



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE SOLVENTES POLARES APRÓTICOS SOBRE LA ESTRUCTURA NUCLEAR DE ORDEN SUPERIOR (NHOS)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
PRESENTA

GUILLERMO CONTRERAS RELLO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ARMANDO ARANDA ANZALDO

Facultad de Medicina

CO-ASESOR:

DR. JORGE ALBERTO LUGO DE LA FUENTE

Facultad de Ciencias

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, 2023

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 (UAEMex), bajo la dirección del Dr. Armando Aranda Anzaldo, con recursos derivados de proyectos apoyados mediante las convocatorias de Ciencia Básica de la UAEMex.

ÍNDICE

ANTECEDENTES	1
Estructura y organización del núcleo	1
Estructura del DNA	2
Topología del DNA.....	13
Organización del DNA al interior del núcleo	20
Matriz nuclear	24
La estructura nuclear de orden superior.....	26
Propiedades de la NHOS	27
NHOS y replicación del DNA.....	29
NHOS y senescencia celular	30
Nucleoides.....	31
DNA como componente estructural del núcleo	34
Tenseguridad.....	38
NHOS y tenseguridad	39
Solventes polares apróticos	41
Dimetilsulfóxido.....	41
Dimetilformamida	43
Glicerol.....	44
HIPÓTESIS	46
OBJETIVOS	46
Objetivo general	46
Objetivos particulares	46
MATERIALES Y MÉTODOS	47
a. Animales experimentales	47
b. Purificación de células primarias.....	47
c. Preparación de nucleoides.....	47
d. Ensayos con solventes	48
e. Visualización en el microscopio y toma de imágenes.....	48
f. Calibración de ImageJ	48
g. Medición de los nucleoides observados en Image J.....	49

h. Extracción de proteínas	49
i. Cuantificación de proteínas	50
j. Electroforesis en gel de poliacrilamida	50
k. Tinción con azul de Coomassie	51
l. Digestión con DNAsa I	51
RESULTADOS	52
i. Estandarización de la obtención de nucleoides	52
ii. Expansión del halo de DNA.....	53
iii. Ensayos con solventes.....	55
Ensayos control	56
Ensayos con DMSO al 10%.....	56
Ensayos con DMF al 10%.....	57
Ensayos con glicerol al 10%.....	58
Ensayos con DMSO al 50%.....	59
Ensayos con DMF al 50%.....	60
Ensayos con glicerol al 50%.....	61
iv. Conteo por campos.....	63
v. Extracción de proteínas	64
vi. Electroforesis en gel de poliacrilamida	65
vii. Digestión con DNAsa I.....	66
viii. Cuantificación de proteínas	68
DISCUSIÓN	69
Nucleoides control	69
Expansión de la NM	70
Nucleoides con solventes al 10%.....	70
Nucleoides con solventes al 50%.....	74
CONCLUSIONES.....	85
BIBLIOGRAFÍA.....	86

ANTECEDENTES

Estructura y organización del núcleo

El núcleo es la estructura que caracteriza a las células eucariotas y uno de los organelos celulares más complejos que existen (fig. 1). Su tamaño es relativo al tamaño de la célula, ocupando alrededor del 8% del volumen celular total (Huber y Gerace, 2007; Lodish *et al.*, 2016). Posee varias funciones, entre las que destacan el almacenaje del genoma, su replicación, transcripción y reparación, el procesamiento de moléculas de RNA y la biogénesis ribosomal. Está delimitado por la envoltura nuclear, que consta de 2 membranas concéntricas sostenidas por una red proteica conocida como lámina nuclear, que se compone de filamentos intermedios denominados láminas nucleares. Grandes complejos proteicos atraviesan ambas membranas de la envoltura nuclear y controlan el tráfico de moléculas entre el volumen nuclear y el citoplasma circundante, estos complejos se denominan complejos del poro nuclear y están compuestos por proteínas denominadas nucleoporinas (Alber *et al.*, 2007).

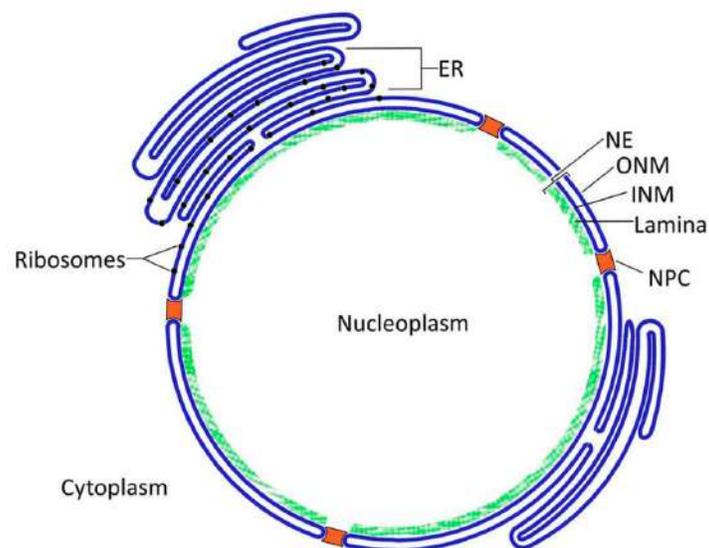


Figura 1. Representación esquemática del núcleo. La envoltura nuclear (NE), compuesta por la membrana nuclear externa (ONM), la membrana nuclear interna (INM) y la lámina nuclear, rodea todo el volumen nuclear y regula el flujo de moléculas a través de los complejos del poro nuclear (NPC) (Tomado de Huber y Gerace, 2007).

Estructura del DNA

El ácido desoxirribonucleico (**DNA**, **Deoxyribonucleic Acid**), la llamada “molécula de la vida”, constituye la información genética de un organismo. En la naturaleza, el DNA se encuentra como 2 hebras antiparalelas enrolladas alrededor de un mismo eje, formando una doble hélice. Cada hebra está constituida por subunidades denominadas nucleótidos. Existen 4 nucleótidos distintos, determinados por la base nitrogenada que poseen, y se dividen en 2 grupos: las purinas, adenina (**A**) y guanina (**G**), y las pirimidinas, citosina (**C**) y timina (**T**). Cada nucleótido consta de 3 componentes: un azúcar de 5 carbonos, que, en el caso del DNA es la desoxirribosa, un grupo fosfato y una de las cuatro posibles bases nitrogenadas. Los nucleótidos se unen entre sí mediante enlaces fosfodiéster, donde el grupo fosfato de un nucleótido, unido al carbono 5' de la desoxirribosa, se une al grupo hidroxilo en el carbono 3' de la desoxirribosa de otro nucleótido. Esto resulta en una columna que alterna entre azúcar-fosfato sucesivamente, lo que le confiere al DNA una direccionalidad química de 5' a 3' (Alberts *et al.*, 2010). Esta configuración constituye el soporte estructural de cada hebra y se le conoce como esqueleto azúcar-fosfato (**SPB**, **Sugar-Phosphate Backbone**) (fig. 2).

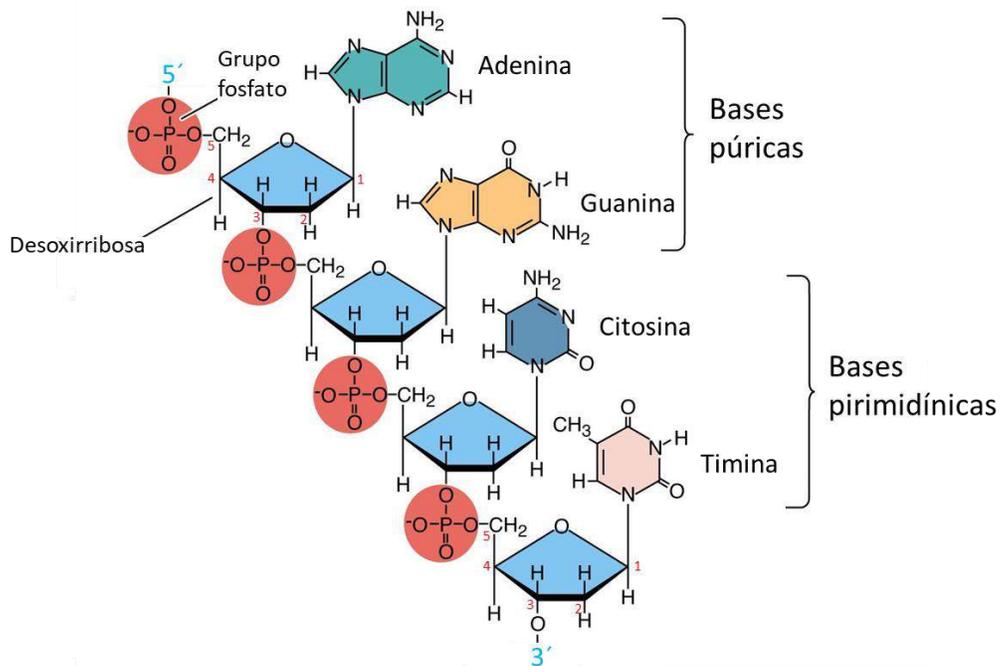


Figura 2. Componentes de un nucleótido y la manera en la que se unen generando una cadena de DNA en la que ambos extremos son químicamente distintos. Los números rojos indican la numeración de los 5 átomos de carbono de la desoxirribosa, los números azules denotan los extremos 5' y 3'.

Las bases nitrogenadas forman entre sí apareamientos complementarios, donde una purina se asocia mediante puentes de hidrógeno con una pirimidina; A interactúa con T formando dos puentes de hidrógeno, y C interactúa con G formando tres puentes de hidrógeno. Así, dos hebras antiparalelas (de direccionalidad opuesta), complementarias en secuencia, pueden unirse mediante el apareamiento entre sus bases a lo largo de la molécula (fig. 3).

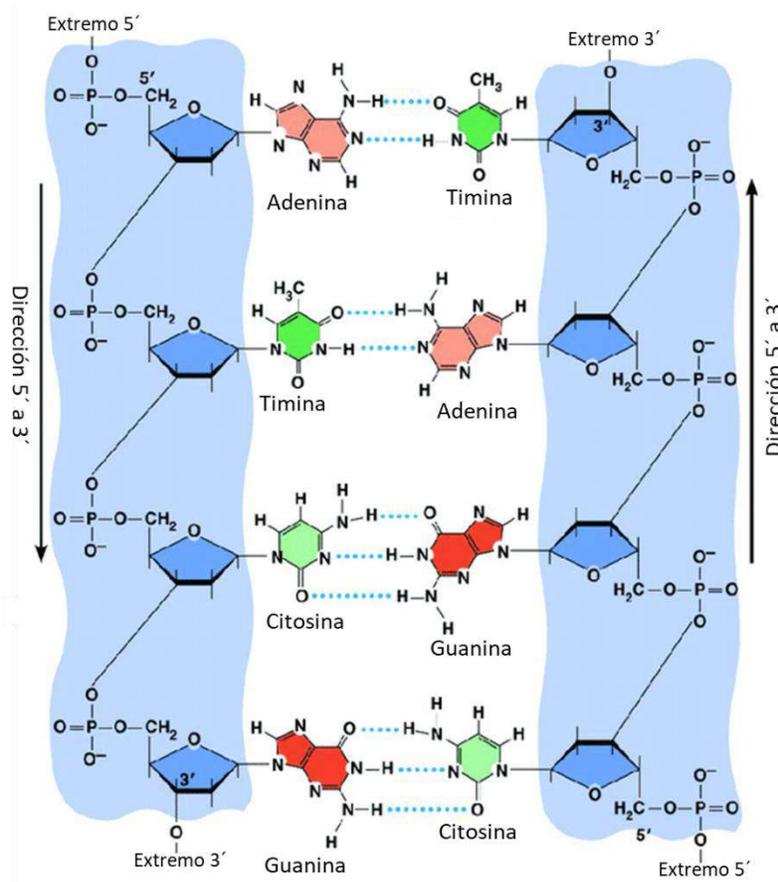


Figura 3. Representación esquemática de DNA de doble cadena, donde 2 hebras complementarias se aparean. Esqueleto azúcar-fosfato resaltado en azul (Tomado de Roy *et al.*, 2019)

Las moléculas de azúcar y los grupos fosfato que componen los nucleótidos son hidrofílicos, a diferencia de las bases nitrogenadas, que no son miscibles en el medio acuoso celular. Sin embargo, cuando las bases se unen al SPB, se solubilizan, aunque mantienen una afinidad por el agua relativamente baja con respecto al azúcar y al grupo fosfato. Esto impone restricciones a las conformaciones que puede adoptar la doble cadena de DNA en solución. Para que dicha molécula sea estable en la solución acuosa de pH neutro que es el entorno celular, debe adoptar una conformación en la que la superficie de contacto entre las bases nitrogenadas y el agua sea mínima. Esto resulta en una doble hélice en la cual las bases nitrogenadas se encuentran en el interior de la hélice, mientras que el SPB se encuentra en el exterior, en contacto con el solvente (fig. 4) (Calladine *et al.*, 2004).

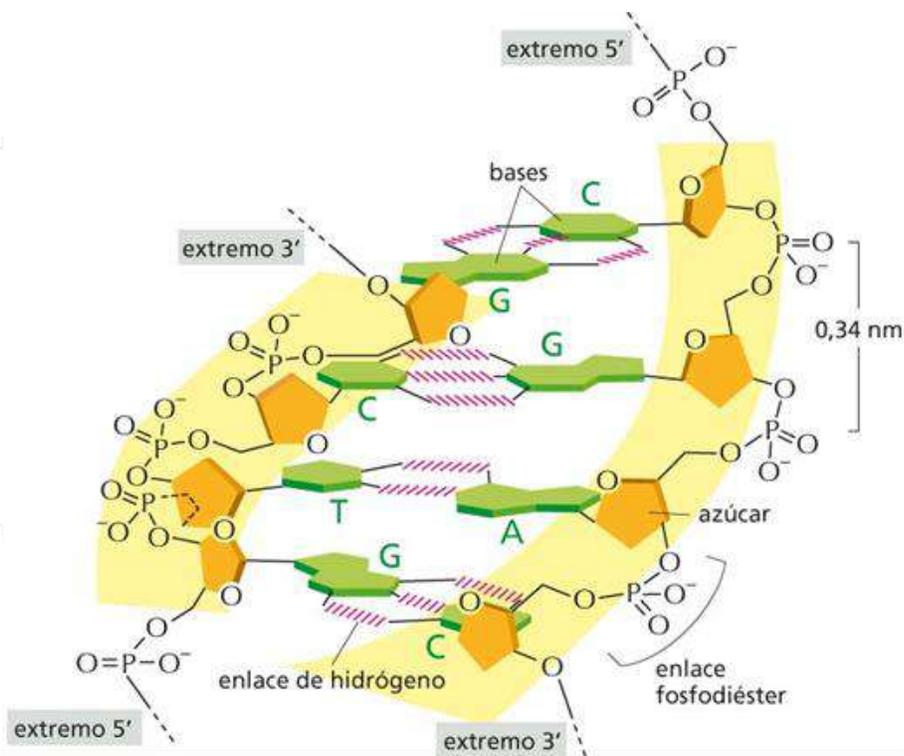


Figura 4. Representación esquemática de la doble hélice de DNA, donde el esqueleto azúcar-fosfato (resaltado en amarillo) queda expuesto al solvente, mientras los pares de bases (en verde) quedan al interior de la hélice, minimizando su contacto con el agua (Tomado de Alberts *et al.*, 2010).

El apareamiento entre bases ya mencionado, conocido como apareamiento clásico o de Watson-Crick, consiste en la formación de 2 puentes de hidrógeno entre el par de bases A-T y la formación de 3 puentes de hidrógeno entre el par de bases C-G (fig. 5a). Para comprender cómo se forman estas interacciones, se debe definir el concepto de electronegatividad, que es la capacidad que tiene un átomo de atraer electrones hacia sí mismo. Una electronegatividad mayor significa una mayor capacidad de atracción de electrones, generando una carga negativa alrededor de estos átomos, mientras que átomos con baja electronegatividad, al no ser capaces de competir por la atracción de electrones, poseen una carga positiva. Los átomos de oxígeno (**O**) y nitrógeno (**N**) de cada base nitrogenada tienen una alta electronegatividad y, por ende, carga parcial negativa, mientras que los átomos de hidrógeno (**H**) tienen baja electronegatividad y carga parcial positiva, generando así un dipolo en la molécula. Gracias a esto, los átomos O y N de una base nitrogenada pueden interactuar electrostáticamente con los átomos H de otra base nitrogenada, creando interacciones débiles que se conocen como puentes de hidrógeno. Estas interacciones son débiles, y se forman y rompen constantemente, en la escala de milisegundos (Frank-Kamenetskii y Prakash, 2014).

El apareamiento de bases clásico es el predominante en el DNA en condiciones normales, sin embargo, existe una variación a este, el apareamiento de bases de tipo Hoogsteen (**Hg**). Este tipo de apareamiento es menos estable que el apareamiento clásico, y consiste en la rotación de la base púrica 180° sobre el enlace glucosídico que la une con su respectivo azúcar (fig. 5b). Esto ocurre en condiciones fisiológicas a una tasa de 0.1-1% del total de pares bases de la molécula (Nikolova *et al.*, 2013), y dicha configuración es más estable que la configuración clásica en pH ácido (Calladine *et al.*, 2004). Una diferencia importante con el apareamiento clásico es que el apareamiento de bases Hg solo permite la formación de dos puentes de hidrógeno entre el par de bases C-G, a diferencia de los tres formados en el apareamiento clásico, por lo que regiones que contengan apareamientos Hg son menos estables que regiones idénticas que contienen apareamiento clásico (Calladine *et al.*, 2004).

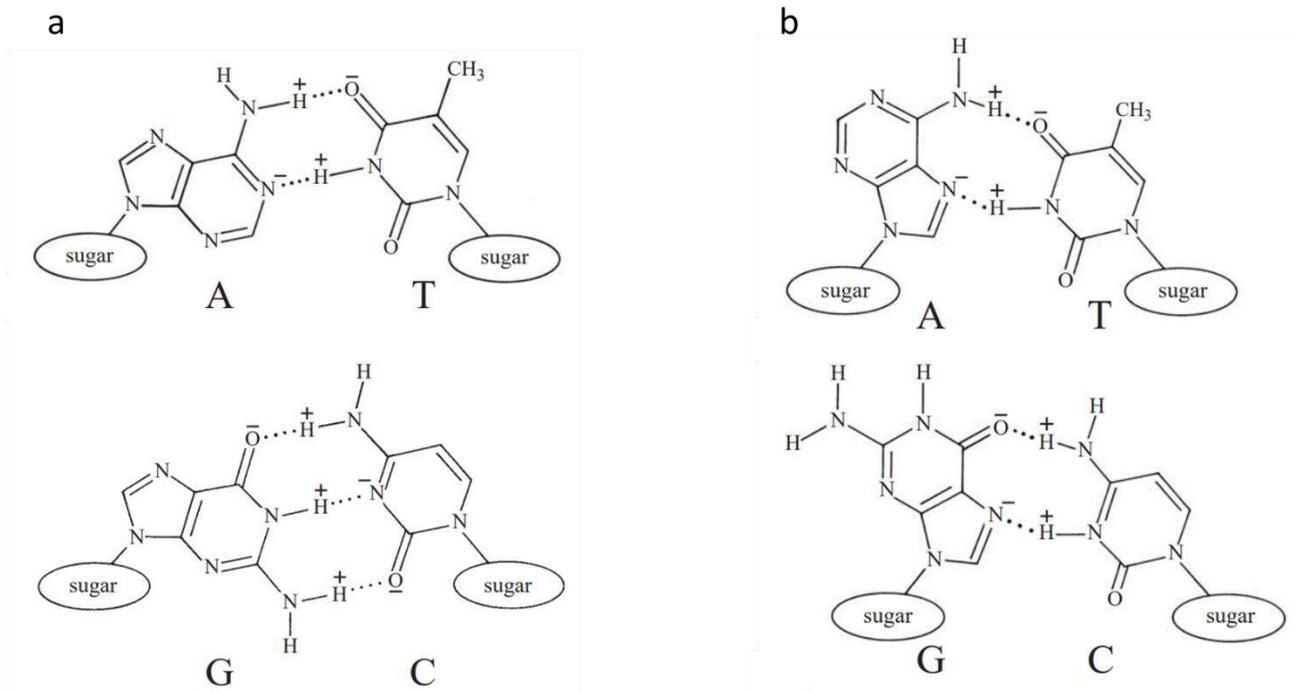


Figura 5. Tipos de apareamientos de bases. a) Apareamiento de bases clásico (de Watson-Crick). b) Apareamiento de bases de Hogsteen, nótese la rotación de 180° de la base púrica y la formación de sólo 2 puentes de hidrógeno entre G-C, a diferencia de los 3 formados en el apareamiento clásico (Tomado de Calladine *et al.*, 2004).

La distancia entre dos azúcares adyacentes unidas por un grupo fosfato en el SPB es de aproximadamente 6 Å. Esta distancia no puede ser mayor a 6.5 Å, ni menor a 5.5 Å porque el enlace fosfodiéster es rígido. Las bases nitrogenadas también poseen enlaces rígidos, por lo que su grosor de 3.3 Å no puede modificarse. Además, la distancia entre los “escalones” de pares de bases, haciendo analogía a los peldaños de una escalera, es de 2.7 Å (fig. 6) (Calladine *et al.*, 2004).

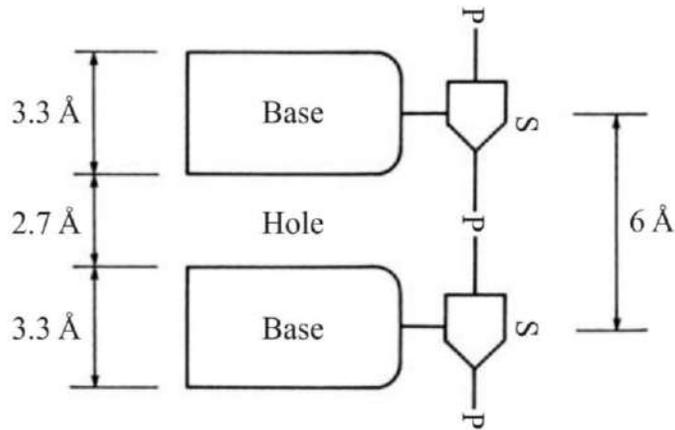


Figura 6. Representación esquemática de dos nucleótidos consecutivos, mostrando las distancias existentes entre estos. P: grupo fosfato, S: azúcar (Tomado de Calladine *et al.*, 2004).

Para excluir a las moléculas de agua que puedan estar presentes en el espacio existente entre los pares de bases, la molécula reduce la distancia entre las bases. Sin embargo, dicha reducción está bastante limitada, dada la poca flexibilidad de los enlaces fosfodiéster entre los fosfatos y los azúcares, así como de los enlaces glucosídicos entre los azúcares y las bases nitrogenadas. En la naturaleza, esta limitación se supera al apilar una base sobre otra girándola 32.3° sobre su plano horizontal, alrededor del eje imaginario de la doble hélice, lo que se conoce como giro (Twist, **T**). El sentido de esta rotación es hacia la derecha, lo que resulta en una hélice dextrógira, como se muestra en la figura 7.

