.** (1989). *The emperor's new mind: Concerning computers, minds and the laws of physics*. Oxford university press. pp 360- 411.

97. **Peters, A. D., Leahu, M. B., McNally, K. J.** (1994). The effects of aging on area-46 of the frontal cortex of the rhesus monkey. *Cerebral Cortex*, 6:621–635.
98. **Petrova, N. V., Iarovaia, O. V., Verbovoy, V. A., Razin, S. V.** (2005). Specific radial positions of centromeres of human chromosomes X, 1, and 19 remain unchanged in chromatin-depleted nuclei of primary human fibroblasts: evidence for the organizing role of the nuclear matrix. *J Cell Biochem*, 96:850-857.
99. **Petrova, N. V., Yarovaya, O. V., Razin, S. V.** (2006). Specific spatial organization of chromosomes in nuclei of primary human fibroblasts is maintained by nuclear matrix. *Dokl Biochem Biophys*, 406:4-6.
100. **Pienta, K. J., Coffey, D. S.** (1984). A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *J. Cell Sci. (Suppl. 1)*:123–135.
101. **Pienta, K. J., Getzenberg, R. H., Coffey, D. S.** (1992). Characterization of nuclear morphology and nuclear matrix in ageing human fibroblasts. *Mech. Ageing Dev.* 62:13–24.
102. **Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., Williams, S. W.** (2001). *Neuroscience*. 2 ed. Sunderland MA. Sinauer Associates.
103. **Rakic, P.** (1974). Neurons in rhesus monkey visual cortex: Systematic relation between time of origin and eventual disposition. *Science* 183:425-427.
104. **Rakic, P.** (2009). Evolution of the neocortex: A perspective from developmental biology. *Nature reviews neurosci.* 10:724-735.
105. **RamanaMurty, C. V., Mancini, M. A., Chatterjee, B., Roy, A. K.** (1988) Changes in transcriptional activity and matrix association of the  $\alpha 2m$ - globulin gene family in the rat liver during maturation and aging. *Biochim. Biophys. Acta*, 949:27-34.
106. **Rat Genome Sequencing Project Consortium** (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 428:493–521.
107. **Rattan, S.I.** (2000). Ageing, gerontogenes, and hormesis. *Indian J Exp. Biol.* 38:1-5.
108. **Razin, S. V., Gromova, I., Iarovaia, O.** (1995). Specificity and functional significance of DNA interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions. *Int. Rev. Cyt.* 162:405-448.
109. **Razin, S.V.**, (2001). The nuclear matrix and chromosomal DNA loops: is there any correlation between partitioning of the genome into loops and functional domains? *Cell Mol. Biol. Lett.* 6:59–69.
110. **Rivera-Mulia, J. C., Aranda-Anzaldo, A.** (2010) Determination of the in vivo structural DNA loop organization in the genomic region of the rat albumin locus by means of a topological approach. *DNA Res.* 17:23–35. doi:10.1093/dnares/dsp027

111. **Rivera-Mulia, J. C., Hernández-Muñoz, R., Martínez, F., Aranda-Anzaldo, A.** "The movement of structural DNA loops in the rat albumin locus during DNA replication in vivo". Sent to Exp Cell Res.
112. **Roti-Roti, J. L., Wright, W. D., Taylor, Y. C.** (1993). DNA loop structure and radiation response. Adv. Radiat. Biol. 17:227-259.
113. **Sanz, N., Díez-Fernández, C., Alvarez, A., Cascales, M.** (1997). Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. J. Hepatol. 27:525-534.
114. **Saunders, P. T.** (1995). An introduction to catastrophe theory. Cambridge University Press, Cambridge UK.
115. **Scharre, B., Szabó-Lochhead, M.** (1950). Tumors in the invertebrates: a review. Cancer Res.10: 403-419.
116. **Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R. M., Lowe, S. W.** (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. Cell 109:335- 346.
117. **Shay, J. W., Wright, W. E.** (2004). Are telomeres double-strand DNA breaks that are hidden from DNA damage responses? Mol. Cell 14:420-421.
118. **Shay, J. W., Wright, W. E.** (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. Carcinogenesis 26:867-874.
119. **Sheval, E. V., Polyakov, V. Y.** (2006). Visualization of the chromosome scaffold and intermediates of loop domain compaction in extracted mitotic cells. Cell Biol. Int. 30:1028-1040.
120. **Sigal, S. H., Rajvanshi, P., Gorla, G. R., Sokhi, R. P., Saxena, R., Gebhard, Jr. D. R., Reid, L. M., Gupta, S.** (1999). Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. Am. J. Physiol. 276:G1260- G1272.
121. **Sigal, S., Grupta, S., Gebhard, D., Holst, P., Neufeld, D. y Reid, L.** (1995). Evidence for a terminal differentiation process in the rat liver. Differentiation. 59:35-42.
122. **Smith, C. A., Wood, E. J.** (1992). Cell Biology. Chapman and Hall, London.
123. **Smith, J. R., Hayflick, L.** (1974). Variation in the life span of clones derived from human diploid cell strains. J. Cell Biol. 62:48-53.
124. **Smith, J. R., Whitney, R. G.** (1980). Intraclonal Variation in Proliferative Potential of Human Diploid Fibroblasts: Stochastic Mechanism for Cellular Aging. Science 207:82-84.
125. **Sung-Min, A., Kyunghye, B., Kun, C., Jin, Y. K., Jong, S. Y., Deokhoon, K., Sun, H. P., Seung. U. K., Simpson, R. J., Bonghee, L.** (2008). Human microglial cells synthesize albumin in brain. Nature Precedings: hdl:10101/npre.2008.1652.1.