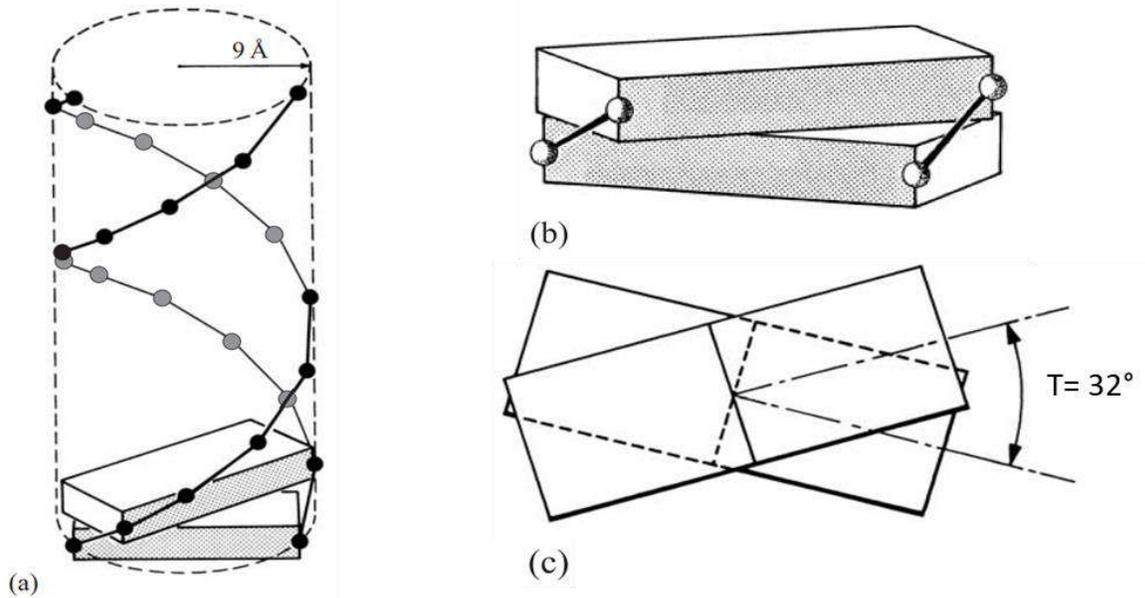


Figura 7. Twist de cada escalón de pares de bases sobre su plano horizontal alrededor del eje de la doble hélice. a) Representación esquemática de la rotación de la doble hélice alrededor de su eje formando un cilindro, los puntos negros representan las moléculas de azúcar, las líneas que los unen representan los grupos fosfato y las barras representan un par de bases. b) Aumento de la representación esquemática del giro entre pares de bases consecutivos. c) Dos pares de bases apilados con un giro de 32° entre ellos con respecto a su plano horizontal (Modificado de Calladine *et al.*, 2004).

Debido a que las bases giran alrededor de 32.3° en cada paso sucesivo, se completa un giro de 360° aproximadamente cada 11 pares de bases, lo que representa una vuelta completa de la doble hélice. Sin embargo, este ángulo de giro puede variar de 20° a 50° , producto de la secuencia del DNA (Calladine *et al.*, 2004)

Los apareamientos clásicos A-T y G-C son geométrica y espacialmente iguales, ya que involucran el apareamiento de una purina (con 2 anillos de carbono) con una pirimidina (con 1 anillo de carbono). Sin embargo, debido al Twist presente entre pares de bases adyacentes, estos no se sobrelapan en su totalidad, lo que causa que las porciones no sobrelapadas estén en contacto con el agua. Para reducir la superficie de contacto con el agua, cada base de una hebra rota aproximadamente 15° a lo largo su eje en el sentido de las manecillas del reloj, mientras que las bases de la otra hebra rotan alrededor de 15° en sentido contrario las manecillas del reloj. Esta rotación mejora el apilamiento

debido a que las moléculas de agua quedan excluidas de una mayor superficie de contacto con las bases, y se conoce como propeller twist (fig. 8) (Calladine *et al.*, 2004).

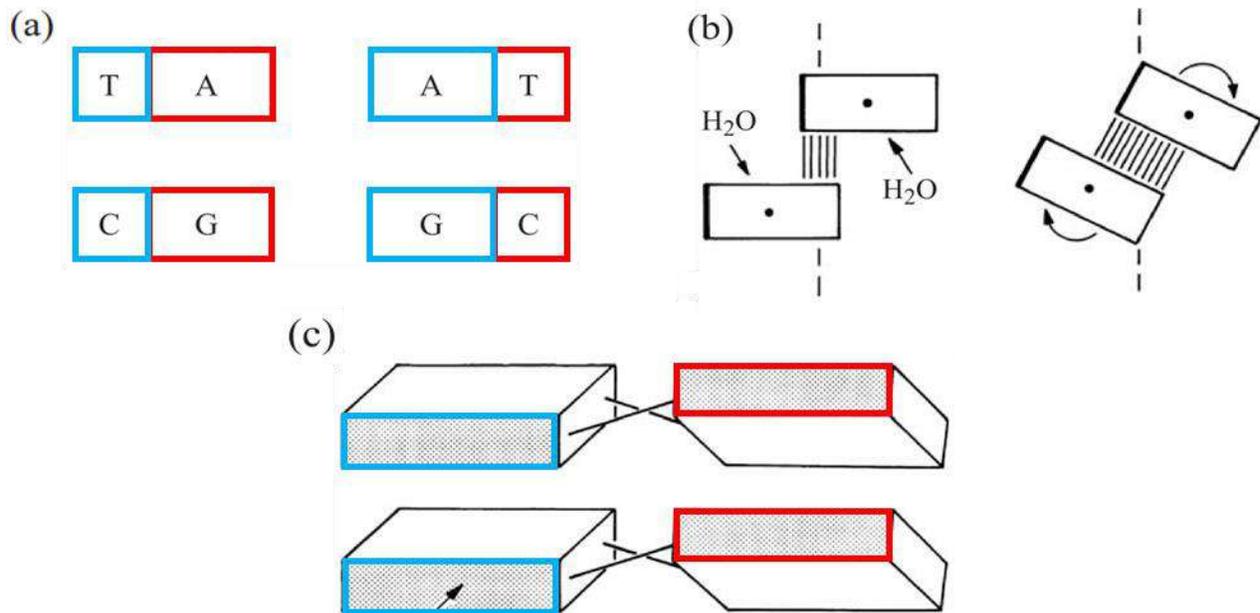


Figura 8. Pares de bases y propeller twist. a) Las 4 combinaciones posibles de pares de bases, resaltadas en azul las pertenecientes a una hebra de DNA y en rojo las pertenecientes a su hebra complementaria. b) Propeller twist, la rotación de bases contiguas en la misma hebra a lo largo de su eje para lograr un mayor solapamiento y disminuir la superficie de contacto con el agua. c) Pares de bases contiguos con propeller twist, una de las hebras (izquierda) gira en sentido contrario a las manecillas del reloj, mientras que la hebra complementaria (derecha) gira en sentido de las manecillas del reloj, nótese que los puentes de hidrógeno entre los pares de bases se distorsionan, pero se mantienen intactos (Modificado de Calladine *et al.*, 2004).

Teóricamente, el apilamiento entre pares de bases se puede describir mediante los llamados 6 grados de libertad de Euler: 3 traslaciones y 3 rotaciones, cada una de estas en un eje diferente (X, Y, Z). Sin embargo, los pares de bases sólo utilizan 3 de estos grados de libertad, 2 rotaciones y 1 translación, debido a los impedimentos estéricos impuestos sobre las bases nitrogenadas por su unión al azúcar y al grupo fosfato. Twist, ya mencionado previamente, consiste en la rotación de un par de bases con respecto a otro en su plano horizontal (fig. 9a). Roll (**R**) define la rotación de la base a lo largo de su propio eje (fig. 9b), análogo a un barril que rueda. El grado de R en el DNA normalmente abarca rotaciones de $+20^\circ$ a -10° . Por convención, R es positivo cuando la base rota en sentido contrario hacia el surco menor, y es negativo cuando rota hacia el surco menor

(explicado más adelante). El último de estos parámetros es slide (**S**), que describe el deslizamiento de un par de bases con respecto a otro a lo largo del eje horizontal (fig. 9c). En el DNA, por lo general este parámetro adopta valores entre $+3\text{\AA}$ y -2\AA , ya que la rigidez del SPB no permite deslizamiento fuera de estos valores. Este se define como positivo cuando el par de bases superior se desplaza hacia la izquierda respecto al par de bases inferior (Calladine *et al.*, 2004).

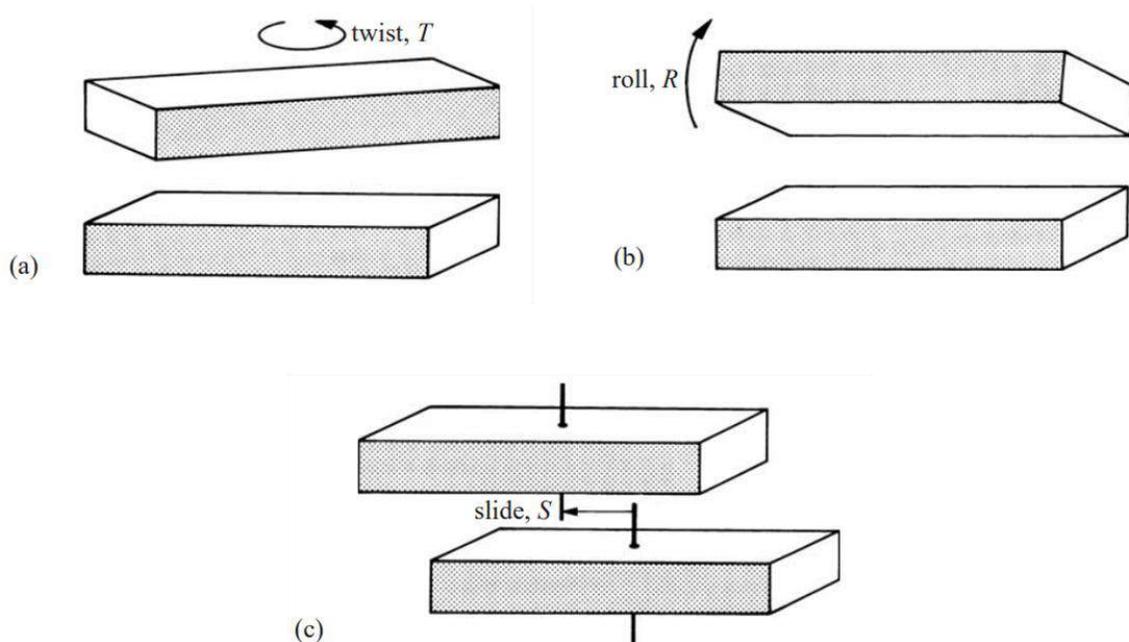


Figura 9. Grados de libertad usados para describir las posiciones de un par de bases con respecto a otro, los movimientos mostrados describen un aumento positivo en twist, roll y slide (Tomado de Calladine *et al.*, 2004)

Estos parámetros se integran para definir una doble hélice dextrógira en la que bases nitrogenadas se encuentran al interior, apiladas y en contacto con ellas mismas, y los fosfatos y azúcares que constituyen el SPB quedan en el exterior en contacto con el solvente. Como se muestra en la figura 10, en esta doble hélice pueden identificarse 2 surcos estructurales, un surco menor y un surco mayor. Las moléculas de azúcar a las que se encuentran unidas los pares de bases se encuentran más cerca del surco menor, mientras que están contrarias al surco mayor (fig. 10b) (Calladine *et al.*, 2004).

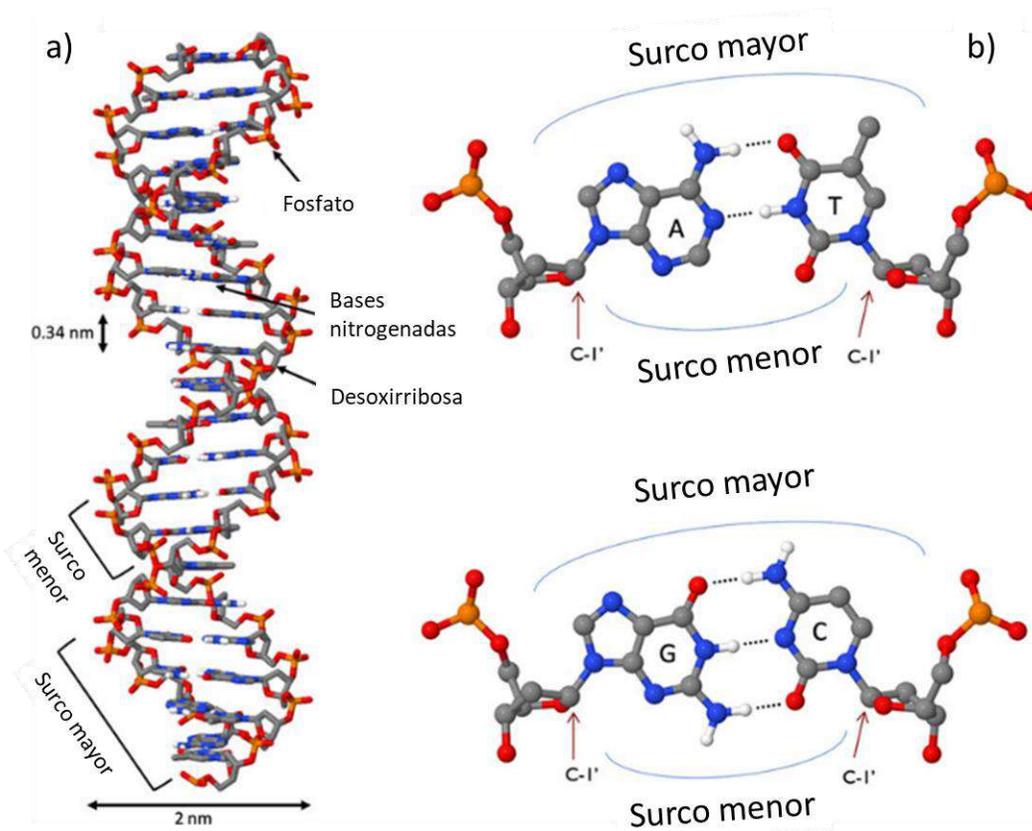


Figura 10. Estructura idealizada de una molécula de DNA. a) Su naturaleza helicoidal genera 2 surcos a lo largo de toda la molécula, un surco mayor y un surco menor. b) Orientación de los pares de bases en relación a los surcos (Tomado de Minchin y Lodge, 2019).

En el apilamiento de bases operan 3 tipos de interacciones fisicoquímicas: interacciones hidrofóbicas, efectos de carga parcial y fuerzas de van der Waals. Estas interacciones dirigen el correcto apilamiento de los pares de bases en proporción al área de contacto de sus superficies insolubles con el agua (Hunter, 1993). Las características globales de una molécula de DNA dependen del apilamiento de las bases al interior, a menos que el DNA sea distorsionado por el contacto con otras moléculas. Sin embargo, es importante considerar que la estructura de una molécula de DNA es una idealización de un promedio amplio de muchos pares de bases sucesivos que tienen diferente T, R y S (Dickerson, 2001). Además, existen otros factores que pueden alterar las configuraciones que adopta la doble hélice, entre las que se encuentra la fuerza iónica del medio y la interacción con proteínas, que pueden producir curvaturas y deformaciones en la geometría de la molécula.

Como cualquier molécula, el DNA adopta una conformación de mínima energía libre altamente favorable, que corresponde a la forma B (fig. 11b) para DNA de secuencia aleatoria. A diferencia de la forma B, la forma A (fig. 11a) es más rígida y menos permisiva a sufrir deformaciones, por lo que el cambio de la molécula a una configuración doblada o distorsionada (como ocurre durante la interacción con proteínas) es energéticamente menos favorable que el cambio correspondiente en la forma B (Hormeño *et al.*, 2011). La doble hélice se hiperenrolla en el espacio tridimensional para disipar el estrés estructural que surge de alterar la estructura básica de la molécula. Como consecuencia de esto se forman hélices de orden superior (hiperenrollamiento), con lo que la molécula vuelve al estado de mínima energía (Bowater, 2001; Aranda-Anzaldo, *et al.*, 2014).

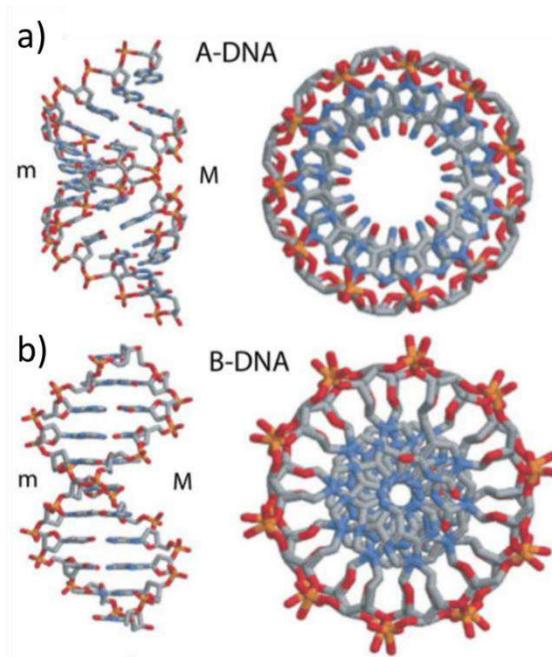


Figura 11. Conformaciones del DNA. a) La forma A del DNA, que es más ancha y corta que la forma B, es la forma favorecida en condiciones de escasa humedad. b) Forma B del DNA, la forma adquirida en condiciones normales. “M” denota al surco mayor y “m” al surco menor (Tomado de Travers y Muskhelishvili, 2015).

Cabe mencionar que los principales factores que determinan la estabilidad de una molécula de DNA son el grado de apilamiento entre los pares de bases y el número de puentes de hidrógeno entre estos pares de bases. Los apilamientos purina/pirimidina (es

decir, una purina seguida por una pirimidina en una misma hebra, o viceversa) son menos estables que los apilamientos purina/purina o pirimidina/pirimidina; mientras que los pares de bases C-G, que forman 3 puentes de hidrógeno, son más estables que los pares de bases A-T que solo forman 2 puentes de hidrógeno. Las secuencias de DNA más inestables, y, por ende, más fáciles de desnaturalizar (separar las hebras) son aquellas que combinan estos dos factores, pocos puentes de hidrógeno, como ocurre en el apareamiento A-T, y apilamientos purina/pirimidina, como consecuencia, el DNA se desnaturaliza más fácilmente en regiones ricas en A/T (Calladine *et al.*, 2004).

Topología del DNA

La doble hélice constituye un polímero o fibra, por lo que posee una longitud de persistencia (L_p), una medida de su rigidez. Esta se define como la longitud máxima a la cual un polímero se comporta como una varilla rígida sin importar el estrés que se le aplique (fig. 12, derecha). Una vez que la molécula de DNA es más larga que su L_p , el estrés estructural al que está sometida causa que se empiece a doblar y a formar bucles (fig. 12, izquierda). Para el DNA, la L_p depende de la secuencia de nucleótidos, secuencias ricas en G-C tienen una mayor longitud de persistencia, mientras que secuencias ricas en A-T tienen una menor longitud de persistencia (Travers, 2004). En promedio, la longitud de persistencia para DNA de secuencia aleatoria es alrededor de 150 pares de bases (bp) (50 nm) (Bednar *et al.*, 1995).

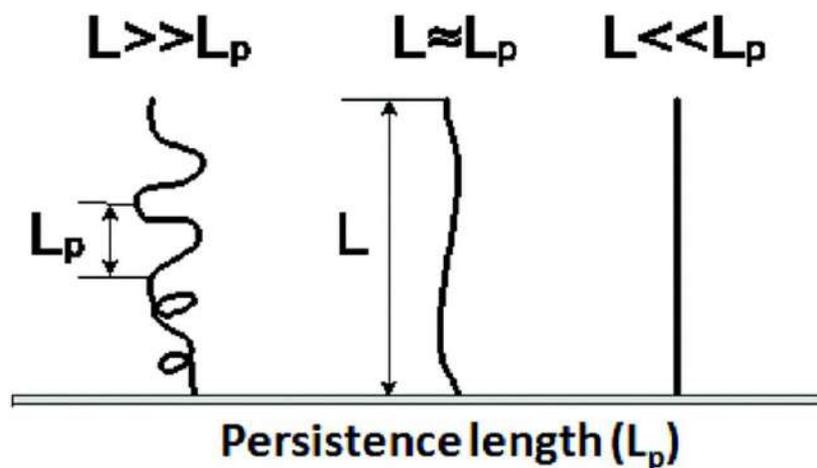


Figura 12. Descripción gráfica del comportamiento de un polímero, como el DNA, a diferentes longitudes, con base en su longitud de persistencia (L_p). Derecha: un polímero cuya longitud (L) es menor que su L_p se comporta como una varilla rígida, sin importar el estrés que se le aplique. Centro: un polímero cuya L es igual a su L_p comenzará a sufrir pequeñas deformaciones. Izquierda: un polímero cuya L excede su L_p sufrirá deformaciones importantes, entre las que se incluyen dobleces y la formación de bucles (Tomado de Rao y Grainger, 2014).

Existe otro parámetro importante que se relaciona con la L_p , la longitud de Kuhn (**K**), definida como la longitud a la que un segmento de un polímero puede articularse libremente de los otros segmentos de dicho polímero, por lo que cada segmento puede orientarse en cualquier dirección independientemente de la dirección tomada por otros segmentos. La K es igual al doble de la L_p , por lo que, para DNA de secuencia aleatoria, K es igual a 300 bp (100 nm) (Peters y Maher, 2010). Con base en esto, se considera que moléculas de DNA con longitudes mayores a 300 bp son capaces de formar círculos (Bates y Maxwell, 2005).

Una molécula o segmento de DNA de secuencia aleatoria nunca es perfectamente lineal, siempre tiene una ligera pero importante curvatura de entre 1° a 3° por giro de la doble hélice. Cualquier objeto que posea una curvatura intrínseca, sin importar la magnitud de esta, está sujeto a estrés de torsión, por lo que dicho estrés es intrínseco a la estructura del DNA. Este estrés representa un problema de integridad para la molécula, ya que siendo un polímero rígido y largo (en metazoarios puede alcanzar longitudes de centímetros), las fluctuaciones en conformación que este adoptaría en el núcleo en condiciones fisiológicas (fig. 13B) desestabilizarían (fig. 13C) y en último término, fragmentarían la molécula (fig. 13D) (Aranda-Anzaldo, 2016). Para preservar la integridad de la molécula dentro del núcleo, el DNA se organiza en bucles hiperenrollados que se estabilizan por su asociación a proteínas (Aranda-Anzaldo *et al.*, 2014).

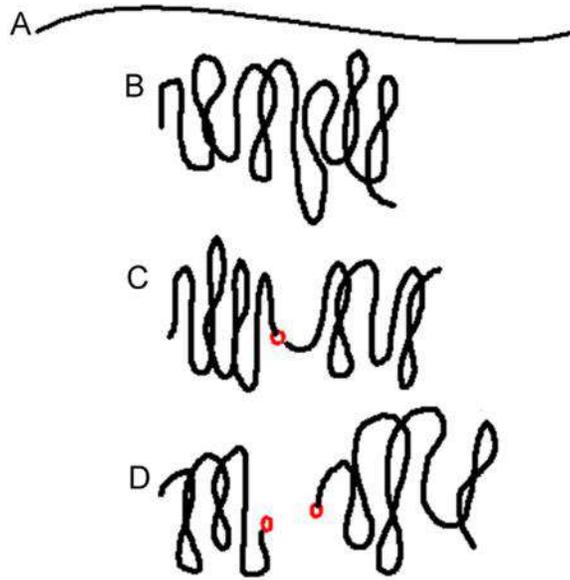


Figura 13. Estrés estructural a lo largo de una molécula de DNA. Un estado extendido (A) para una fibra de DNA en condiciones fisiológicas corresponde con un estado poco probable de baja entropía, por lo que la fibra adopta un estado enroscado al azar (B), que posee una mayor entropía. Cambios locales en los patrones de formación de puentes de hidrógeno (p. ej. apareamiento de bases de Hogsteen) y en la energía de apilamiento de los pasos de pares de bases pueden crear puntos débiles (C) a lo largo de la fibra, donde podrían ocurrir rupturas (D) de la doble hélice como consecuencia de los continuos dobleces y deformaciones inducidos por fluctuaciones en el medio circundante (Tomado de Aranda-Anzaldo, 2016).

El hiperenrollamiento es una propiedad del DNA que se encuentra topológicamente constreñido, es decir, que no tiene extremos libres que puedan rotar. Ocurre cuando la doble hélice se sobrenrolla o subenrolla sobre su propio eje, esto es, al modificar la estructura secundaria añadiendo o quitando vueltas a la hélice, la molécula se estresa porque no posee extremos libres que puedan rotar para aliviar esta tensión, y pasa de ser un “anillo” abierto a un nuevo estado de mínima energía, que es un círculo hiperenrollado (Calladine et al., 2014). En la figura 14 se ejemplifica este fenómeno en una molécula de DNA circular, como la que poseen bacterias, mitocondrias y cloroplastos. Sin embargo, como se explicará más adelante, los largos cromosomas eucariotas son lineales, y forman bucles que son equivalentes desde el punto de vista topológico a la molécula de DNA circular aquí mostrada

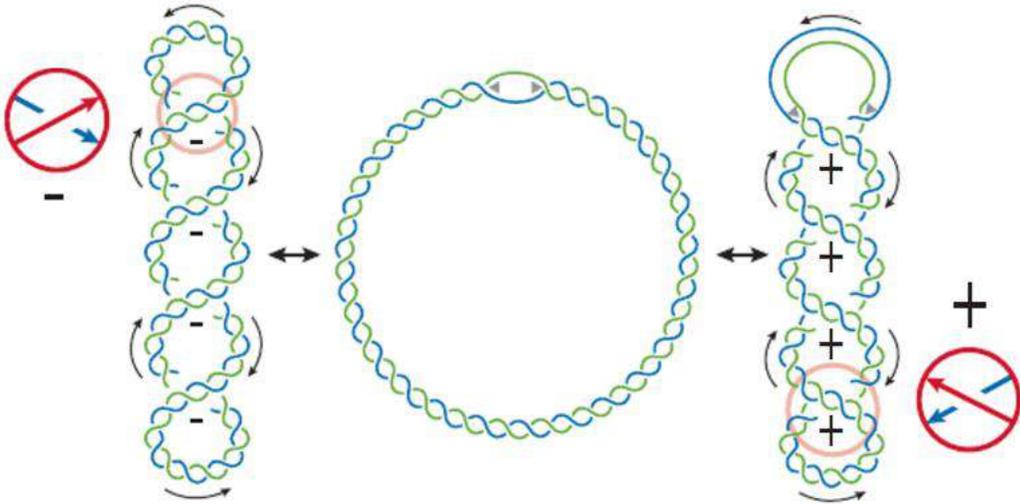


Figura 14. Hiperenrollamiento de una molécula circular de DNA. Cuando la doble hélice se subenrolla (pierde vueltas), la molécula se enrolla sobre su propio eje en sentido contrario a las manecillas del reloj para aliviar la tensión generada por el subenrollamiento, esto se conoce como hiperenrollamiento negativo (izquierda). En el caso contrario, cuando la doble hélice se sobrenrolla (adquiere más vueltas), la molécula se enrolla sobre su eje en el sentido de las manecillas del reloj, lo que se conoce como hiperenrollamiento positivo (derecha) (Tomado de Schvartzman y Stasiak, 2004).

Existen dos parámetros que describen el hiperenrollamiento de una molécula de DNA. El primero de estos es Twist (**Tw**), que indica el número de veces que una hebra de la doble hélice (elegida arbitrariamente) cruza sobre la otra hebra. Para una molécula de DNA relajada $Tw = 0$. Si se introducen giros (es decir, se sobre enrolla) en la doble hélice, Tw adquiere valores positivos, en cambio, cuando se le restan giros a la molécula (es decir, se subenrolla), Tw adquiere un valor negativo. El segundo parámetro es Writhe (**Wr**), que refiere a cuántas veces la doble hélice cruza sobre sí misma a lo largo del plano de la molécula, y equivale a 0 en una molécula relajada. Este valor se define como positivo cuando el cruce es en el sentido de las manecillas del reloj, y negativo en sentido contrario. Tw y Wr son parámetros relacionados, y la suma de estos define el Linking number (**Lk**) (fig. 15). Lk representa la suma algebraica de todas las intersecciones en una molécula de DNA. El Lk para una molécula de DNA relajada es $Lk = 0$, y el cambio en Lk con respecto a 0 denota cambios en el hiperenrollamiento de la molécula. Un Lk positivo indica hiperenrollamiento positivo (es decir, un exceso de vueltas o superenrollamiento de la hélice), mientras que un Lk negativo se entiende como

hiperenrollamiento negativo (es decir, un déficit de vueltas o subenrollamiento de la hélice) (Calladine *et al.*, 2004).

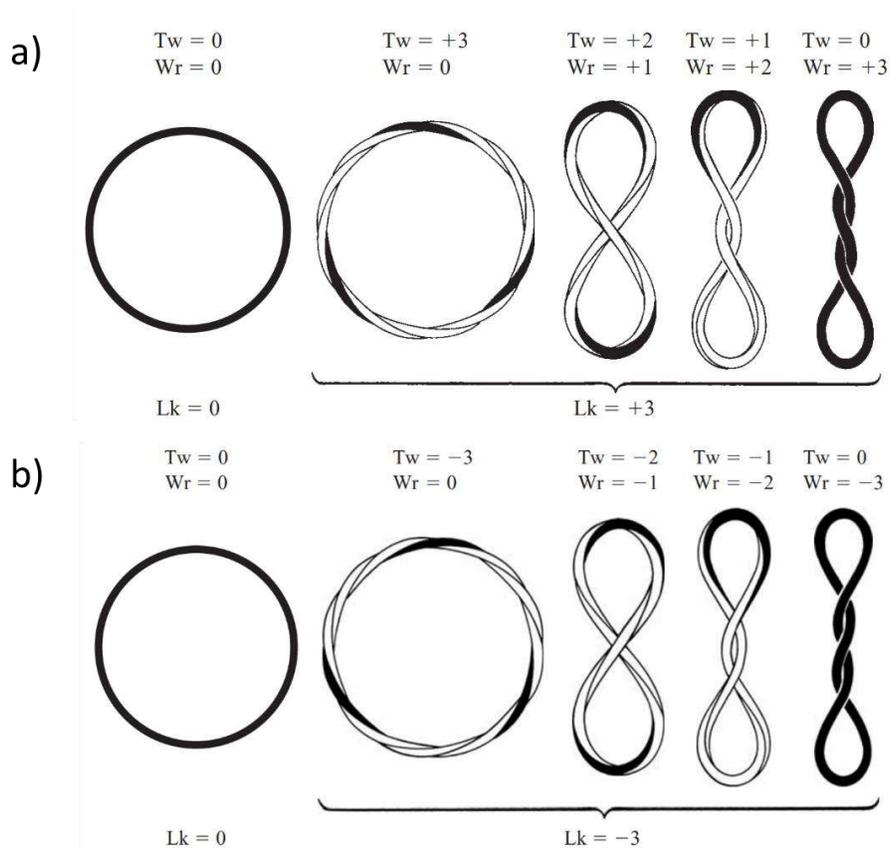


Figura 15. Valores topológicos del DNA. Se muestra un círculo relajado con 2 caras diferentes, una blanca y otra negra, y cómo cambiaría este topológicamente al alterar sus valores de Tw; al adquirir valores positivos, el círculo se encuentra hiperenrollado positivamente (a), mientras que, al adquirir valores negativos, el círculo se hiperenrolla negativamente (b). Nótese cómo a pesar de los cambios en Tw y Wr, el valor de Lk en cada caso permanece constante (Tomado de Calladine *et al.*, 2004).

Es importante entender que Tw y Wr son parámetros complementarios, no independientes el uno del otro. El estudio del DNA con hiperenrollamiento negativo ha demostrado que Wr representa tres cuartas partes del cambio en el Lk, mientras que Tw representa la otra cuarta parte. Esto implica que es más energéticamente favorable responder al aumento de hiperenrollamiento modificando el Wr que alterar el Tw (Lindsley, 2005).

En la naturaleza, la rotación de los extremos del DNA está restringida. Un segmento o molécula de DNA que no posee extremos libres, y, por lo tanto, no puede aliviar el estrés de torsión simplemente rotando, se conoce como dominio topológico. Un ejemplo clásico de dominio topológico es el ya mencionado cromosoma circular presente en bacterias, virus, mitocondrias y cloroplastos, donde los extremos están covalentemente unidos entre sí. En el núcleo, los largos cromosomas lineales se encuentran anclados al subcompartimento nuclear conocido como matriz nuclear (**NM**, **Nuclear Matrix**) formando bucles hiperenrollados (se explicará más adelante), que son equivalentes desde el punto de vista topológico a las moléculas de DNA circular, por lo que cada uno de estos bucles representa un dominio topológico (Mirkin, 2001). En la mayoría de los organismos, el DNA presenta un déficit de T_w , es decir posee hiperenrollamiento negativo. El DNA con hiperenrollamiento positivo sólo se encuentra en procariotas extremófilos que viven a temperaturas muy elevadas (López-García y Forterre, 1997).

Al hiperenrollarse, el DNA puede adoptar dos configuraciones posibles: toroidal (fig. 16a), donde el DNA se enrolla en una serie de espirales alrededor de un anillo o toroide imaginario, y plectonómico (fig. 16b), donde el DNA se enrolla sobre su propio eje una y otra vez. En condiciones fisiológicas, ambos tipos de hiperenrollamiento existen simultáneamente en el DNA (Calladine *et al.*, 2004). A pequeña escala dentro del bucle existe hiperenrollamiento toroidal, pero a gran escala, a lo largo de toda la longitud del bucle, existe hiperenrollamiento plectonómico.

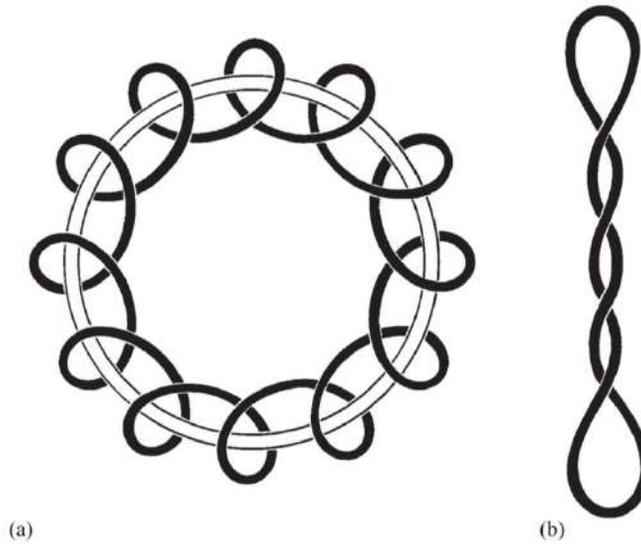


Figura 16. Hiperenrollamiento toroidal (a) y plectonómico (b) (Tomado de Calladine *et al.*, 2004).

El hiperenrollamiento de tipo plectonómico en general es más estable, por lo que, en ausencia de otras fuerzas, el DNA hiperenrollado adopta esta configuración, mientras que cuando se asocia con proteínas como las histonas, se favorece el hiperenrollamiento toroidal. En esta conformación el DNA se curva mucho más y doblarlo implica un mayor estrés sobre la molécula (Calladine *et al.*, 2004).

En el DNA, el hiperenrollamiento representa un estado estresado de alta energía, por lo que la pérdida de hiperenrollamiento es un proceso termodinámicamente favorable (Calladine *et al.*, 2004). Esto da pie a que muchos procesos biológicos aprovechen la energía libre de la pérdida de hiperenrollamiento negativo del DNA para llevarse a cabo; por ejemplo, para desnaturalizar el DNA durante la replicación o la transcripción (Mirkin, 2001). Muchos procesos celulares tendrán alta probabilidad de ocurrir sobre DNA hiperenrollado negativamente. Por otro lado, la energía del hiperenrollamiento puede transmitirse a lo largo del DNA o focalizarse en un sitio determinado si está restringido por medio de su unión a proteínas. La alta energía libre del hiperenrollamiento es lo que lo hace relevante para la célula (Cozzarelli *et al.*, 2006).

Organización del DNA al interior del núcleo

En años recientes, la visión convencional sobre cómo el DNA se organiza al interior del núcleo ha ido modificándose con base en nuevas evidencias y enfoques experimentales. Esta visión, mostrada en los libros de texto, afirma que el DNA se une a las proteínas histonas, formando partículas nucleosomales que constituyen el nivel primario de empaquetamiento del DNA. Posteriormente, estas fibras nucleosomales se compactan mediante interacciones entre las colas de las proteínas histonas de nucleosomas vecinos para formar una densa fibra de 30 nm, que a su vez forma bucles que se anclan por su base a la NM (Alberts *et al.*, 2010). Este concepto asume que la organización nucleosomal típica de la cromatina es suficiente para proteger al DNA de roturas o desenrollamiento espontáneo, además de brindar el nivel primario de empaquetamiento al interior del núcleo. Sin embargo, tanto la dinámica de recambio de proteínas de la cromatina (histonas y no histonas), como su afinidad y modo de unión al DNA (Deal *et al.*, 2010; Hemmerich *et al.*, 2011; Chereji and Morozov, 2015) no son consistentes con la idea de que estas proteínas cumplan un papel primario en este rol. La evidencia actual sugiere un modelo en el cual el hiperenrollamiento natural del DNA asume este papel. Debido a que en el núcleo los telómeros se encuentran unidos a la lámina nuclear, el DNA no tiene extremos libres que puedan rotar (Luderus *et al.*, 1996) por lo que se hiperenrolla, generando bucles fluctuantes a lo largo de la molécula, que se estabilizan mediante su unión o anclaje a conglomerados de proteínas estructurales de la NM (fig. 17). Estas interacciones son de mayor afinidad que las existentes entre las proteínas de la cromatina y el DNA (Aranda-Anzaldo, 2016). La compartimentalización del genoma en dominios topológicos en forma de bucles hiperenrollados anclados a la NM disipa el estrés estructural de forma eficiente a lo largo de toda la molécula sin comprometer la integridad del cromosoma. Así mismo, permite la modificación de la estructura local, como cuando existe algún tipo de daño o modificaciones asociadas a la transcripción o replicación, en cada uno de estos dominios sin afectar la estructura de los dominios contiguos o la estructura global de la molécula (Aranda-Anzaldo, 2016; Aranda-Anzaldo y Dent, 2017). Los bucles de DNA anclados a la NM preservan la integridad del cromosoma, al mismo tiempo que proporcionan el empaquetamiento primario del DNA al interior del volumen nuclear.

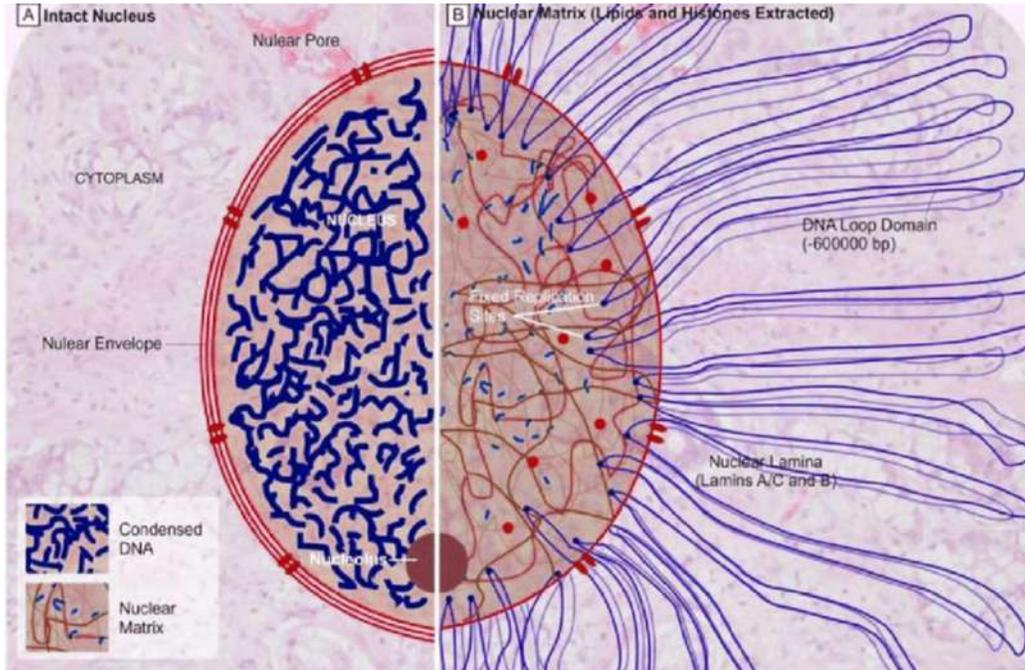


Figura 17. Bucles de DNA anclados a la NM. Del lado izquierdo se esquematiza un núcleo intacto, dentro del cual el DNA se empaqueta densamente. Del lado derecho se muestra este núcleo una vez que se le aplica un tratamiento que remueve la envoltura nuclear y las proteínas de la cromatina. Se observa que el DNA se organiza en bucles anclados por su base a la NM. Estos bucles normalmente se encuentran hiperenrollados, sin embargo, aquí se esquematizan relajados por simplicidad (Tomado de Chemmannur y Chattopadhyay, 2014).

A estos bucles hiperenrollados se unen las proteínas histonas (fig. 18), formando los nucleosomas y otorgando al DNA un nivel adicional de empaquetamiento. Mientras que la unión del DNA a las histonas efectivamente reduce el volumen ocupado por los bucles al inducir la transición de hiperenrollamiento plectonómico a toroidal (Calladine *et al.*, 2004), estas no son necesarias para mantener el hiperenrollamiento, y en la práctica se ha visto que la unión del DNA a estas proteínas requiere la presencia previa de hiperenrollamiento negativo (Pfaffle y Jackson, 1990). Esto sugiere que la energía necesaria para el ensamblaje de los nucleosomas proviene del hiperenrollamiento negativo presente en el DNA, de lo contrario, la célula tendría que gastar una enorme cantidad de energía metabólica para llevar a cabo este ensamblaje (Lusser y Kadonaga, 2004). Por lo tanto, los bucles de DNA parecen ser una precondition necesaria para permitir la organización nucleosomal.

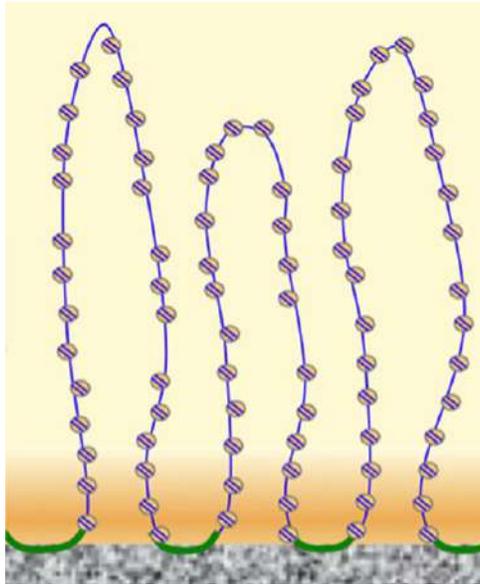


Figura 18. Unión de las histonas a los bucles hiperenrollados de DNA. La unión de estas proteínas reduce el volumen ocupado por el DNA y constriñe el hiperenrollamiento negativo, pero no es necesaria para mantenerlo (Tomado de Rivera-Mulia, 2010).

Los primeros reportes de la fibra de 30 nm se hicieron cuando la cromatina extraída de núcleos fue observada mediante microscopía electrónica (McGhee *et al.*, 1980). Se propuso que esta fibra se forma a partir del plegamiento de una cadena nucleosomal en una estructura helicoidal (solenoides), donde los nucleosomas se enrollan alrededor de una cavidad central, con alrededor de 6 nucleosomas por giro. Estudios posteriores de microscopía electrónica demostraron que en esta fibra los nucleosomas no están acomodados linealmente formando un solenoide, si no que más bien zigzaguean de ida y vuelta, formando una hélice de dos comienzos (Woodcock *et al.*, 1984). A partir de estos resultados, a lo largo de los años se debatió qué conformación era la existente *in vivo*, con evidencia que apoyaba una u otra forma, e incluso se argumentaba si esta fibra existía en condiciones naturales, ya que toda la evidencia a favor de la fibra de 30 nm se obtuvo de experimentos *in vitro* (Razin y Gavrillov, 2014). El uso de técnicas sofisticadas, como hibridación fluorescente *in situ* (FISH), sugiere que la cromatina se encuentra más compacta de lo que se podría lograr en una fibra de 30 nm (Belmont *et al.*, 2011), por lo que es probable que la cromatina en realidad se encuentre plegada mediante la condensación lateral de fibras nucleosomales de 10 nm en una estructura compacta que

los libros de texto habitualmente muestran como una posible configuración de la heterocromatina (fig. 19). La interacción entre fibras de 10 nm puede ser estabilizada mediante las interacciones entre nucleosomas pertenecientes a diferentes fibras (Peppenella *et al.*, 2013). Hasta recientemente, no existía una técnica experimental que permitiera visualizar la trayectoria del DNA dentro del núcleo celular intacto, esto se resolvió combinando espectroscopía electrónica y tomografía de haz electrónico. Utilizando esta técnica, la única estructura observada regularmente, tanto en regiones de eucromatina como de heterocromatina, fueron las fibras nucleosomales de 10 nm. Aparentemente, ambas regiones de la cromatina están compuestas de fibras de 10 nm densamente empaquetadas, sin indicios de que existan fibras de 30 nm. El nivel de compactación era mayor en la regiones de heterocromatina, sin embargo, esto se logra mediante un empaquetamiento más denso de las fibras de 10 nm, no por su plegamiento en una estructura regular como sería la fibra de 30 nm (Fussner *et al.*, 2012).

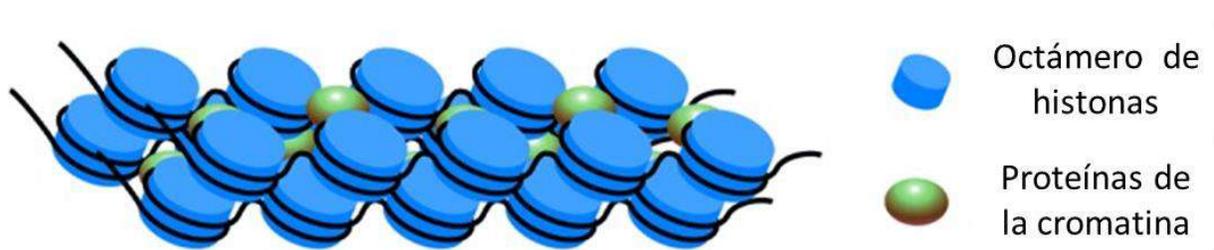


Figura 19. Empacamiento de las fibras nucleosomales de 10 nm. La cromatina se encuentra densamente empaquetada, dicho grado de empaquetamiento puede variar entre distintas regiones de cromatina (Tomado de Razin y Gavrillov, 2014).

Experimentos posteriores utilizando criotomografía electrónica demostraron que no existe regularidad en el empaquetamiento de orden superior de la fibra nucleosomal, la cromatina interfásica parece más bien consistir de un ensamblaje desordenado de nucleosomas (Gan *et al.*, 2013). En el núcleo celular intacto no se encontró evidencia de un plegamiento jerárquico de la cromatina (fig. 20), como sería la fibra de 30 nm (Razin y Gavrillov, 2014), y la cromatina más bien parece consistir de fibras nucleosomales densamente empaquetadas y desordenadas, mejor descrito por el modelo “polymer melt” (Gan *et al.*, 2013).