126. **Takahashi, A., Ohtani, N., Hara, E.** (2007). Irreversibility of cellular senescence: dual roles of p16<sup>ink4a</sup>/Rb pathway in cell cycle control. *Cell Division* 2:10 doi:10.1186/17471028210.
127. **Terry, R. D., De Teresa, R., Laurence, A., Hansen, M. D.** (1987). Neocortical cell count in normal human adult aging. *Ann. Neurol.* 21:530–539.
128. **Thom, R.** (1989). Structural stability and morphogenesis: an outline of a general theory of models. Addison-Wesley, Reading MA.
129. **Thompson, R. J.** (1973). Studies on RNA synthesis in two populations of nuclei from the mammalian cerebral cortex. *J. Neurochem.* 21:19-40.
130. **Thomson, I., Gilchrist, S., Bickmore, W. A., Chubb, J. R.** (2004). The radial positioning of chromatin is not inherited through mitosis but is established de novo in early G1. *Curr. Biol.* 14:166–172.
131. **Tsutsui, K. M., Sano, K., Tsutsui, K.** (2005). Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Med. Okayama* 59:113-120.
132. **Vincent, S. L., Peters, A., Tigges, J.** (1989). Effects of aging on the neurons within area 17 of rhesus monkey cerebral cortex. *Anat. Rec.* 223:329–341.
133. **Vogelstein, B., Pardoll, D., Coffey, D.** (1980). Supercoiled loops and eukaryotic DNA replication. *Cell.* 22:79-85.
134. **Wachsmuth, M., Caudron-Herger, M., Rippe, K.** (2008). Genome organization: balancing stability and plasticity. *Biochim Biophys Acta*, 1783:2061-2079.
135. **Waddington, C. H.** (1956). Principles of Embryology. Allen y Unwin Ltd, London.
136. **Wang, N., Tytell, J. D., Ingber, D. E.** (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix and the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:75–82.
137. **Watson, J. D., Crick, F. H.** (1953). Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Rev. Invest. Clin.* 55:108-9.
138. **Wei, X., Samarabandu, J., Devdhar, R. S., Siegel, A. J., Acharya, R., Berezney, R.** (1998). Segregation of transcription and replication sites into higher order domains. *Science* 281:1502-1505.
139. **Whyte, L. L.** (1949). The unitary principle in physics and biology. The Cresset Press, London.
140. **Wunderlich, F., Herlan, G. A.** (1977). A reversibly contractile nuclear matrix. Its isolation, structure, and composition. *J Cell Biol.* 73:271–278.
141. **Zekanowski, C., Wojda, U.** (2009). Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer’s disease. *Acta Neurobiol. Exp.* 69:232-253.
142. **Zhang, Y., Xi, Z., Hegde, R. S., Shakked, Z., Crothers, D. M.** (2004). Predicting indirect readout effects in protein-DNA interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA 101:8337-8341.

143. **Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F., Sherr, C. J.** (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* 15:203–211.
144. **Zhu, X., Siedlak, S. L., Wang, Y., Perry, G., Castellani, R. J., Cohen, M. L., Smith, M. A.** (2008). Neuronal binucleation in Alzheimer disease hippocampus. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* 34:457–465 doi: 10.1111/j.1365-2990.2007.00908.x