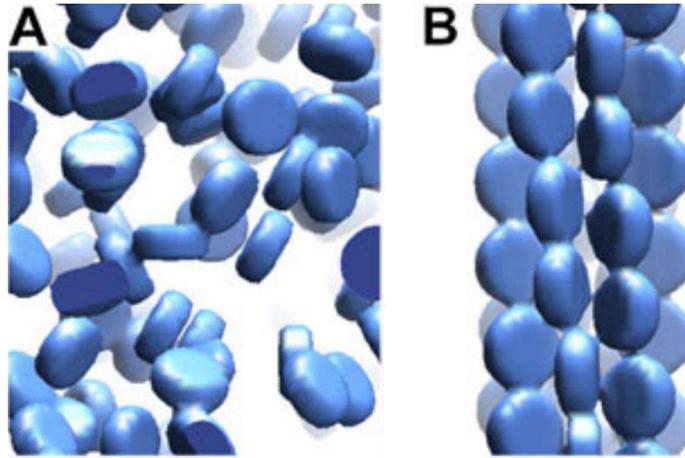


Figura 20. Representación esquemática de la disposición de los nucleosomas en la cromatina (no se muestra el DNA). A) Modelo “polymer melt” de la cromatina, donde los nucleosomas se encuentran altamente desordenados. B) Modelo de la fibra de 30 nm solenoide habitualmente mostrado en los libros, donde los nucleosomas se encuentran ordenados alrededor de un mismo eje (Tomado de Gal *et al.*, 2013).

Matriz nuclear

La matriz nuclear se define operacionalmente como la subestructura o compartimiento nuclear que resulta de extraer el núcleo con alta concentración de sales, detergente no iónico y DNasa I (Nickerson, 2001; Tsutsui *et al.*, 2005). Originalmente considerada como una especie de jaula o estructura fija y estable (Berezney y Coffey, 1974; He *et al.*, 1990), el consenso actual es que la NM es un compartimento dinámico y difuso, que interviene en la organización estructural y funcional del núcleo celular (Tsutsui *et al.*, 2005). Se ha identificado un conjunto de 300 proteínas pertenecientes a la NM comunes a todos los tipos celulares (Engelke *et al.*, 2014), así como también proteínas que son específicas de cada tipo celular, como NeuN, específica de la NM neuronal (Fey y Penman, 1988; Stuurman *et al.*, 1990; Dent *et al.*, 2010). Además de estas proteínas, su composición también consta de ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos (Berezney y Coffey, 1974), complejos residuales del poro nuclear y un nucleolo residual altamente condensado (fig. 21) (Berezney y Coffey, 1977; Pienta y Coffey, 1984; Nickerson, 2001).

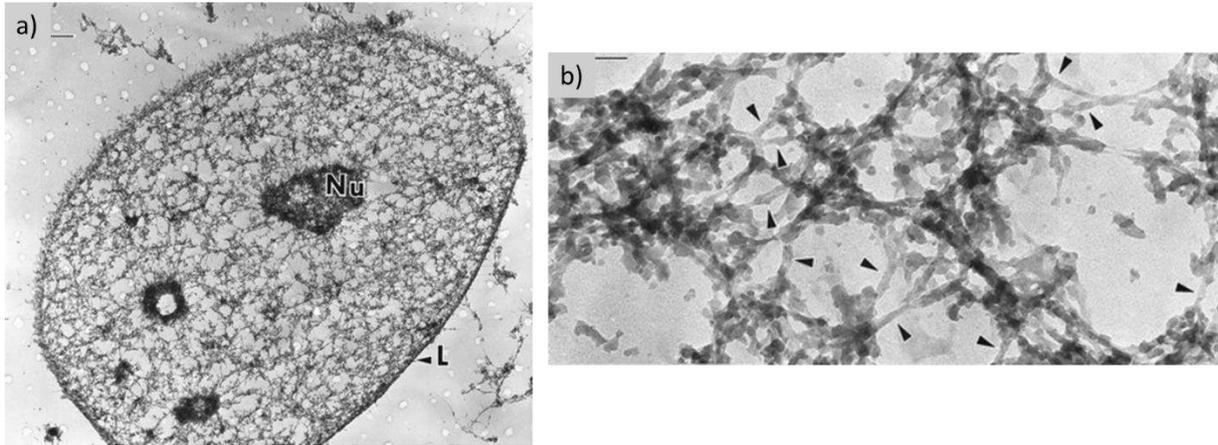


Figura 21. La matriz nuclear. a) Micrografía de NM, resalta un nucleolo residual (Nu) central, la lámina nuclear (L). b) Amplificación que muestra en detalle el conjunto de ribonucleoproteínas de NM, señalada por flechas negras (Tomado de Nickerson, 2001).

El análisis por tomografía microscópica electrónica de la NM revela la presencia de varias plataformas de andamiaje locales dentro del núcleo (fig. 22) en lugar de una malla continua que abarca todo el volumen nuclear (Engelke *et al.*, 2014). Este hallazgo es congruente con la noción de una NM bastante dinámica, en lugar de una estructura similar a una jaula. Hay evidencia de que procesos cruciales, como la replicación, ocurren en complejos asociados u organizados con respecto a la NM (Mortillaro *et al.*, 1996, Berezney y Wei, 1998). Esta estructura permite el acoplamiento mecánico entre la cromatina, el citoesqueleto, la matriz extracelular y las células vecinas (Aranda-Anzaldo, 1989; Wang *et al.*, 2009).

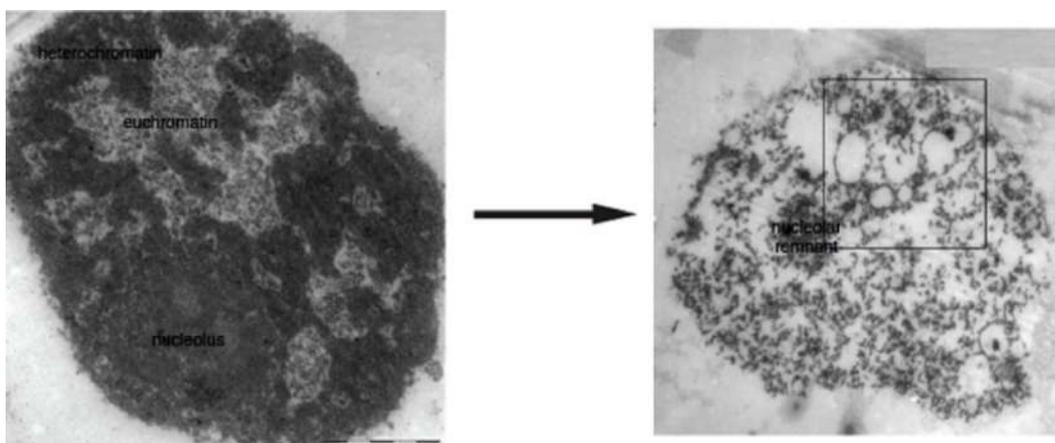


Figura 22. La matriz nuclear. Izquierda: núcleo donde se pueden apreciar regiones de eucromatina, heterocromatina y un nucleolo de gran tamaño. Derecha: matriz nuclear, con diversas regiones de andamiaje dispersas dentro del volumen nuclear (Tomado de Engelke *et al.*, 2014).

La estructura nuclear de orden superior

Los bucles de DNA se encuentran anclados a la NM por medio de secuencias cortas no codificantes, de entre 50 a 200 bp (Cockerill y Garrard, 1986), denominadas regiones de unión a la matriz o MARs (**M**atrix **A**ttachment **R**egions) (Boulikas, 1996; Razin, 2001). No existen secuencias consenso para los MARs, sin embargo, contienen regiones ricas en A-T (Mirkovitch *et al.*, 1984) y secuencias repetitivas, además, se mapean a regiones donde el DNA tiene una mayor tendencia a doblarse y desnaturalizarse (Ottaviani *et al.*, 2008). La ausencia de secuencias consenso sumado al hecho de que hay de cientos a miles de potenciales MARs en un solo cromosoma, sugiere que las interacciones DNA-NM no dependen de un reconocimiento directo entre nucleótidos específicos con aminoácidos de una proteína de unión al DNA específicos, si no que se trata de un reconocimiento indirecto que depende de la topología local y global de las moléculas interactuantes (Zhang *et al.*, 2004; Koudelka *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2012). Estimando una densidad de un MARs cada 30 kilopares de bases (**kbp**, **kilobase pairs**) en el genoma de mamífero promedio, el genoma humano posee de 150 000 a 200 000 potenciales MARs en un momento dado (Boulikas, 1996). Sin embargo, no todos se encuentran unidos simultáneamente a la NM, incluso cuando existen múltiples copias de un mismo MARs, lo que indica una selectividad especial sobre los MARs que se unen a la NM (Maya-Mendoza *et al.*, 2005). Se ha propuesto que esta selectividad está determinada por 3 factores: la afinidad entre el potencial MARs y el sitio de unión en la NM, el grado del impedimento estérico impuesto por la densidad relativa de sitios de unión posibles en la NM y la rigidez del DNA, determinada por su longitud de persistencia (Aranda-Anzaldo, 1989) y, por último, el grado de estrés de estructural a lo largo de la molécula, que determina la topología local y global del DNA. Cualquier potencial MARs podrá unirse a la NM con base en estos 3 factores (Aranda-Anzaldo, 2009).

In situ, los MARs han sido operacionalmente clasificados en 2 grupos: estructurales/constitutivos, que resisten la extracción con alta concentración de sales, y

facultativos/transitorios, que no resisten dicha extracción (Razin, 2001; Maya-Mendoza *et al.*, 2003), por lo que los bucles resultantes de dichas interacciones también pueden clasificarse como estructurales o facultativos. Los MARs estructurales/constitutivos también se conocen como regiones de anclaje de bucle o LARs (Loop Anchorage Regions).

Los bucles estructurales hiperenrollados formados por los LARs y la NM a la que se encuentran anclados (fig. 23) definen una estructura nuclear de orden superior (**NHOS**, **Nuclear Higher Order Structure**) (Aranda-Anzaldo, 2009). Dicha estructura es totalmente independiente de proteínas de la cromatina como las histonas o factores regulatorios, evidenciado por el hecho de que la extracción con alta concentración de sales elimina estas proteínas, y, sin embargo, los bucles permanecen topológicamente constreñidos e hiperenrollados (Verheijen *et al.*, 1986).

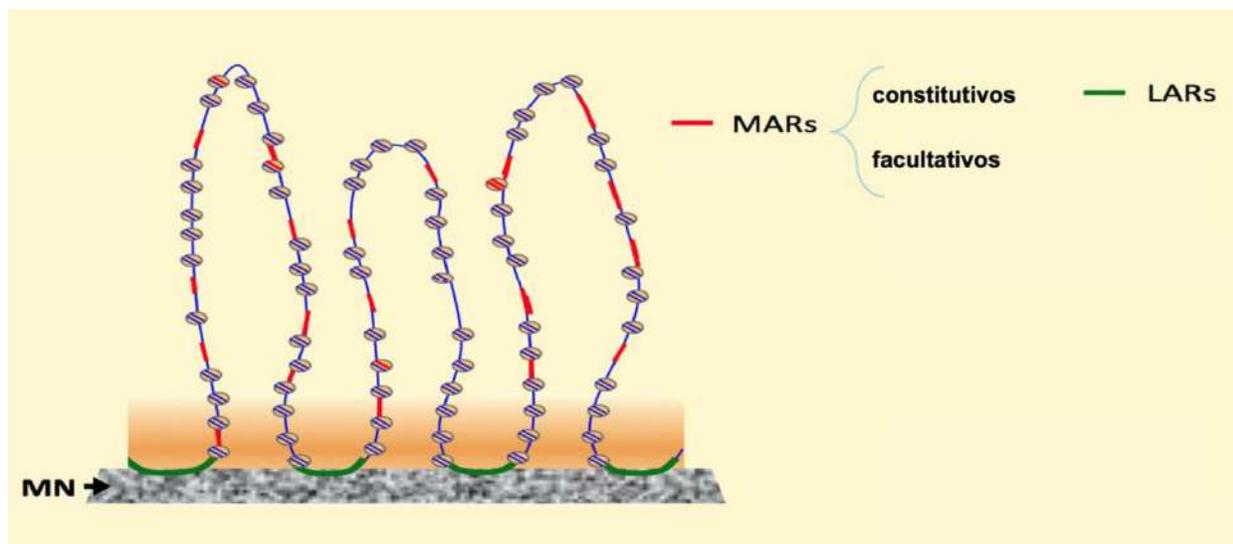


Figura 23. Estructura nuclear de orden superior. Las moléculas de DNA cromosómico poseen muchos potenciales sitios de unión a la matriz (MARs, resaltados en rojo). Los bucles hiperenrollados se encuentran anclados a la NM (en gris) mediante MARs constitutivos, también conocidos como regiones de anclaje de bucle (LARs, resaltados en verde) (Tomado de Rivera-Mulia, 2010).

Propiedades de la NHOS

La evidencia experimental indica que la NHOS, definida por el patrón promedio de interacciones estructurales DNA-NM, es específica del tipo celular (Rivera-Mulia y

Aranda-Anzaldo, 2010; Trevilla-García y Aranda-Anzaldo, 2011, 2012). Considerando que cada célula de un organismo contiene las mismas secuencias de nucleótidos en sus cromosomas, la causa probable de estas diferencias es la composición proteica de la NM, recordando que existen proteínas de NM específicas de tejido (Dent *et al.*, 2010) que podrían interactuar de manera diferencial con el DNA.

Así mismo, se ha visto que la NHOS es especie-específica. Es decir, en un mismo tejido, en especies estrechamente relacionadas (rata y ratón), el patrón promedio de interacciones estructurales entre el DNA y la NM no está conservado, generando una organización de bucles distinta (Silva-Santiago *et al.*, 2017). A pesar de que existe sintenia a gran y pequeña escala entre los genomas del ratón y la rata, los bloques sinténicos se disponen en un orden distinto en el cariotipo de estas especies. Esto resulta en moléculas de DNA con distintas flexibilidades a un nivel local y global, lo que las restringe a distintas conformaciones topológicas, resultando en afinidades distintas por la NM y, por ende, interacciones estructurales diferentes.

Además, la NHOS es una estructura altamente dinámica, cuyo cambio se asocia con el estado de diferenciación celular y con la edad (Aranda-Anzaldo, 2009; Alva-Medina *et al.*, 2010). La evidencia experimental indica que dicha estructura se vuelve más estable en función del tiempo. En una célula joven o en una célula que no está terminalmente diferenciada, existen bucles de DNA más largos y una menor cantidad de uniones a la NM (fig. 24a), y conforme la célula envejece o se vuelve terminalmente diferenciada, va adquiriendo bucles cortos y abundantes (fig. 24c) (Alva-Medina *et al.*, 2010, 2011). Se piensa que la estabilización continuada de la NHOS depende de 2 factores. El primero es el incremento de componentes de la NM (p. ej. láminas A) en función del tiempo, aumentando el número de posibles sitios de unión a la NM (Ivanovic-Matic, 2000). El segundo se relaciona con el modelo de envejecimiento celular de pérdida de la heterocromatina (**HLMCA**, **H**eterochromatin **L**oss **M**odel of **C**ell **A**geing), donde la heterocromatina adquiere estados menos condensados conforme la célula envejece (Villeponteau, 1997), lo que expone potenciales MARs que previamente se encontraban inaccesibles, creando nuevos potenciales sitios de unión en el DNA. La estabilización continuada de la NHOS disipa el estrés estructural cada vez más a lo largo de los

cromosomas, satisfaciendo la segunda ley de la termodinámica, ya que la energía de las moléculas de DNA se encuentra dispersa de manera más uniforme a lo largo del volumen nuclear (Alva-Medina *et al.*, 2010). Es probable que la estructura continúe estabilizándose hasta que no quede estrés estructural por disipar (Alva-Medina *et al.*, 2011). Esta tendencia al incremento de interacciones DNA-NM en función del tiempo resulta en un núcleo estable.

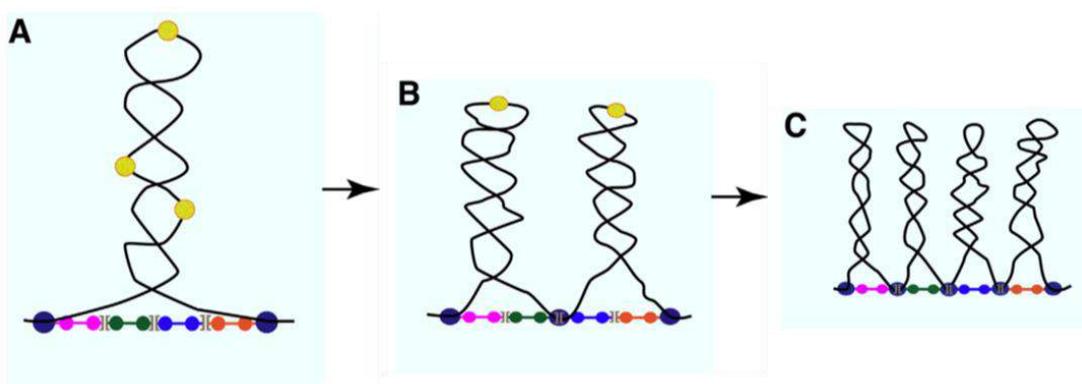


Figura 24. Representación gráfica de la estabilización continuada de la NHOS en función del tiempo. A) En una célula joven, muchos de los potenciales MARs (círculos amarillos) no se encuentran unidos a los componentes de la NM (barras de colores), existiendo así bucles grandes y heterogéneos en tamaño. B) Con el paso del tiempo, de manera estocástica, uno de los potenciales MARs se actualiza a LARs, anclándose a la NM, creando así bucles cortos y menos heterogéneos en tamaño. C) En la célula vieja, la mayor parte de los potenciales MARs se han actualizado a LARs, anclándose a la NM, por lo que existen muchos bucles pequeños y homogéneos en tamaño, disipando el estrés estructural de manera uniforme (Modificado de Aranda-Anzaldo *et al.*, 2014).

NHOS y replicación del DNA

Existe evidencia que apoya la hipótesis de que cada bucle estructural en la NHOS corresponde a un replicón (Razin, 2001), la unidad fundamental de replicación del genoma. Se piensa que las fábricas de replicación, complejos macromoleculares de gran tamaño donde se lleva a cabo la replicación, se encuentran fijas en lugares específicos asociados con la NM (Berezney y Buchholtz, 1981; Hozák *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1998). La evidencia experimental sugiere un modelo de carrito en el cual el DNA se desplaza hacia el interior de la NM, pasando a través de las fábricas de replicación (Rivera-Mulia *et al.*, 2011; Castillo-Mora y Aranda-Anzaldo, 2012) y generando dos bucles hijos idénticos que posteriormente se separan durante la mitosis (fig. 25).

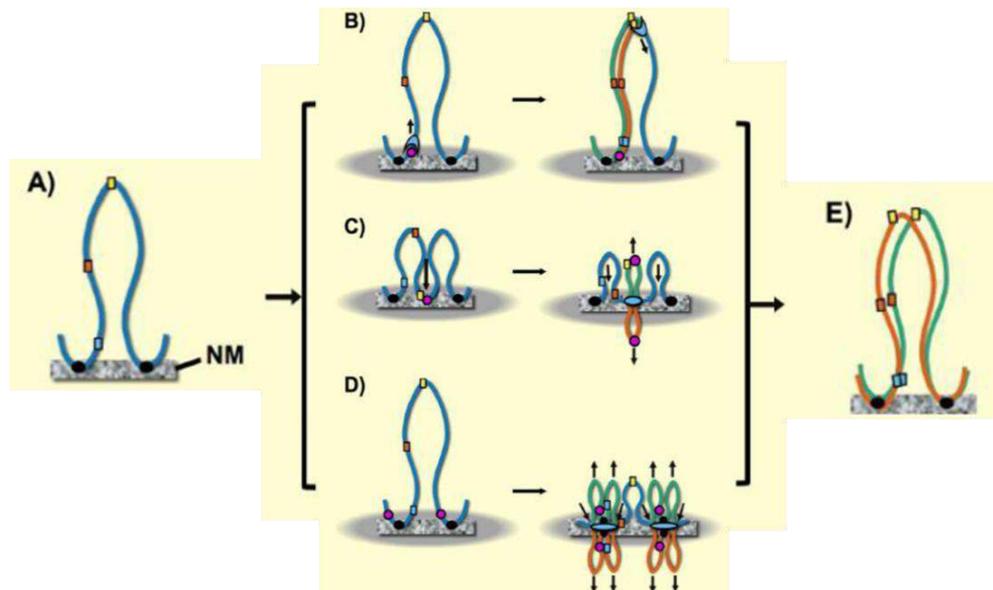


Figura 25. Posibles mecanismos para la replicación del DNA in vivo. A) Bucle estructural de DNA anclado a la NM. B) Modelo clásico de seguimiento de la replicación, en el que la fábrica de replicación se mueve a lo largo de la molécula de DNA, creando una molécula hija conforme avanza. C) Modelo de carrito de la replicación, en el cual el origen de replicación (OR) se encuentra en la punta del bucle, la cual se arrastra hacia el interior de la NM, pasando a través de las fábricas de replicación y generando una molécula hija conforme pasa. D) Modelo de carrito de la replicación, en el cual los OR se encuentran en los extremos de los LARs que anclan el bucle a la NM, por lo que el bucle se arrastra desde ambos extremos de su base hacia el interior de la NM, pasando a través de las fábricas de replicación en cada extremo, creando una molécula hija conforme atraviesa. E) Bucles de DNA hijos generados después de la replicación, ambos anclados a la NM (Tomado de Rivera-Mulia *et al.*, 2011).

NHOS y senescencia celular

Previamente se ha propuesto un modelo de senescencia celular estructural ligada a la NHOS (Aranda-Anzaldo, 2009). Este modelo sugiere que, debido a la estabilización continuada de la NHOS, la energía requerida para desestabilizar la NM, y, por ende, el núcleo, mediante modificaciones químicas transitorias (p. ej. fosforilación), eventualmente será insuficiente, ya que la energía celular es limitada. Debido a esto, resulta imposible desensamblar el núcleo y, pese a que la replicación del genoma ya se llevó a cabo, la célula no se divide y por lo general muere por apoptosis o se vuelve poliploide (Aranda-Anzaldo, 2009; Aranda-Anzaldo y Dent, 2017) (fig. 26).

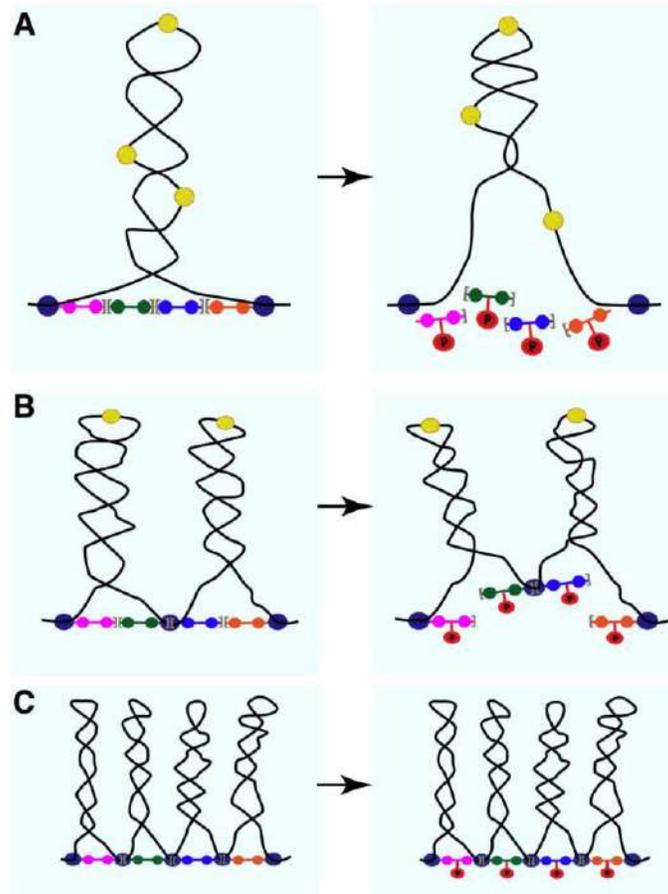


Figura 26. Modelo de senescencia estructural. A) En una célula joven o que no está terminalmente diferenciada, el total de las interacciones estructurales entre el DNA y la NM no poseen suficiente energía en conjunto para imponer una barrera energética al desensamblaje del núcleo mediado por la fosforilación (círculos rojos) de los componentes de la NM, por lo que, durante la mitosis, el núcleo decae y la célula madre puede segregar su DNA entre las dos células hijas. B) Conforme la célula envejece, potenciales MARs previamente no unidos se unen a la NM, actualizándose a LARs y estabilizando más el sistema, sin embargo, esta estabilidad aún no impone una barrera energética inalcanzable para la célula. C) En una célula envejecida o terminalmente diferenciada, las interacciones estructurales DNA-NM en conjunto poseen una energía tan elevada que la energía metabólica disponible en la célula no es suficiente para desestabilizar el núcleo, por lo que la célula pierde su capacidad de dividirse, independientemente de su capacidad para replicar el DNA (Tomado de Aranda-Anzaldo *et al.*, 2014).

Nucleoides

La NHOS puede estudiarse en un modelo conocido como nucleoide, que consiste de los bucles estructurales de DNA desnudos hiperenrollados negativamente anclados a la NM (fig. 27). Estos se obtienen tratando células con detergente no iónico, que remueve la

membrana plasmática y la envoltura nuclear, y con alta concentración de sales, que remueve todas las proteínas de la cromatina (Woodcock y Gosh, 2010).

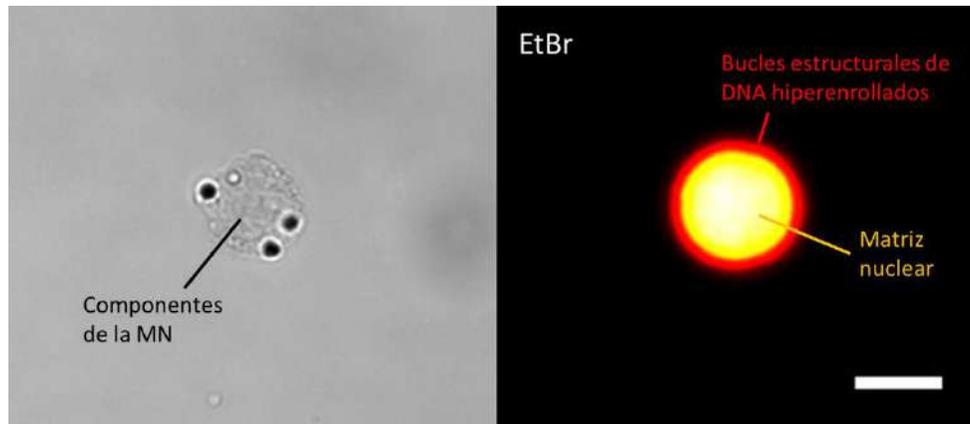


Figura 27. Nucleoide. Izquierda: se muestra un nucleoide en microscopía de contraste de fases. Debido a que en este tipo de microscopía no es posible observar el DNA, lo que realmente se observa son los componentes proteicos de la NM. Derecha: se muestra el mismo nucleoide en microscopía de fluorescencia con EtBr, donde se observan los bucles hiperenrollados (rojo) y el DNA presente en el área de la NM (amarillo). Barra: 15 μ m.

Una observación clásica de estas preparaciones es que, una vez que se les agrega bromuro de etidio (**EtBr**, **Ethidium Bromide**) y se visualizan bajo microscopía de fluorescencia, se observa la formación de un halo de DNA alrededor de la NM (Cook *et al.*, 1976; Roti-Roti y Wright, 1987) (fig. 28). Previo a su interacción con el EtBr, el DNA anclado posee hiperenrollamiento negativo, sin embargo, la interacción entre estas moléculas promueve la pérdida del hiperenrollamiento en el DNA. Esto mediante un mecanismo en el cual EtBr se intercala entre los pares de bases expuestos a través del surco menor (Galindo-Murillo y Cheatham III, 2021), donde mecánicamente induce la pérdida progresiva del hiperenrollamiento y por lo tanto la expansión de los bucles de DNA anclados a la MN, mismos que forman el halo fluorescente.

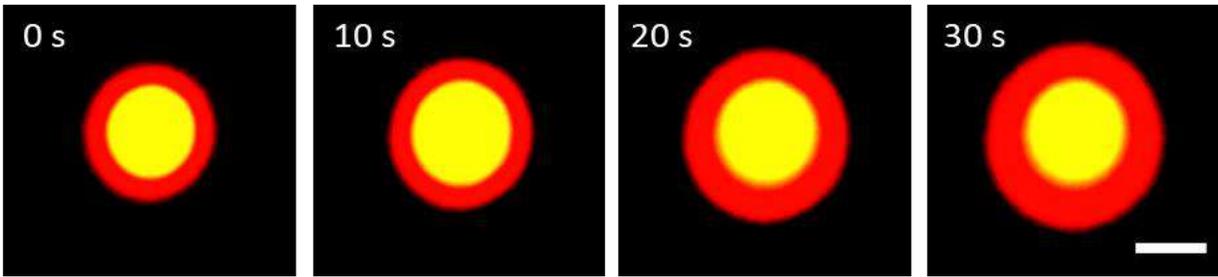


Figura 28. Ensayo de expansión del halo. Se muestra en microscopía de fluorescencia el crecimiento del halo de DNA (rojo) alrededor de la NM (amarillo) a lo largo de 30 s, tiempo suficiente para que el halo alcance su máxima capacidad de expansión. Barra: 15 μm .

Es posible evaluar la integridad de los bucles de DNA y sus interacciones con la NM mediante ensayos de sedimentación de nucleoides. Los nucleoides que han perdido su hiperenrollamiento, sea por su interacción con EtBr o por roturas en las cadenas de DNA, tendrán una conformación menos compacta y, por ende, un coeficiente de sedimentación (velocidad de sedimentación de una partícula) menor, en comparación a nucleoides que poseen DNA hiperenrollado y una conformación más compacta. Si estos ensayos se llevan a cabo en presencia de EtBr a baja concentración (20 $\mu\text{g/ml}$), en principio, los bucles perderán su hiperenrollamiento negativo natural y se relajarán, reduciendo su coeficiente de sedimentación. Al aumentar la concentración de EtBr (80 $\mu\text{g/ml}$), los nucleoides que poseen bucles íntegros adquirirán hiperenrollamiento positivo, debido a que el DNA no puede girar para aliviar la tensión generada por una concentración tan elevada de EtBr, aumentando nuevamente su coeficiente de sedimentación (fig. 29a). Así, estos ensayos proporcionan información acerca de la integridad de la doble hélice y las interacciones DNA-NM (Aranda-Anzaldo *et al.*, 1999). Esto es importante porque existen varios factores físicos y químicos que pueden dañar el DNA, como la radiación y radicales libres. Debido a la importancia estructural y fisiológica de la NHOS, la reparación del DNA no puede limitarse sólo al mantenimiento de la integridad de la doble hélice, también debe incluir la recuperación de las relaciones topológicas adecuadas entre los bucles de DNA y la NM, ya que como se mencionó previamente, procesos cruciales como la replicación, la transcripción y el procesamiento del RNA ocurren en sitios específicos asociados con respecto a la NM (Jackson y Cook, 1985; Mortillaro *et al.*, 1996, Berezney y Wei, 1998).

Cuando se observan bajo microscopía de fluorescencia con EtBr, el halo formado por los bucles de DNA puede medirse utilizando una escala equivalente, y se ha establecido que la medida del radio del halo equivale a la medida del bucle promedio desde su base hasta su punta (fig. 29b) (Razin *et al.*, 1995), por lo que la longitud real del bucle corresponde al doble del radio. El promedio del radio ha sido reportado de 16.63 μm en hepatocitos de rata adulta (Maya-Mendoza *et al.*, 2005), por lo que la longitud total promedio del bucle es de 33.26 μm . Utilizando el factor de conversión para DNA relajado de 0.34 $\mu\text{m}/1000$ pares de bases (**bp**, base pairs; Smith y Wood, 1992), la longitud del bucle desde su base hasta su punta equivale a 48.9 kbp (1 kbp=1000 bp), por lo que la longitud total del bucle es de 97.8 kbp.

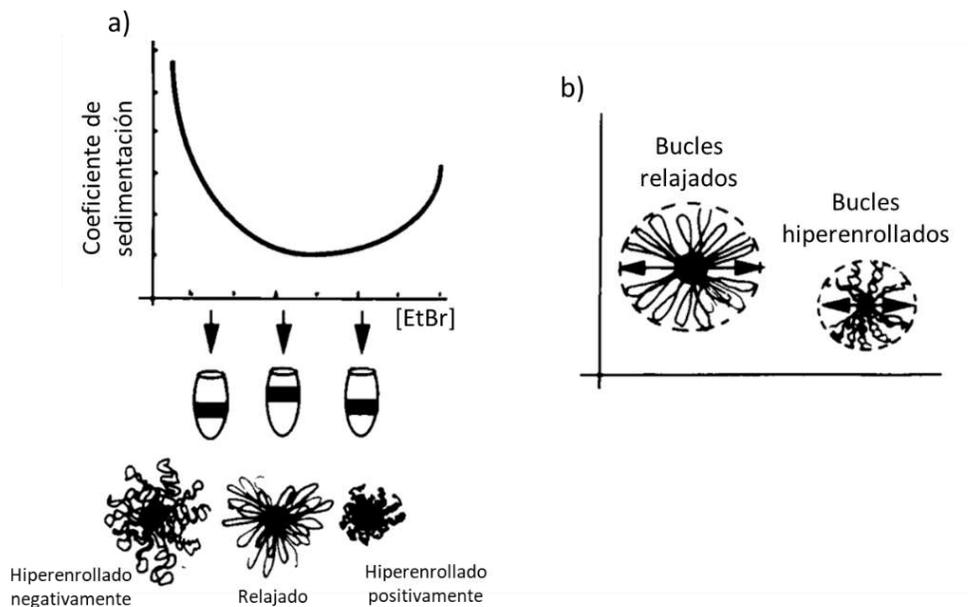


Figura 29. Ensayo de sedimentación de nucleoides (a) con representación del estado del hiperenrollamiento de los bucles en cada punto de la gráfica y medición de los bucles (b) para determinar la longitud promedio de los bucles (Tomado de Razin *et al.*, 1995).

DNA como componente estructural del núcleo

La evidencia muestra que cambios en la morfología del núcleo alteran la ubicación y estabilidad de las interacciones entre el DNA y la NM (Martínez-Ramos *et al.*, 2005). Al cultivar células HeLa con concentraciones crecientes (0.5, 1, 2%) del solvente polar aprótico dimetilsulfóxido (DMSO) estas adquieren una morfología elongada, similar a un

fibroblasto (fig. 30B), la cual es notablemente distinta a su habitual morfología tetraédrica, romboidal (fig. 30A). Este cambio morfológico también se observa a nivel del NM, que adquiere una morfología fusiforme (fig. 30D). Al visualizar los nucleoides extraídos de las células tratadas en microscopia de fluorescencia, estos no forman el halo de DNA relativamente uniforme que forman las células HeLa (fig. 30E), más bien forman un “cometa” de DNA que se proyecta desde la NM (fig. 30F). Además, el fondo de los campos observados presenta fluorescencia naranja, lo que sugiere que las interacciones entre el DNA y la NM se labilizaron y parte del DNA se liberó de la NM.

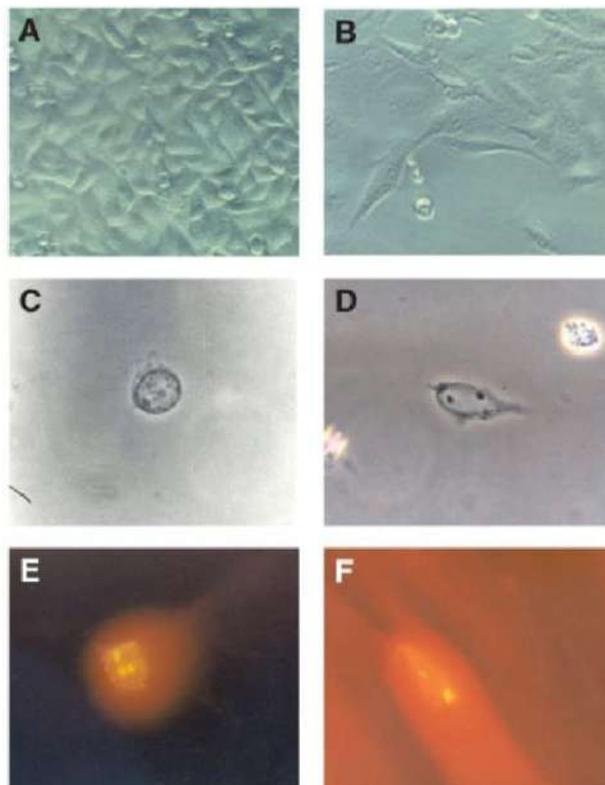


Figura 30. Células HeLa y células tratadas con DMSO. A) Morfología habitual de células de HeLa. B) Morfología de células de HeLa tratadas durante 6 semanas con 2% DMSO. C) Micrografía de contraste de fases mostrando la típica morfología redonda de la MN de una célula de HeLa control. D) Micrografía de contraste de fases que muestra la morfología fusiforme de la NM de una célula de HeLa tratada durante 6 semanas con 2% DMSO. E) Micrografía de fluorescencia de un nucleoide control tratado con EtBr 40 mg/ml, nótese la formación de un halo homogéneo de DNA relajado alrededor de la NM. F) Micrografía de fluorescencia de un nucleoide incubado durante 6 semanas con 2% DMSO al tratarse con EtBr 40mg/ml, nótese la formación de una “cola de cometa” alrededor de la NM y el fondo naranja que indica la presencia de DNA libre (Tomado de Martínez-Ramos *et al.*, 2005).

Los cambios estructurales también se presentan a nivel de la NHOS. Al mapear 4 locus distintos (β -actina, β -globina, *c-myc* y PRM2), se observó que dos de estos (*c-myc* y PRM2) se encuentran más cercanos a la NM en las células tratadas con respecto a las células HeLa. En la figura 31A se muestra el locus PRM2 y las secuencias que lo componen, entre las que se incluyen 3 MARs. Una de estas MAR (**sMAR**) habitualmente se encuentra unida a la NM en las células HeLa (fig. 31B1). Sin embargo, en las células tratadas con DMSO es otra secuencia la que se une a la NM (**5' spMAR**). Esto resulta en una organización distinta del locus a lo largo del bucle (fig. 31B2). Estas evidencias sugieren un papel estructural para el DNA en el núcleo, ya que si este fuera únicamente un almacén de información genética posiblemente permanecería indiferente ante los cambios morfológicos del núcleo.

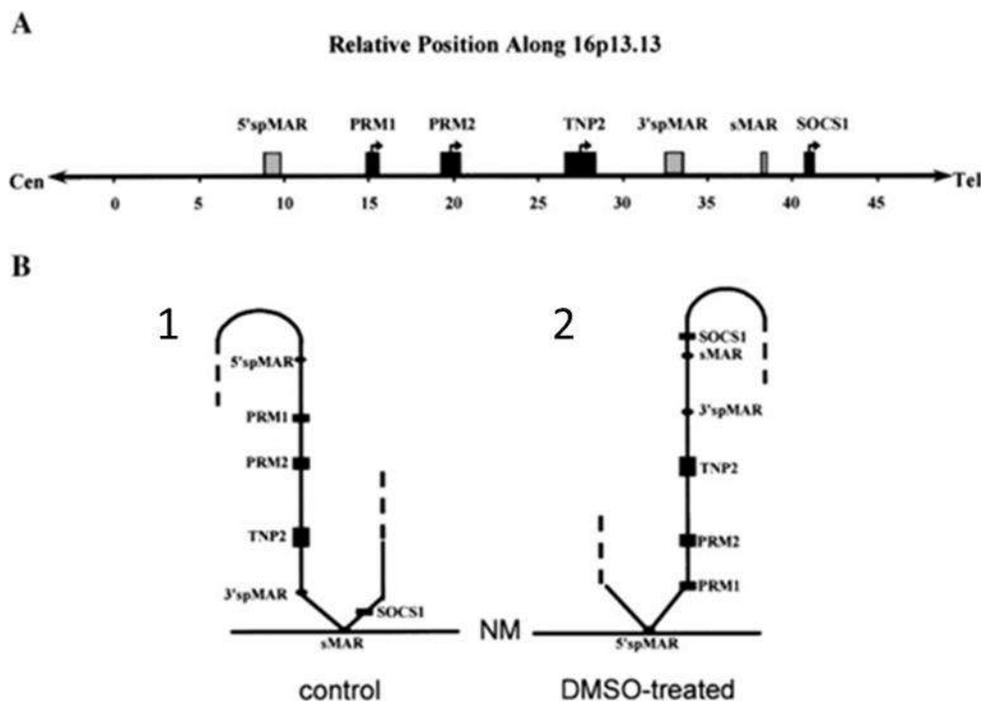


Figura 31. Locus PRM2. A) Posición relativa de las secuencias mapeadas del locus PRM2 a lo largo del brazo corto del cromosoma 16 humano. Las MARs se muestran en gris claro mientras que los genes se muestran en negro. B) Modelo que muestra la posición relativa de cada una de estas secuencias con respecto a la NM en células control (1) y en células tratadas (2). Nótese el cambio en la MAR unida a la NM (Tomado de Martínez-Ramos *et al.*, 2005).

Otro tipo de evidencia que apoya la idea de un papel estructural para el DNA es el hecho de que una fuerza mecánica equivalente aplicada sobre el DNA nuclear es capaz de disgregar la NM de células inmaduras, pero no la de células terminalmente diferenciadas, que, como se mencionó anteriormente, posee un mayor número de interacciones DNA-NM (Alva-Medina *et al.*, 2011). Dicha fuerza mecánica corresponde al EtBr, que induce la pérdida del hiperenrollamiento y, como se muestra en la figura 32b, causa la fragmentación de la NM de hepatocitos de rata recién nacida (P0), contrario a lo que ocurre en la figura 32d, donde la NM se mantiene íntegra en hepatocitos de rata de 540 días de edad (P540). Estas observaciones sugieren que el DNA forma un continuo mecánico con la NM, ya que en caso de que el DNA se encontrara organizado de forma pasiva dentro del núcleo, las fuerzas ejercidas sobre este no deberían perturbar la NM.

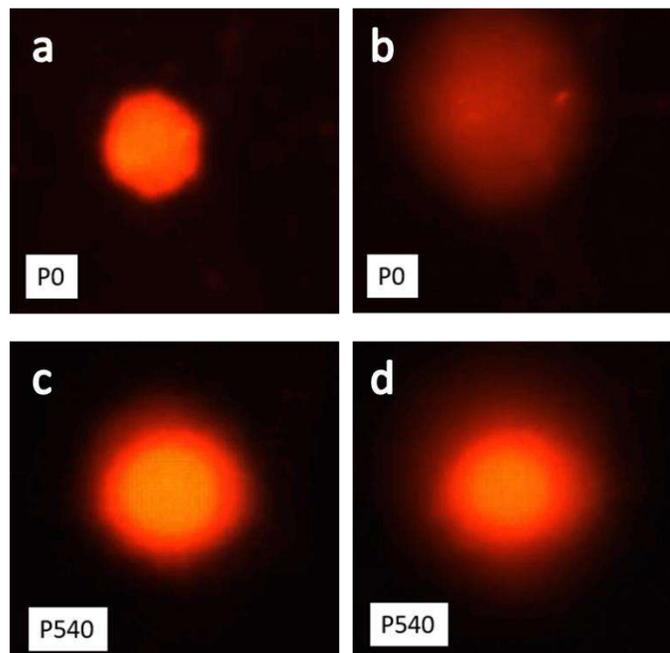


Figura 32. Nucleoides de hepatocitos a distintas edades. Se muestran dos nucleoides de hepatocito, uno pertenece a una rata postnatal 0 (P0) y el otro a una rata P540. Al aplicar EtBr en estos nucleoides, observamos que la NM del nucleoide P0 se fragmenta y desaparece (b), debido a la fuerza mecánica que ejerce el EtBr sobre el DNA. Mientras tanto, los nucleoides P540 son capaces de resistir esta misma fuerza y mantener íntegra su NM, debido a un mayor número de interacciones estructurales DNA-NM (Tomado de Alva-Medina *et al.*, 2011).

Evidencia adicional indica que el genoma manifiesta pre-estrés estructural dentro del núcleo celular, mismo que de no ser constreñido puede ocasionar la ruptura del núcleo, pues la envoltura nuclear carece de la resistencia necesaria para oponerse a la fuerza generada por el genoma pre-estresado (Mazumder et al, 2008), lo que implica la necesidad de restringir el pre-estrés del genoma mediante elementos internos del núcleo. Esto se logra mediante el anclaje de las moléculas de DNA a las proteínas de la NM, lo que balancea las fuerzas entrópicas del genoma (dirigidas hacia el exterior) con fuerzas internas, logrando un equilibrio que permite mantener la estructura e integridad del núcleo. Este conjunto de observaciones sugiere que el DNA no está organizado en forma pasiva dentro del núcleo, sino que es un participante fundamental en la organización estructural del núcleo. Debido a esto, se ha propuesto un modelo para la NHOS basado en los principios de tenseguridad estructural (Aranda-Anzaldo *et al*, 2014; Aranda-Anzaldo, 2016).

Tenseguridad

La tenseguridad es un principio de arquitectura e ingeniería que dicta el ensamblaje de estructuras estables y ligeras. En este tipo de estructuras, elementos de compresión discontinuos equilibran la fuerza generada por elementos de tensión continuos, alcanzando un equilibrio independiente de la gravedad (Galli *et al.*, 2005; Ingber *et al.*, 2014). Dichas estructuras presentan tensión isométrica que resulta en una configuración que minimiza la energía elástica almacenada por la totalidad del sistema estructural (Galli *et al.*, 2005). En otras palabras, este tipo de estructuras requieren de tensión distribuida uniformemente entre sus componentes estructurales para mantener su integridad (fig. 33).

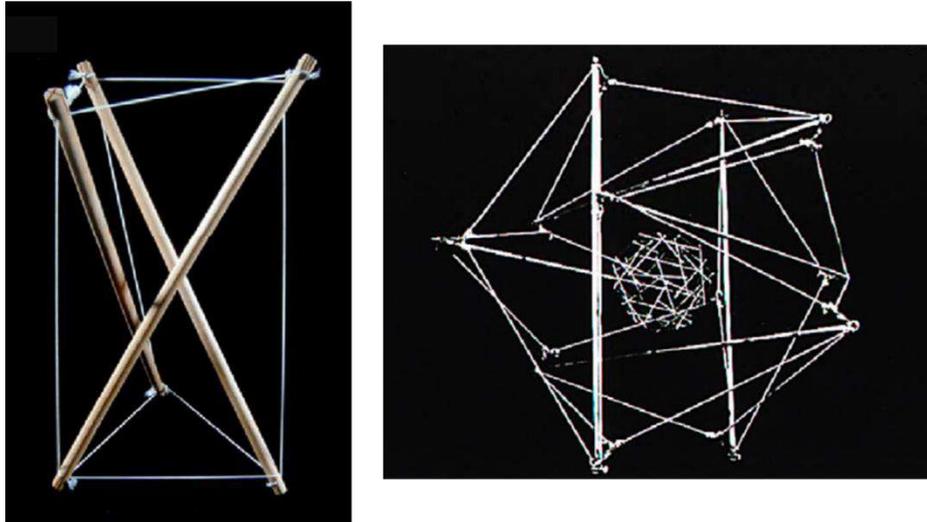


Figura 33. Estructuras de tensegridad. Izquierda: modelo de tensegridad compuesto por puntales de madera y cuerdas de nylon. Las estructuras rígidas no se encuentran en contacto directo, sino suspendidas y estabilizadas a través de su conexión mediante elementos de tensión continua. Derecha: modelo de tensegridad integrado por puntales de metal y cables elásticos, conectados mediante hilos negros a una estructura de tensegridad esférica pequeña en su centro, los hilos no son visibles debido al fondo de la imagen. Este modelo jerárquico de tensegridad ha sido utilizado para modelar alteraciones de forma en células nucleadas, como cuando un grupo de elementos del modelo son anclados a un sustrato rígido para modelar la adhesión celular, el aplanamiento celular, la expansión celular y nuclear de manera coordinada (Tomado de Ingber *et al.*, 2014).

NHOS y tensegridad

Durante la interfase, los telómeros se encuentran unidos a la lámina nuclear (Luderus *et al.*, 1996), mientras que el resto de los cromosomas se subdivide en bucles hiperenrollados anclados a nodos de componentes de la NM. En el contexto de un sistema estructural basado en tensegridad, el DNA asume el rol del elemento de tensión continuo, y los componentes de la NM son los elementos de compresión discontinuos (fig. 34) (Aranda-Anzaldo, 2016). El anclaje de los telómeros a la lámina nuclear en la periferia de la NM (Luderus *et al.*, 1996) garantiza que la organización estructural resultante esté balanceada por elementos externos (lámina nuclear) e internos (nodos de componentes de la NM), minimizando la energía elástica del conjunto de cromosomas y protegiendo al núcleo de las fuerzas entrópicas que podría ocasionar la cromatina no constreñida (Mazumder *et al.*, 2008). Este constructo dota al núcleo de flexibilidad y le permite resistir fuerzas mecánicas mediante el reacomodo de sus componentes

estructurales (Volokh y Vilnay, 1997). Simultáneamente, esta estructura acopla mecánicamente la NM, el citoesqueleto, la matriz extracelular y los componentes de células vecinas (Wang *et al.*, 2009), por lo que cambios en el balance de fuerzas en cualquiera de estos elementos tendrá un impacto en los demás. Este modelo es consistente con la evidencia que muestra que el DNA es el conector que une las proteínas del andamio cromosómico (Maniotis *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2011).

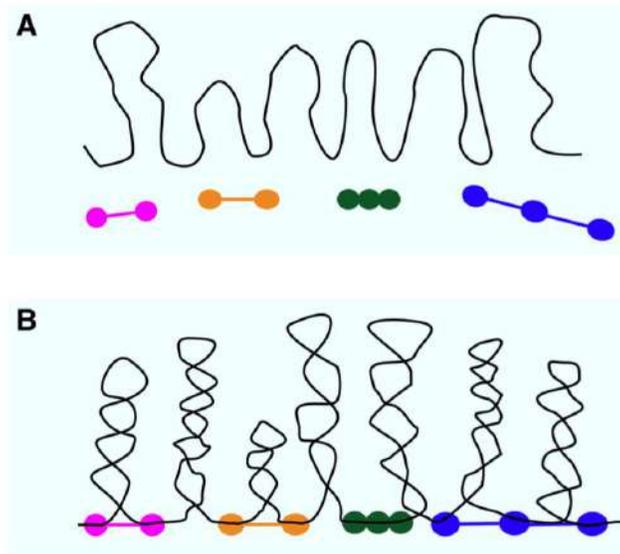


Figura 34. Dentro del núcleo celular, las moléculas de DNA cromosómico, representado por línea negra, y los componentes de la NM, representados por las barras de colores (A), se asocian formando un sistema estructural basado en tensegridad (B). La unión del DNA a la NM causa el pre-estrés isométrico necesario para equilibrar los elementos de compresión discontinuos (componentes de la NM) con los elementos de tensión continuos (DNA) (Tomado de Aranda-Anzaldo *et al.*, 2014).

Dentro de este marco, esta proyecto de tesis busca generar información acerca del aporte de las proteínas de la NM a la estabilidad e integridad de la NHOS, así como evidencia adicional que de que la NHOS está basada en los principios de tensegridad estructural. Para este fin, se hará uso de solventes polares apróticos, conocidos por su capacidad de perturbar la estructura nativa de las proteínas.

Solventes polares apróticos

Los solventes polares apróticos son un grupo de compuestos empleados en diversos ámbitos; desde la industria hasta en laboratorio y farmacéutica. Se caracterizan por la ausencia de un átomo de H unido directamente a un átomo electronegativo, como son O y N, por lo que durante la formación de puentes de hidrógeno no pueden funcionar como donadores de protones, sólo como aceptores (fig. 35). Debido a esto, son incapaces de formar puentes de hidrógeno intermoleculares (Brayton, 1986). Entre los ejemplos más comunes de solventes de este tipo se encuentran la acetona, el diclorometano, el acetonitrilo, el dimetilsulfóxido, el acetato de etilo y la dimetilformamida.

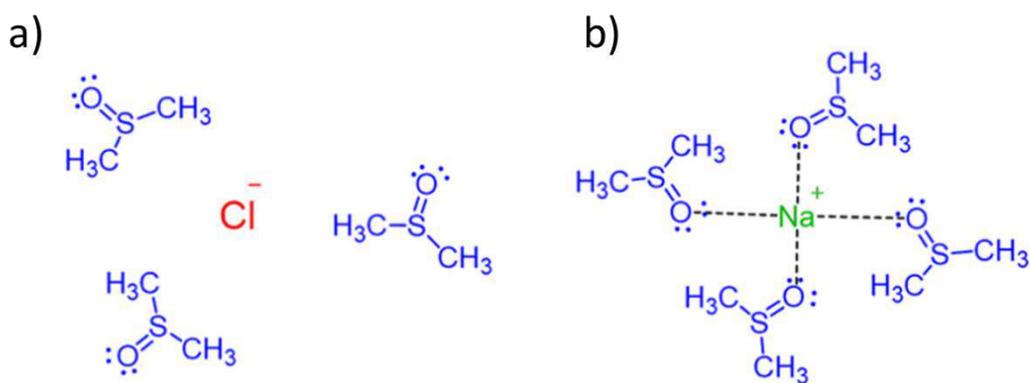


Figura 35. Modelo de interacción de solventes polares apróticos con moléculas cargadas. Debido a la ausencia de un dipolo, las moléculas de dimetilsulfóxido no pueden interactuar con aniones (a), sin embargo, son capaces de interactuar con cationes (b).

Dimetilsulfóxido

El dimetilsulfóxido (DMSO) es un líquido incoloro altamente higroscópico, con un punto de congelación de $18.5\text{ }^\circ\text{C}$ (Van Risjwick y Griffin, 1981). El carácter polar y nucleofílico de la molécula proviene de los pares de electrones libres alrededor del átomo de oxígeno (fig. 36) (David, 1972).

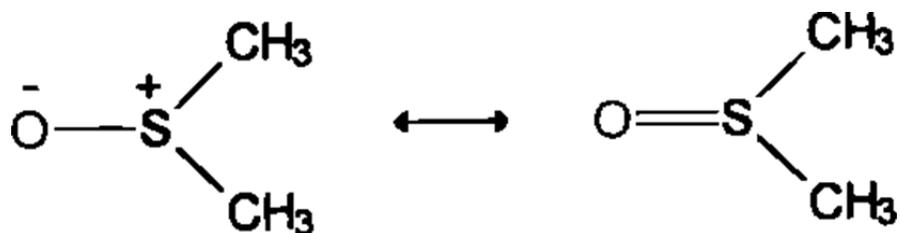


Figura 36. Estructura del DMSO. La alta electronegatividad del O atrae un par de los electrones que forman el doble enlace, de forma que estos pasan más tiempo alrededor del O y no se comparten equitativamente con el azufre (S), lo que le otorga al O una carga parcial negativa y al S una carga parcial positiva. Sin embargo, el átomo de S queda oculto e impedido por el átomo de O y los grandes grupos metilo, por lo que la molécula no es capaz de interactuar con aniones (Tomado de Garton *et al.*, 1997).

Desde hace mucho tiempo se conoce la capacidad crioprotectora de este solvente (Lovelock y Bishop, 1959), que usado en soluciones de 5-10% ofrece una excelente protección a una variedad de sistemas celulares contra los efectos dañinos asociados con el congelamiento y el descongelamiento (Ashwood-Smith, 1975). Se le han asociado otras propiedades interesantes, como la capacidad de disolver sustancias que no se logran disolver en agua (como ciertas proteínas y esteroides), facilitar el transporte de otras sustancias a través de membranas biológicas (Amstey y Parkman, 1966; Elfbaum y Laden, 1968), efectos antiinflamatorios (Weissman *et al.*, 1967; Görög y Kovacs, 1969), analgésicos (Sams Jr, 1967; Haigler y Spring, 1983), antagonistas a la adhesión plaquetaria, diuréticos (Jacob y Herschler, 1986), y radioprotectores (Ashwood-Smith, 1961), entre algunos otros.

A pesar de que se ha asociado con una ligera toxicidad (Galvao *et al.*, 2014), este solvente está autorizado por la FDA (*United States Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la cistitis intersticial (Melchior *et al.*, 2003).

Durante gran parte del tiempo que este solvente se utilizó como crioprotector, se ignoraron los efectos que puede tener sobre los sistemas celulares a los que se aplica, la evidencia existente indica que ejerce efectos importantes sobre la estructura de las proteínas (Jackson y Mantsch, 1991). Se ha reportado que el DMSO, incluso a bajas concentraciones, induce el cambio conformacional desde hélices α hacia láminas β (Tunçer *et al.*, 2018), aumentando la proporción relativa de estos motivos estructurales en las proteínas.

Manifiesta un efecto estabilizador de la estructura de las proteínas a bajas concentraciones (Arakawa *et al.*, 2007) y desnaturalizantes al alcanzar una concentración crítica (Sterling *et al.*, 2011). Además, tiene la capacidad de causar la agregación y precipitación de proteínas (Tjernberg *et al.*, 2006; Tunçer *et al.*, 2018) y alterar la capacidad de las proteínas de unirse a sus ligandos (Tjernberg *et al.*, 2006).

Dimetilformamida

La dimetilformamida (DMF) (fig. 37), al igual que el DMSO, pertenece a la familia de los solventes polares apróticos. Posee varios usos en la industria, como la producción de pesticidas, la manufacturación de adhesivos, cueros sintéticos, películas y revestimientos de superficies (Heravi *et al.*, 2018). Sin embargo, su mayor uso es como solvente, ya que es capaz de disolver la gran mayoría de compuestos orgánicos y posee una tasa de evaporación relativamente baja; y en la síntesis orgánica, dada su capacidad de donar una gran variedad de grupos funcionales (Muzart, 2009; Ding y Jiao, 2012; Heravi *et al.*, 2018).

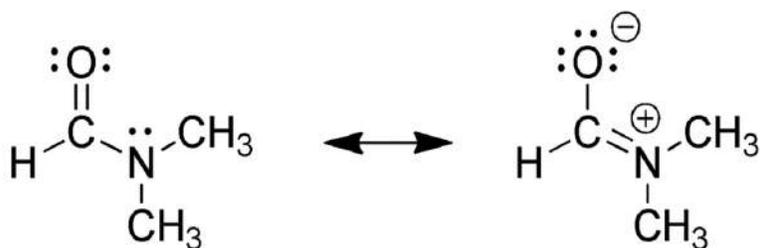


Figura 37. Estructura de la DMF. Un par de los electrones que forma el doble enlace entre el átomo de carbono (C) y O son atraídos por el O, por lo que los electrones libres del N se comparten equitativamente entre el C y el N, otorgándole una carga parcial positiva (Tomado de Bonvallet y Amburgey-Peters, 2013).

A diferencia del DMSO, que posee baja toxicidad (Brayton, 1986), la DMF se considera muy tóxica (Clayton Jr *et al.*, 1963; Tanaka, 1971; Gescher, 1993; Kim y Kim, 2011), y se le ha asociado con hepatotoxicidad (Scailteur y Lauwerys, 1987) y con carcinogénesis (Senoh *et al.*, 2004). Los efectos de la DMF sobre la estructura de las proteínas no están tan profundamente estudiados como aquellos del DMSO, sin embargo, su capacidad

para alterar la estructura nativa es bien conocida, y dicho efecto es dependiente de la concentración de DMF (Knubovets *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2016).

Glicerol

El glicerol es un alcohol de tres carbonos, un triol, y el más simple de estos (fig. 38). Se encuentra naturalmente en todos los organismos vivos como parte fundamental de los fosfolípidos que componen las membranas celulares (Robergs & Griffin, 1998; Christoph *et al.*, 2006). Es un líquido incoloro, higroscópico y altamente viscoso a temperatura ambiente, con aplicaciones que abarcan la manufacturación de fármacos, cosméticos, dentífricos, resinas sintéticas y gomas de mascar, así como el procesamiento de tabaco y de alimentos (Morrison, 2000).

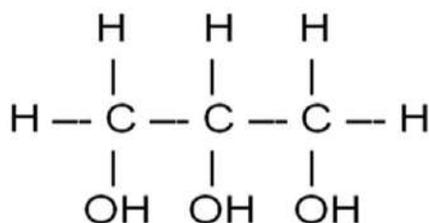


Figura 38. Estructura química del glicerol, un alcohol.

A lo largo de los años, se ha visto que el glicerol en solución acuosa actúa como un estabilizante de la estructura nativa de las proteínas, compactándolas y previniendo su agregación (Gekko & Timasheff, 1981a, 1981b; Rariy y Klibanov, 1997; Vagenende *et al.*, 2009). Se piensa que este efecto estabilizador de la estructura nativa proteica ocurre por la hidratación preferencial de la proteína, excluyendo al glicerol de sus alrededores y favoreciendo la compactación de la proteína (Gekko y Timasheff, 1981a, 1981b; Rariy y Klibanov, 1997). El glicerol interactúa en parches hidrofóbicos de la proteína, creando una interfase anfifílica entre estas regiones hidrofóbicas y el solvente polar; esto también explica la prevención de la agregación de proteínas: la agregación de proteínas se induce cuando estas pierden su configuración nativa y se asocian mediante regiones hidrofóbicas que previamente no estaban expuestas, minimizando la superficie de

contacto con el solvente polar. El glicerol interactúa con estas superficies hidrofóbicas y no permite la asociación entre moléculas que perdieron su configuración nativa (Vagenende *et al.*, 2009).

Por último, se ha descrito la capacidad de una gran variedad de solventes orgánicos, entre los que se incluyen DMSO, DMF y glicerol, de inducir la pérdida del hiperenrollamiento y la desnaturalización de la doble hélice, fenómeno que es dependiente de la concentración de solvente utilizado (Lee *et al.*, 1981; Ke *et al.*, 2010; Ghoshadistidar y Senapati, 2018). Esto ocurre mediante un mecanismo de deshidratación del DNA, mediante el cual los solventes, que son muy higroscópicos, alteran las interacciones del agua con el DNA, esenciales para el mantenimiento de la doble hélice, causando que el DNA primero cambie de su forma B a su forma A, para posteriormente desnaturalizarse (Sínanoğlu y Abdalnur, 1964; Paunescu *et al.*, 2013).

HIPÓTESIS

Dado que los solventes polares apróticos tienen efectos sobre la estructura y conformación de las proteínas y el DNA, deben de tener efectos sobre la integridad y estabilidad de la NHOS.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto de solventes polares apróticos (DMSO, DMF) sobre la integridad y estabilidad NHOS.

Objetivos particulares

- Determinar el efecto del DMSO sobre la NHOS, en forma comparativa con respecto al glicerol y al medio acuoso estándar.
- Determinar el efecto de la DMF sobre la NHOS en forma comparativa con respecto al glicerol y al medio acuoso estándar.

MATERIALES Y MÉTODOS

a. Animales experimentales

Se emplearon ratas macho Wistar de 250-350 g alimentadas con agua y comida *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados mediante anestesia general con CO₂ para el aislamiento de células primarias. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

b. Purificación de células primarias

La purificación de hepatocitos primarios de rata se realizó de acuerdo al método de Freshney (1994) modificado por Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo (2003). Se expuso la cavidad abdominal de la rata, se canalizó la vena porta hepática con una aguja de calibre 18 y se perfundió el hígado con PBS-A (2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 136.9 mM NaCl, 7.75 mM Na₂HPO₄, libre de Ca y Mg, a pH 7.4) a 37° C durante 5 min a 15 ml/min. La vena cava se cortó a nivel de los riñones para eliminar la sangre. Para la disociación de las células, se perfundió el hígado con colagenasa IV, Sigma (0.0025% de colagenasa, 0.075% CaCl₂ en buffer HEPES, pH 7.6) por 10 minutos a 37°C. El hígado se fragmentó y se filtró a través de una malla con poros de 400 µm y los hepatocitos se separaron mediante sedimentación por gravedad durante 20 minutos a 4°C. Los hepatocitos aislados se cuantificaron con un hemocitómetro y fueron usados inmediatamente para la obtención de nucleoides.

c. Preparación de nucleoides

La obtención de nucleoides se realizó mediante extracción con altas concentraciones de sal y detergentes no iónicos (Cook *et al.* 1976; Maya-Mendoza y Aranda-Anzaldo, 2003). Los hepatocitos se resuspendieron en PBS-A y alícuotas de 50 µl, equivalente a 300 000 núcleos, se mezclaron cuidadosamente con 150 µl de buffer de lisis (2.6 M NaCl, 1.3 mM EDTA, 2.6 mM Tris, 0.6% Triton-X100, pH 8.0). Se lisaron durante 20 minutos a 4°C.

Finalmente, las muestras fueron lavadas con 14 ml de PBS-A y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El precipitado resultante se recuperó en un volumen de 80 μ l.

d. Ensayos con solventes

Los nucleoides recuperados se trataron con uno de tres solventes: DMSO (metil sulfóxido, grado HPLC, Sigma-Aldrich), DMF (*N, N*-Dimetilformamida, grado HPLC, Sigma-Aldrich) o glicerol (>99%, Sigma-Aldrich), en solución acuosa a concentraciones de 10% y de 50%. Para la realización de los controles no se agregó solvente.

e. Visualización en el microscopio y toma de imágenes

Para visualizar las preparaciones de nucleoides en el microscopio, se les agregó bromuro de etidio (EtBr) a una concentración final de 80 μ g/ml e inmediatamente se observaron. Todas las observaciones se realizaron en el microscopio de epifluorescencia OLYMPUS Mod. BX60. Para la captura de imágenes se utilizó una cámara *Jenoptik Progres Gryphax* adaptada al microscopio, y las imágenes se analizaron en los programas Jenoptik e ImageJ.

f. Calibración de ImageJ

Para la calibración del programa ImageJ, se utilizaron fotografías de perlas fluorescentes de 15 μ m, como la que se muestra en la figura 39.



Figura 39. Perla fluorescente vista en un aumento de x40, el diámetro de la perla es de 15 μm , la escala tomada como referencia para realizar las mediciones.

g. Medición de los nucleoides observados en Image J

Se tomaron medidas de todos los nucleoides capturados en las micrografías de contraste de fases y en los videos de fluorescencia a los tiempos 0 s, 15 s y 30 s, que son representativos del proceso de expansión del halo. Como se muestra en la figura 40, utilizando las micrografías de contraste de fases, se midieron los diámetros de las NM en los tiempos 0 s y 30 s (fig. 40a), que representan el antes y el después de la expansión del halo de DNA, mientras que en los videos de fluorescencia se midieron los radios de los halos (fig. 40b) para evaluar su capacidad de expansión a lo largo de los 30 s.

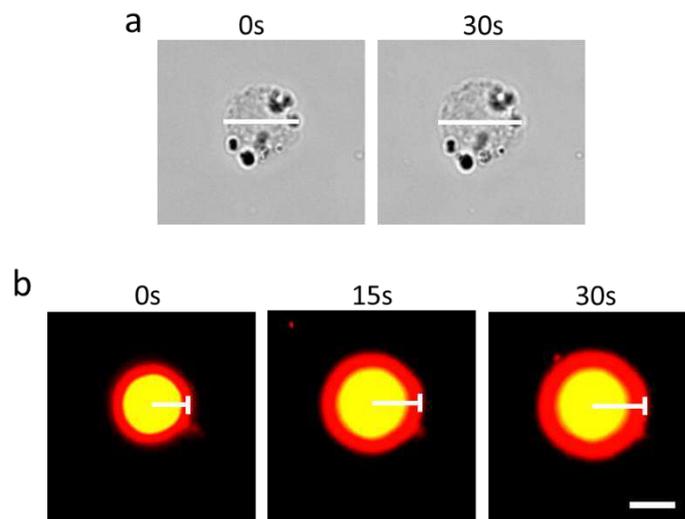


Figura 40. Ejemplo de cómo se midieron los diámetros de la NM y los radios de los halos de DNA. Barra: 15 μm .

h. Extracción de proteínas

Se extrajeron proteínas totales de nucleoides control, nucleoides tratados con DMSO al 50% y nucleoides tratados con DMF al 50%. Estas muestras se lavaron con PBS-A y centrifugaron a 10 000 rpm (9,600 g) durante 10 min, con el fin de eliminar el solvente, este lavado también se realizó a los controles para garantizar que este paso adicional no contribuiría a las diferencias observadas entre tratamientos. Posteriormente, cada

muestra se homogeneizó con buffer de extracción de proteínas (2% SDS, 2 mM EDTA, 2 nM EGTA y 5 mM Tris, pH 7.2) e inhibidores de proteasas. La solución stock del cocktail de inhibidores de proteasas consta de 0.5 mg/ml de bestatina, pepstatina y leupeptina. Este concentrado se adiciona a una dilución de 1:100 al buffer de extracción. Justo antes de la extracción se colocó PMSF a una dilución de 1:100 de una solución stock 0.1 M en metanol. Los nucleoides fueron macerados mecánicamente, este homogenado se transfirió a tubos de 1.5 ml y se calentaron a 100°C durante 5 min. Una vez hervidas, las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, que consta de proteínas solubles, y el precipitado, que consta de proteínas insolubles, de cada muestra y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

i. Cuantificación de proteínas

Para cuantificar las proteínas se empleó el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Se realizó una curva estándar de concentraciones graduales de 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/ml de albúmina. Se tomaron 10 µl de cada dilución, así como de cada una de las muestras (para cada muestra se midió sobrenadante y precipitado) y se agregaron 50 µl de reactivo A' (20 µl de reactivo S en 1 ml de reactivo A) y 400 µl de reactivo B y se dejó reaccionar durante 15 min. Se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro SmartSpec™ Plus (Bio-Rad). Con las absorbancias obtenidas de la curva estándar se realizó una regresión lineal para obtener una curva que permita calcular la cantidad de proteína obtenida en cada una de las diferentes muestras. Las absorbancias obtenidas de las muestras se extrapolan a la curva estándar para obtener la concentración de proteína en cada una. Se determina la concentración adecuada para cargar 15 µg de cada una de las muestras para su análisis en geles de poliacrilamida.

j. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para realizar la electroforesis se preparó un gel de poliacrilamida al 10%. Para ello, se colocaron 10 ml de gel separador (10% acrilamida, 0.375 M Tris pH 8.8, 0.1% AMPS y 0.04% TEMED) en la cámara de electroforesis y se permitió que polimerizara durante 20 min. Una vez polimerizado se colocan 2 ml de gel concentrador al 4% (4% acrilamida,

0.126 M Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% AMPS y 0.01% TEMED). Seguido de esto, se colocó el peine de 10 pozos y se permitió que polimerizara otros 20 min. Se colocó el buffer de corrida (0.025 M Tris, 0.192 M glicina, 0.1% SDS, pH 8.5-8.7) y se cargó de cada muestra lo equivalente a 15 µg de proteínas en cada pozo junto con el buffer de carga (0.125 M Tris, 4% SDS, glicerol y 10% mercaptoetanol) en cada uno. Se corrieron a 40 mA durante 2 h.

k. Tinción con azul de Coomassie

Para observar las proteínas en el gel, este se tiñó con azul de Coomassie (0.06% azul de Coomassie R-250, 30% metanol y 10% ácido acético) durante toda la noche, y se lavó con solución desteñidora (10% ácido acético) en un intervalo de 2 a 4 h y posteriormente con agua corriente.

l. Digestión con DNAsa I

Los precipitados obtenidos de la centrifugación de cada una de las muestras (control, DMSO 50% y DMF 50%) se trataron con DNAsa I (Sigma) a una concentración de 0.5 U/ml durante 30 min a 37°C en buffer de digestión (10 mM MgCl₂, 0.2 mM β-mercaptoetanol, 50 mM Tris, pH 7.2). Una vez transcurridos los 30 min, la digestión se detuvo con buffer de paro (0.2 M EDTA, 10 mM Tris, pH 7.5).

RESULTADOS

i. Estandarización de la obtención de nucleoides.

El tratamiento de los hepatocitos primarios con solución de lisis remueve todas las membranas celulares, lo que permite aislar los nucleoides, constituidos por los bucles de DNA hiperenrollados anclados a la NM. Al principio se estandarizó el tiempo en que se trataban los hepatocitos con la solución de lisis, el cual se fijó en 20 min., ya que, con tiempos menores, se obtenían muchas células no lisadas, y con tiempos mayores no se observaron diferencias a los ya mencionados 20 min. En la figura 41a, a la izquierda se muestra un hepatocito no lisado en microscopia de contraste de fases. Estas células tienen un gran tamaño y se puede ver el núcleo en el centro. A la derecha se muestra la misma célula en microscopia de fluorescencia con EtBr, un marcador fluorescente de DNA, en donde se aprecia la compartimentalización entre el citoplasma y el núcleo puesto que esta conserva todas sus membranas. El citoplasma fluoresce de rojo por la presencia de DNA mitocondrial, mientras que el núcleo fluoresce más fuertemente de color amarillo por la gran cantidad de DNA presente en este. En la figura 41b, a la izquierda se muestra un nucleoide, el remanente de una célula que se lisó correctamente, en contraste de fases, y a la derecha se muestra el mismo nucleoide en fluorescencia, compuesto por los bucles de DNA anclados a la NM, que ha perdido todas sus membranas y es mucho más pequeño.

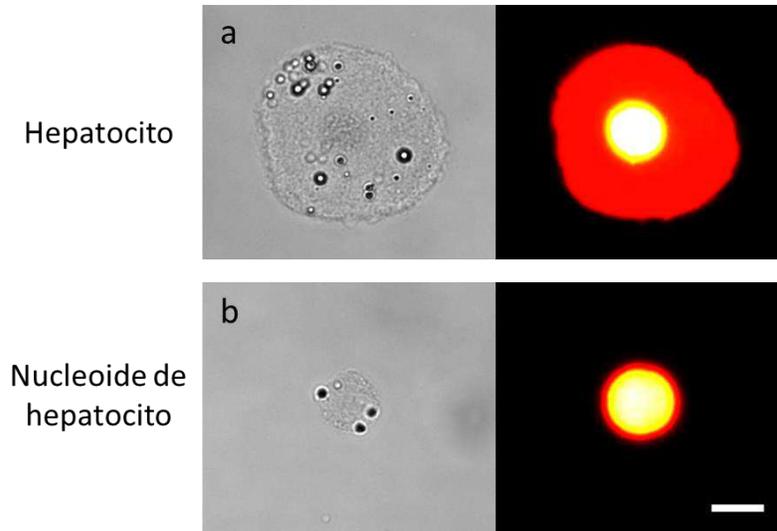


Figura 41. Hepatocito no lisado y nucleoide observados en microscopía de contraste de fases y de fluorescencia. a) Izquierda: célula no lisada en contraste de fases. Derecha: célula no lisada en fluorescencia con EtBr 80 $\mu\text{g/ml}$. b) Izquierda: nucleoide en contraste de fases. Derecha: nucleoide en fluorescencia con EtBr 80 $\mu\text{g/ml}$. Barra: 15 μm .

ii. Expansión del halo de DNA

Una vez que se estandarizó la extracción, se tomaron micrografías y videos en tiempo real de las preparaciones de nucleoides en el microscopio con el fin de evaluar cualitativa y cuantitativamente la expansión del halo en una escala de tiempo. Se grabaron videos de 30 s en microscopía de fluorescencia con EtBr a [80 $\mu\text{g/ml}$] y se tomaron micrografías de contraste de fases en el tiempo 0 s, previo a la expansión del halo, y en el tiempo 30 s, después de la expansión. La figura 42 muestra un nucleoide, tanto en contraste de fases (fig. 42a) como en fluorescencia (fig. 42c) al tiempo 0 s, en esta última se aprecia un pequeño halo (rojo) que corresponde a los bucles de DNA hiperenrollados negativamente anclados a la NM (amarillo). También se muestra este mismo nucleoide en contraste de fases (fig. 42b) y en fluorescencia (fig. 42d) una vez transcurridos los 30 s, donde se observa que el halo de DNA ha aumentado su tamaño. Esta expansión del halo de DNA es causada por la pérdida del hiperenrollamiento, donde los bucles se descompactan y quedan completamente extendidos. Este fenómeno de expansión es inducido por el EtBr, que se intercala entre los pares de bases del DNA y mecánicamente induce la pérdida del hiperenrollamiento, como si fuera una palanca molecular. El radio del halo de DNA se correlaciona con el tamaño promedio de los bucles de DNA desde

su base hasta su punta, que, en hepatocitos de rata adulta, ha sido reportado de aproximadamente 48.9 kbp, por lo que la longitud total del bucle es de 97.8 kbp (Maya-Mendoza *et al.*, 2005).

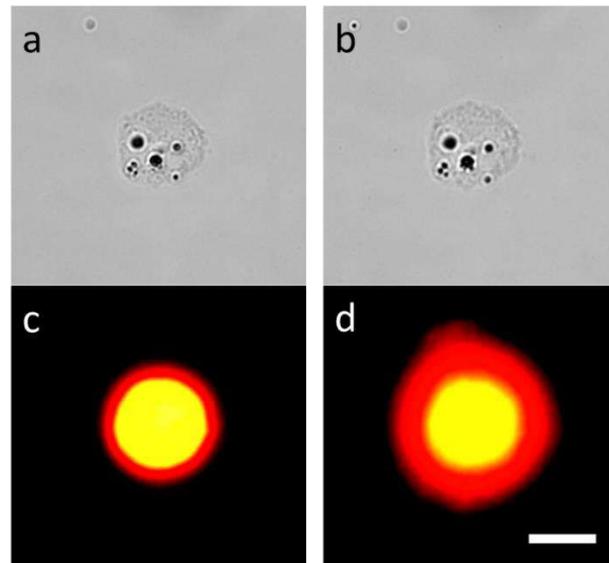


Figura 42. Fotografías de un nucleoide en microscopía de contraste de fases y de fluorescencia. a) Nucleoide en contraste de fases al tiempo 0 s. b) Nucleoide en contraste de fases al tiempo 30 s. c) Nucleoide en microscopía de fluorescencia al tiempo 0 s. d) Nucleoide en microscopía de fluorescencia al tiempo 30 s. Barra: 15 μ m.

A continuación, en la figura 43, se muestran los cuadros tomados de un video de fluorescencia de 30 s, ejemplificando cómo el halo de DNA se expande conforme pasa el tiempo y alcanza su capacidad máxima de expansión cerca de los 30 s.

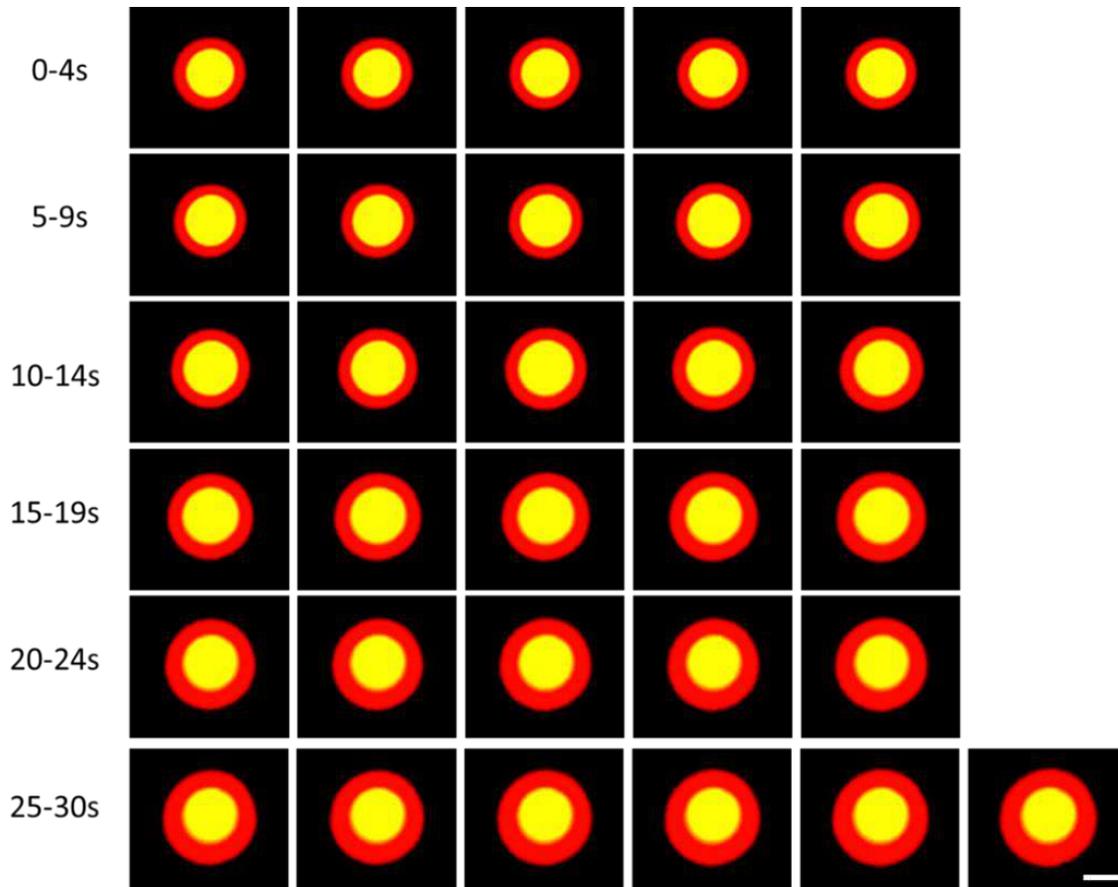


Figura 43. Cuadros tomados de un video de 30 s que muestra un nucleoide con EtBr siendo observado bajo microscopía de fluorescencia, nótese la expansión del halo de DNA alrededor de la NM. Barra: 15 μm .

iii. Ensayos con solventes

Una vez que se estandarizó la extracción de los nucleoides y se observó el efecto de expansión de los halos de DNA con EtBr, se aplicó un tratamiento agudo sobre preparaciones de nucleoides utilizando solventes a dos concentraciones diferentes, con el fin de identificar si existen alteraciones sobre la NHOS. Los solventes utilizados fueron el DMSO, la DMF y el glicerol. Está reportada la capacidad del DMSO y la DMF de perturbar la estructura nativa de las proteínas y del DNA (Anigbogu et al., 1995; Batista et al., 2013; Tunçer et al., 2018; Knubovets et al., 1999; Yang et al., 2016), mientras que para el glicerol se reporta un efecto estabilizador de la estructura nativa (Gekko & Timasheff, 1981a, 1981b; Rariy y Klibanov, 1997; Vagenende et al., 2009), siendo utilizado aquí como un control de viscosidad, para corroborar que cualquier cambio

observado con el tratamiento de DMSO y DMF se atribuya a sus propiedades sobre la estructura de las biomoléculas y no a su viscosidad, que es diferente a la del medio acuoso estándar.

Ensayos control

En primer lugar, se tomaron los controles de expansión del halo, que consisten en preparaciones de nucleoides a las que se les agregó EtBr para su visualización al microscopio. Al medir los radios de los halos, los valores promedio obtenidos fueron de 12.29 μm previo a la expansión (fig. 44b) y 17.74 μm (53.7 kbp) una vez concluida la expansión (fig. 44d), con un aumento total promedio de 5.45 μm . Con las micrografías de contraste de fases tomadas se midieron los diámetros de las NM, que previo a la expansión (fig. 44a) tienen valores promedio de 18.29 μm , y al finalizar la expansión (fig. 44e) alcanzan 20.14 μm , un aumento de 1.85 μm , lo que indica que junto con la expansión del halo existe un aumento de tamaño de la NM.

Ensayos con DMSO al 10%

Seguido de esto, se realizaron los ensayos con DMSO al 10%, que tiene una viscosidad de 2.15 cP (Schichman y Amey, 1971), mayor a la del agua (1 cP a 20°C). Los videos tomados muestran una reducción en la capacidad máxima de expansión del halo. Estos halos alcanzan en promedio radios de 15.28 μm (46.75 kbp) a los 30 s, 2.46 μm menos en comparación a los controles (fig. 44g-i), además de que su expansión se vuelve notablemente más lenta. Las micrografías de contraste de fases muestran que existe un aumento en el diámetro promedio de la NM, que a los 0 s es de 18.94 μm , y alcanza un tamaño de 19.7 μm a los 30 s (fig. 44f y 40j). Este aumento no es tan notable (de 0.76 μm) en comparación al mostrado por los controles (de hasta 1.85 μm). Estos resultados muestran que existe un efecto sobre la expansión del halo y la matriz, sin embargo, dado que la viscosidad del solvente es el doble a la del medio acuoso estándar, es difícil discernir si el efecto observado se debe a la viscosidad del medio o a el efecto que este solvente podría ejercer sobre la estructura proteica de la NM. Buscando una respuesta a este problema, se utilizó un solvente de naturaleza parecida a la del DMSO, la DMF, con el fin de corroborar si los efectos sobre los nucleoides son similares.

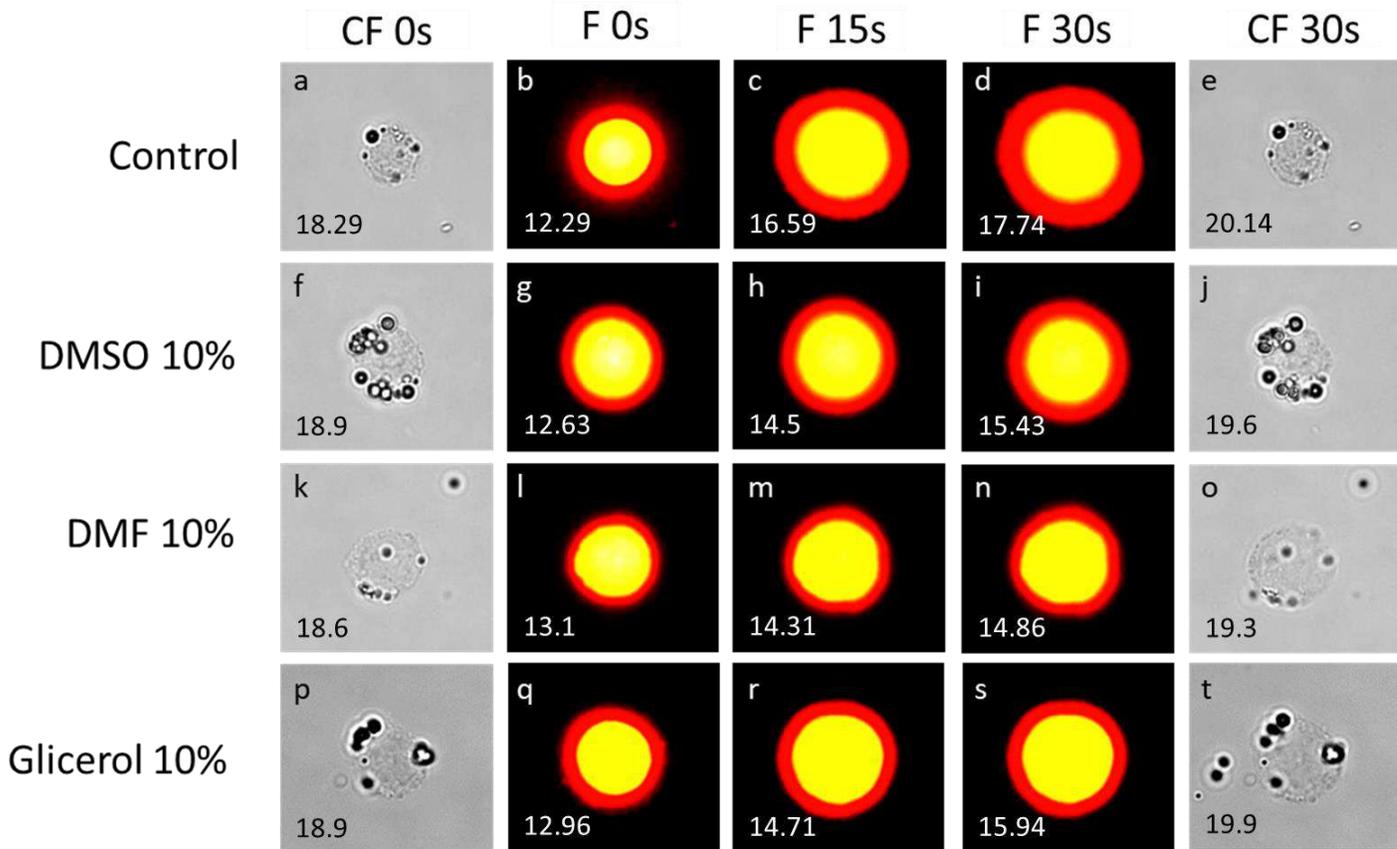


Figura 44. Ensayos de expansión de halos con solventes al 10%. Se muestran 3 tiempos (0 s, 15 s y 30 s) ya sea en microscopía de contraste de fases (CF) o en fluorescencia (F). Primera fila: expansión del halo de un nucleoide control. Segunda fila: expansión del halo de un nucleoide tratado con DMSO al 10%. Tercera fila: expansión del halo de un nucleoide tratado con DMF al 10%. Cuarta fila: expansión del halo de un nucleoide tratado con glicerol al 10%. Los valores en la esquina inferior izquierda de cada imagen corresponden al valor promedio obtenido de dichos tratamientos en un tiempo particular, diámetro de la NM en CF y radio de halo en F. Estos mismos valores se muestran en la Tabla 1.

Ensayos con DMF al 10%

Se trataron las preparaciones de nucleoides con DMF, que al 10% tiene una viscosidad de 2.01 cP (Jóźwiak *et al.*, 2013), mayor a la del agua. Este tratamiento mostró una reducción aún mayor en la capacidad de expansión total del halo, alcanzando un radio promedio de 14.86 μm (45.03 kbp) a los 30 s, 2.88 μm menos comparado con los controles (fig. 44l-n). Al igual que con el DMSO, el aumento de tamaño de la NM es menor (19.34 μm a los 0 s y 20.16 μm a los 30 s, un aumento de 0.82 μm) en comparación al control (aumento de 1.85 μm) (fig. 44k y 44o). Los efectos encontrados con este solvente

son similares a aquellos vistos con el DMSO, aunque se observa una disminución ligeramente mayor en la capacidad total de expansión del halo con el tratamiento de DMF. Sin embargo, ni este efecto ni la viscosidad son muy distintos entre estos dos solventes, por lo que se utilizó un solvente que presentara un efecto distinto a los polares apróticos, y al mismo tiempo tuviera una viscosidad diferente, con el fin de contrastar los resultados ya obtenidos.

Ensayos con glicerol al 10%

Para llevar a cabo esto, se utilizó glicerol al 10%, que posee una viscosidad de 1.38 cP (Cheng, 2008; Volk y Kähler, 2018), relativamente similar a la del agua. Como se muestra en la figura 44, en las preparaciones tratadas con este solvente se reduce la capacidad de expansión total del halo (fig. 44q-s), que alcanza un radio promedio de 15.94 μm (48.3 kbp) a los 30 s, con respecto al control. Sin embargo, dicho efecto es menor en comparación al obtenido en el tratamiento con DMSO y DMF. De igual manera, el aumento de tamaño de la matriz también es menor en comparación al control (diámetro promedio de 18.9 μm a los 0 s y de 19.9 μm a los 30 s, un aumento de solo 1 μm) (fig. 44p y 44t). A continuación, en la tabla 1 se muestran los promedios de las mediciones obtenidas de los nucleoides tratados con solventes al 10%.

Tratamiento	Radio (halo)			Diámetro (NM)	
	Tiempo			Tiempo	
	0 s (μm)	15 s (μm)	30 s (μm , kbp)	0 s (μm)	30 s (μm)
Control	12.29	16.59	17.74, 52.17	18.29	20.14
DMSO 10%	12.63	14.5	15.43, 45.38	18.94	19.7
DMF 10%	13.1	14.31	14.86, 43.7	19.34	20.16
Glicerol 10%	12.96	14.71	15.94, 46.88	18.9	19.9

Tabla 1. Mediciones promedio para tratamientos al 10%. Naranja: Mediciones del radio de halo promedio para los diferentes tratamientos. Se muestra en μm para los tres tiempos, sin embargo, a los 30 s también se muestra en kbp, debido a que el factor de conversión mencionado previamente aplica únicamente para DNA relajado. Azul: Mediciones del diámetro promedio de la NM para los diferentes tratamientos.

En conjunto, estos resultados muestran que existe un efecto similar sobre los nucleoides con el tratamiento de DMSO y DMF al 10%, que consiste en una reducción de la capacidad total de expansión del halo. Dadas las propiedades similares entre estos 2

solventes apróticos, no es posible inferir si el efecto observado es producto de su viscosidad o de modificar la estructura de las biomoléculas que constituyen a los nucleoides. Sin embargo, el tratamiento con glicerol al 10% también mostró un efecto similar al de los solventes apróticos, a pesar de que su viscosidad es similar a la del medio acuoso estándar y se conocen sus efectos estabilizadores sobre la estructura de las proteínas. Esto sugiere que la viscosidad no es el principal factor que altera la expansión de los nucleoides, y más bien, cualquier tipo de cambio sobre la estructura proteica tendrá efectos sobre la NHOS. Por lo tanto, se aumentó la concentración de solvente utilizada a 50%, con el fin de obtener efectos drásticos que puedan aportar más información.

Ensayos con DMSO al 50%

Al realizar los ensayos de nucleoides con DMSO al 50%, donde su viscosidad aumenta a 3.83 cP (Schichman y Amey, 1971), no se observó ningún cambio en la expansión del halo (fig. 45g-i), es decir, los nucleoides mantenían un radio de halo promedio de 11.7 μm (35.45 kbp) a lo largo de la observación, a pesar de estar en presencia de EtBr. Al examinar las micrografías de contraste de fases, el aumento de tamaño de la matriz pasados los 30 s es casi indetectable, teniendo un diámetro promedio de 19.32 μm a los 0 s (fig. 45f) y de 19.57 μm a los 30 s (fig. 45j), un aumento de apenas 0.25 μm . Este resultado sugiere que los cambios observados efectivamente están relacionados con alteraciones sobre la estructura de las proteínas de la NM y el DNA.

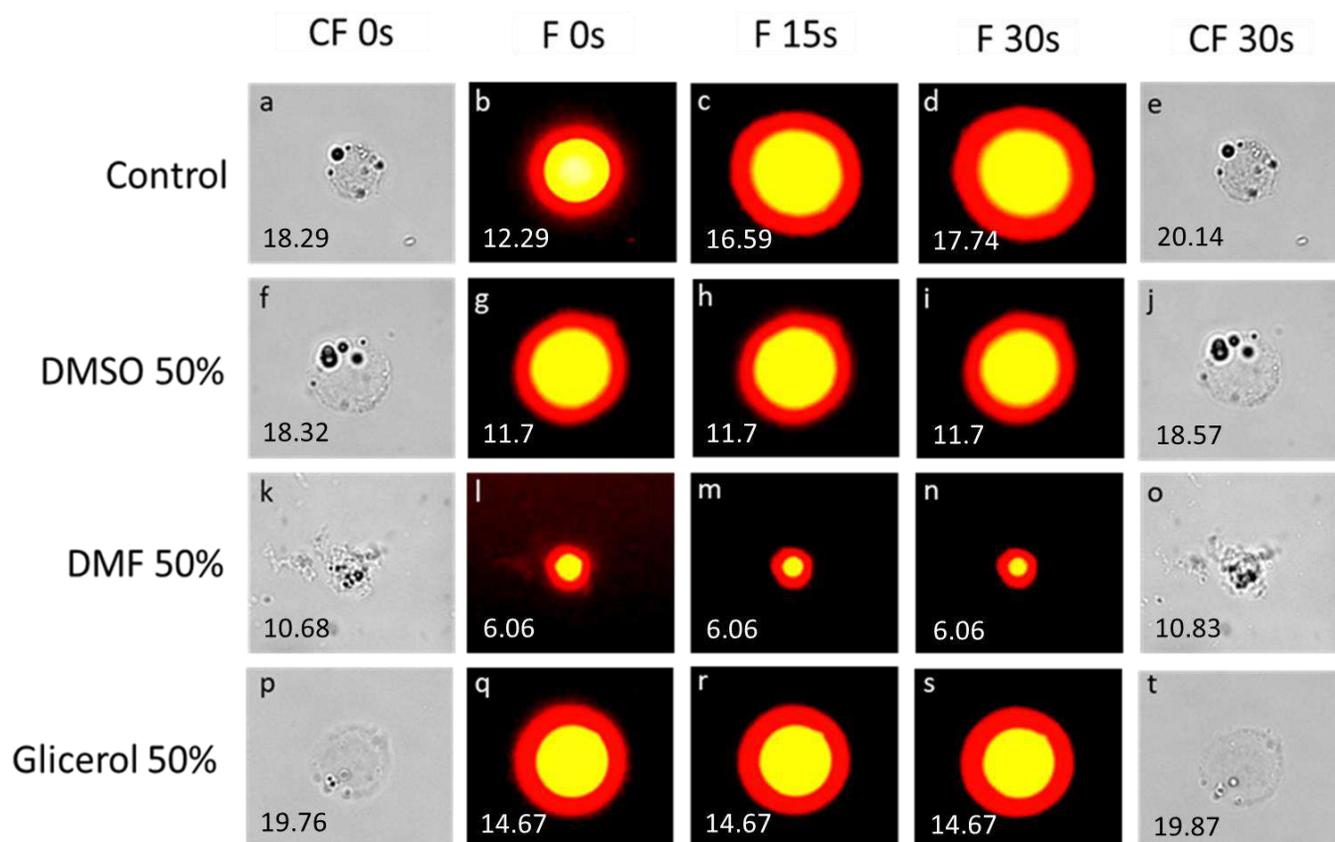


Figura 45. Ensayos de expansión de halos con solventes al 50%. Se muestran 3 tiempos (0 s, 15 s y 30 s) ya sea en microscopía de contraste de fases (CF) o en fluorescencia (F). Primera fila: expansión del halo de un nucleoide control. Segunda fila: expansión del halo de un nucleoide tratado con DMSO al 50%. Tercera fila: expansión del halo de un nucleoide tratado con DMF al 50%. Cuarta fila: expansión del halo de un nucleoide tratado con glicerol al 50%. Los valores en la esquina inferior izquierda de cada imagen corresponden al valor promedio obtenido de dichos tratamientos en un tiempo particular, diámetro de la NM en CF y radio de halo en F. Estos mismos valores se muestran en la Tabla 2.

Ensayos con DMF al 50%

También se hicieron experimentos con nucleoides tratados con DMF al 50%, donde su viscosidad es de 2.17 cP (Józwiak *et al.*, 2013). Se observó que desde el inicio los nucleoides experimentaron una reducción en su tamaño y no mostraron cambios con el paso del tiempo, aunque todavía se aprecia una NM y un pequeño halo alrededor de esta. Los halos tienen un radio promedio de tan sólo 6.06 μm (18.36 kbp) a lo largo de la toma de los videos (fig. 45l-n), mientras que para la NM se registró un diámetro promedio de 10.83 μm a los 30 s (fig. 45o). Cabe resaltar que la morfología de estos nucleoides era distinta, con formas irregulares cuando se visualizaban en contraste de fases. Estas

observaciones sugirieron que quizás existía una destrucción parcial o total de los nucleoides, con la posibilidad de que las matrices observadas eran las que sobrevivían al tratamiento.

En el fondo de los campos con este tratamiento se observa una ligera fluorescencia, similar a una nube fluorescente, que se extingue conforme pasa el tiempo (fig. 46). Este fenómeno no se observó en ningún otro tratamiento, es probable que esta fluorescencia consista de DNA de doble cadena cuya interacción con la NM se redujo o eliminó por completo.

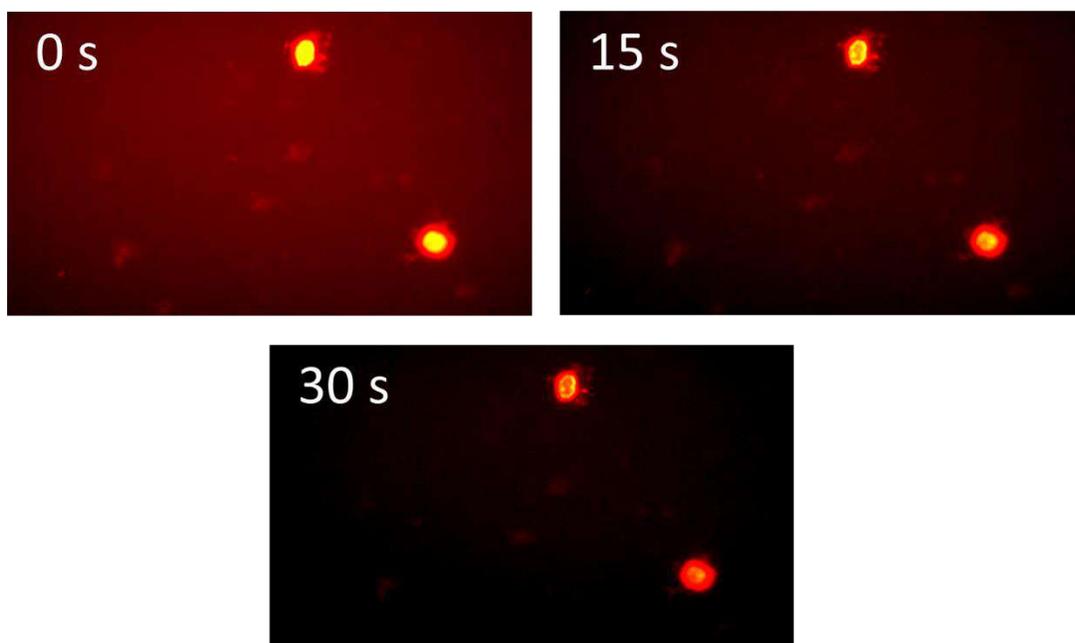


Figura 46. Fluorescencia observada en el fondo de las preparaciones tratadas con DMF. Como se observa en los distintos tiempos, dicha fluorescencia se extingue conforme avanza la observación.

Ensayos con glicerol al 50%

Por último, en los ensayos con glicerol al 50%, en los cuales la viscosidad aumenta hasta 8.36 cP (Cheng, 2008; Volk y Kähler, 2018), los nucleoides muestran desde el inicio (0 s) (fig. 45q) un mayor tamaño de halo que aquel que poseen los controles en este mismo tiempo (fig. 45b) y mantienen este mismo tamaño durante los 30 s de observación (fig.

45q-s), con un radio promedio de 14.67 μm (44.45 kbp). Esta observación es sorprendente, ya que se esperaba que el aumento drástico de viscosidad se opusiera a la expansión del halo, y, sin embargo, el halo de estos nucleoides daba la impresión de ya haberse expandido incluso previo a la observación. Al igual que con los solventes apróticos al 50%, la NM no tuvo gran cambio en su diámetro promedio, empezando con 19.76 μm y alcanzando 19.87 μm , un aumento de 0.11 μm . Esto sugiere que el glicerol podría actuar sobre el DNA y las proteínas de los nucleoides, promoviendo la pérdida del hiperenrollamiento negativo incluso antes de la adición de EtBr, así como restringiendo la expansión del halo a una capacidad que no es la máxima observada en los controles. En la tabla 2 se muestran los promedios de las mediciones obtenidas de los nucleoides tratados con solventes al 50%.

Tratamiento	Radio (halo)			Diámetro (NM)	
	Tiempo			Tiempo	
	0 s (μm)	15 s (μm)	30 s (μm , kbp)	0 s (μm)	30 s (μm)
Control	12.29	16.59	17.74, 52.17	18.29	20.14
DMSO 50%	11.7	11.7	11.7, 34.41	19.32	19.57
DMF 50%	6.06	6.06	6.06, 17.82	10.68	10.83
Glicerol 50%	14.67	14.67	14.67, 43.14	19.76	19.87

Tabla 2. Mediciones promedio para tratamientos al 50%. Naranja: Mediciones del radio de halo promedio para los diferentes tratamientos, Se muestra en μm para los tres tiempos, sin embargo, a los 30 s también se muestra en kbp, debido a que el factor de conversión mencionado previamente aplica únicamente para DNA relajado. Azul: Mediciones del diámetro promedio de la NM para los diferentes tratamientos.

Estos resultados, mostrados gráficamente en la figura 47, apoyan la noción de que los efectos observados en los nucleoides se atribuyen a cambios sobre la estructura proteica, a causa de la interacción con estos solventes polares, y se descarta la viscosidad del medio como un factor significativo. Las observaciones realizadas con solventes al 50%, como se esperaba, son más dramáticas que las obtenidas con solventes al 10%, así mismo, los efectos entre tratamientos son más divergentes entre sí que los observados con solventes al 10%, donde los efectos de los distintos solventes son prácticamente iguales. Al obtener estos resultados, se realizaron experimentos en los cuales se incubaron los nucleoides con solvente al 50% durante una hora, para

evaluar si con un mayor tiempo de tratamiento se obtienen otros resultados. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los tratamientos con distinto tiempo de incubación, lo que sugiere que los cambios observados surgen desde el momento que se agrega el solvente.

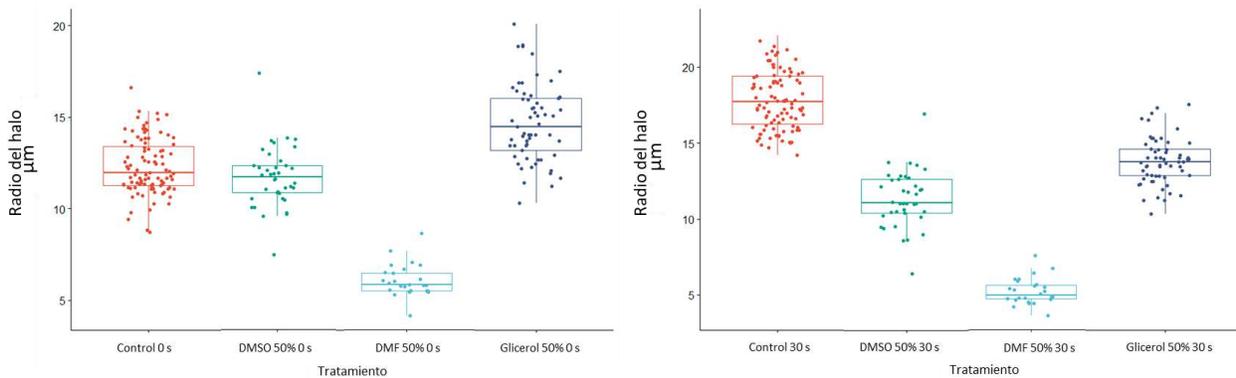


Figura 47. Diagramas de caja y bigotes que muestran las medidas de radio de los halos para los 4 tratamientos al 50%. Izquierda: medidas de los halos a los 0 s. Derecha: medidas de los halos a los 30 s. Los controles (rojo) experimentaron un aumento significativo en el tamaño de su halo, mientras que los nucleoides tratados con un solvente en específico mostraron un comportamiento distinto y único (descrito en el texto).

iv. Conteo por campos

Como se mencionó anteriormente, en el tratamiento con DMF al 50%, desde el tiempo 0 s existe una reducción drástica en el tamaño de los nucleoides. Pensando en que podría existir una destrucción total o parcial de los nucleoides, se realizó un conteo por campos en muestras control y tratadas con solventes al 50%. Como se observa en la figura 48, no se encontraron diferencias con respecto a los controles: cada campo de cada tratamiento contenía en promedio 4 nucleoides, lo que implica que no hay pérdida neta de nucleoides, solo una reducción en su tamaño.

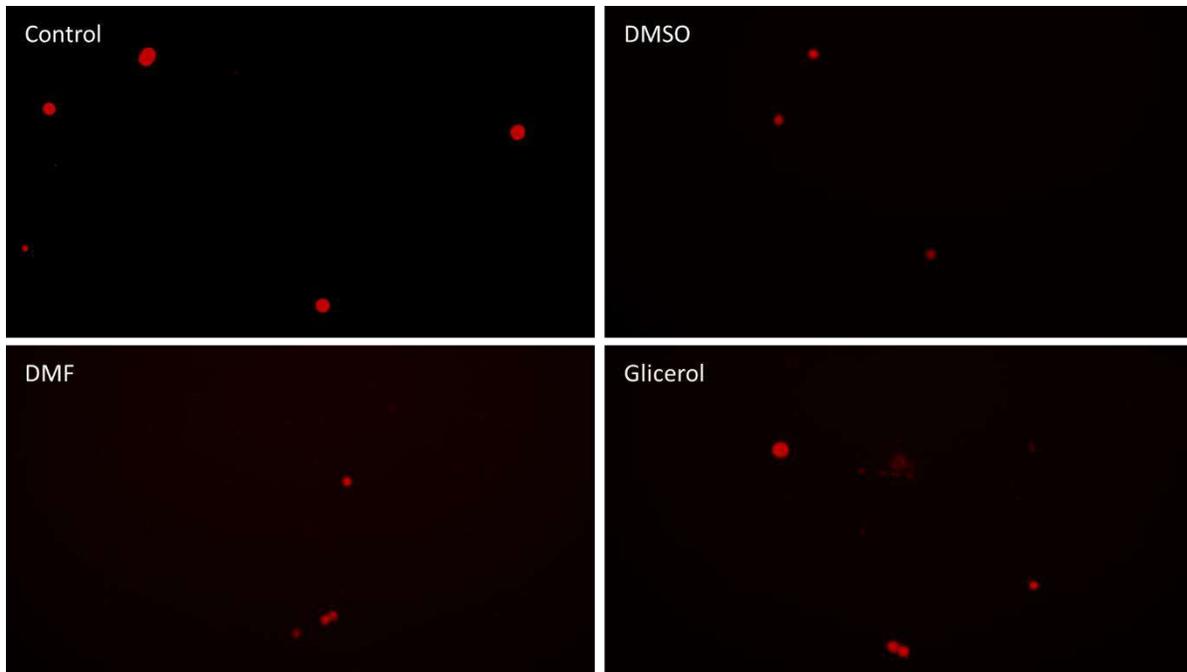


Figura 48. Ejemplos de campos observados con diferentes tratamientos. Se encontraron alrededor de 4 nucleoides por campo en todos los distintos tratamientos al 50%.

v. Extracción de proteínas

Pensando que quizás existía una pérdida de masa proteica durante el tratamiento con DMF al 50%, se extrajeron las proteínas de nucleoides control, nucleoides tratados con DMSO al 50% y nucleoides tratados con DMF al 50%, para evaluarse en un gel de poliacrilamida, con la intención de verificar si esta supuesta pérdida es cuantitativa (se pierde masa proteica en general) o cualitativa (se pierden algunos tipos de proteínas mientras que otros se conservan). En los nucleoides tratados con glicerol no se pudo realizar la extracción debido a que la alta viscosidad del solvente interfiere con el protocolo de extracción. Una observación interesante durante el proceso de extracción de proteínas fue que el precipitado de nucleoides tratado con DMF al 50% no se podía resuspender en el volumen original a pesar de una continua maceración mecánica, formando un agregado insoluble (fig. 49c), a diferencia de los nucleoides control y los tratados con DMSO 50%, que se resuspenden sin mayor dificultad, como se muestra en la figura 49a y 49b, respectivamente. Sorprendentemente, incluso después de calentarse por 10 min a 100°C, este agregado permanecía insoluble, cuando esta temperatura debería ser más que suficiente para desnaturalizar las proteínas presentes.

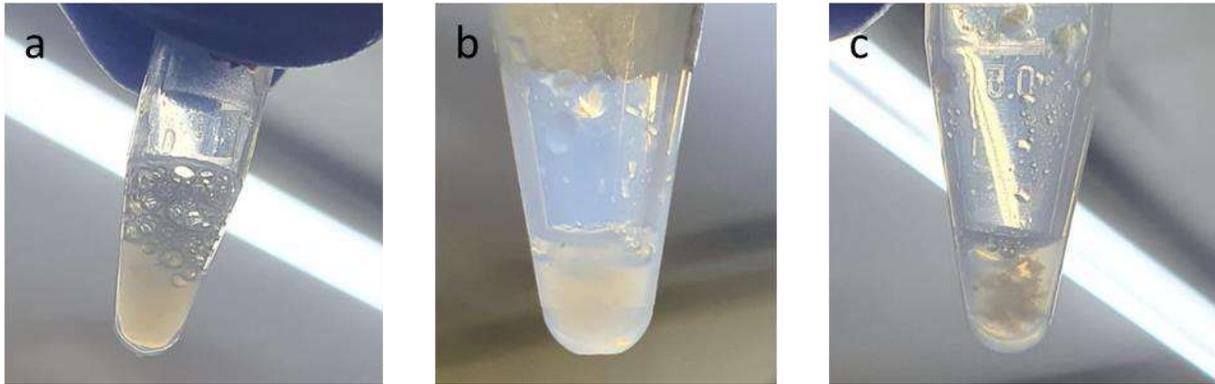


Figura 49. Precipitados formados durante la extracción de proteínas. a) control, soluble. b) DMSO, soluble. c) DMF, insoluble y con una apariencia chiclosa.

vi. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Durante la cuantificación de las proteínas en el espectrofotómetro, los precipitados presentaban abundante cantidad de proteína, mientras que en los sobrenadantes no se detectó proteína, por lo que no pudieron utilizarse para correr el gel. En vista de la insolubilidad del precipitado de DMF, se optó por cuantificar la proteína presente en la solución que se encontraba el precipitado, y esta misma se utilizó para cargar 15 μg de proteína al gel. En el caso de los precipitados control y de DMSO no hubo complicaciones para resuspender, y de esta resuspensión se tomaron 15 μg de proteína, de cada uno, para correr en el gel. Como se observa en la figura 50, al correr el gel no se observaron diferencias en el patrón de bandas (correspondientes a las proteínas de la NM) entre los tratamientos, lo que sugiere que, de existir una pérdida de masa proteica, se trata de un cambio cuantitativo, no cualitativo. Sin embargo, esta técnica no permite inferir si realmente existe una pérdida de masa proteica.

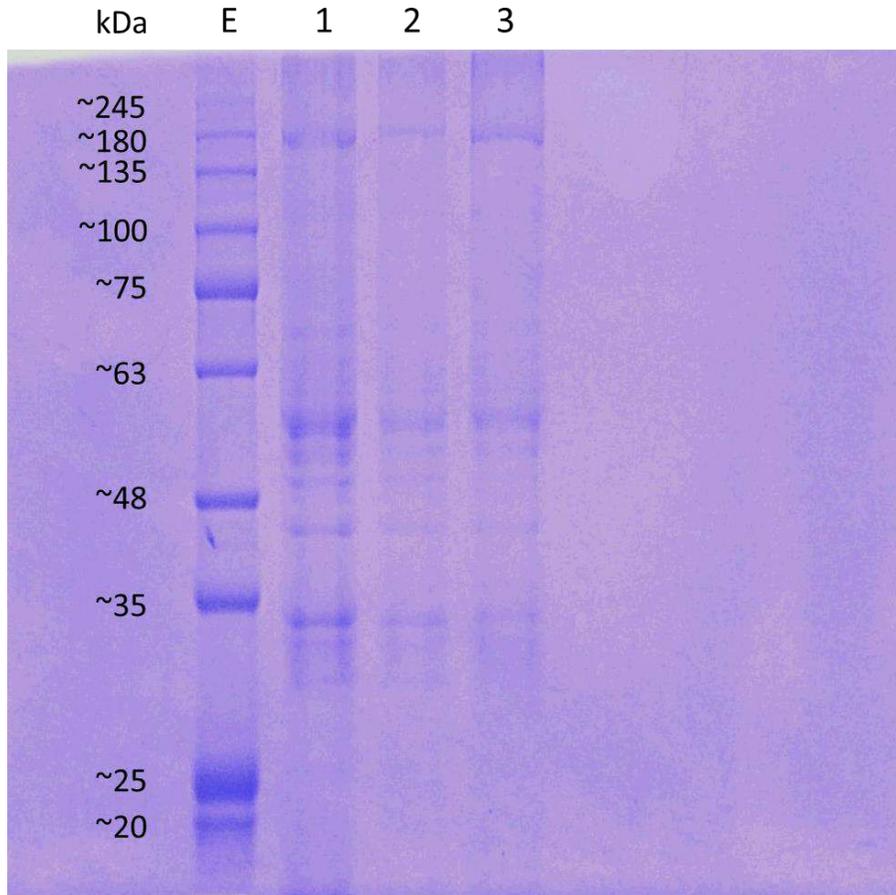


Figura 50. Electroforesis en gel de poliacrilamida. La escalera (E) muestra proteínas de pesos (kDa) conocidos. Las bandas presentes en el carril control (1) son las habitualmente presentes en los nucleoides, y, sin embargo, al analizar los carriles de DMSO (2) y DMF (3), se observan las mismas bandas, indicando que no existe un cambio cualitativo durante el tratamiento con solventes.

vii. Digestión con DNAsa I

Considerando que los precipitados de nucleoides, además de contener proteínas, contienen DNA, se trataron con 0.5U/ml de DNAsa I durante 30 min, con el fin de observar si la digestión del DNA presente permite resuspender el precipitado insoluble generado por DMF al 50% (fig. 51c). El tratamiento con DNAsa (fig. 51d) permitió resuspender fácilmente el precipitado previamente insoluble generado por DMF (fig. 51g), y dado que la DNAsa no tiene efecto alguno sobre las proteínas, este resultado indica que el DNA era el responsable de generar el agregado insoluble.

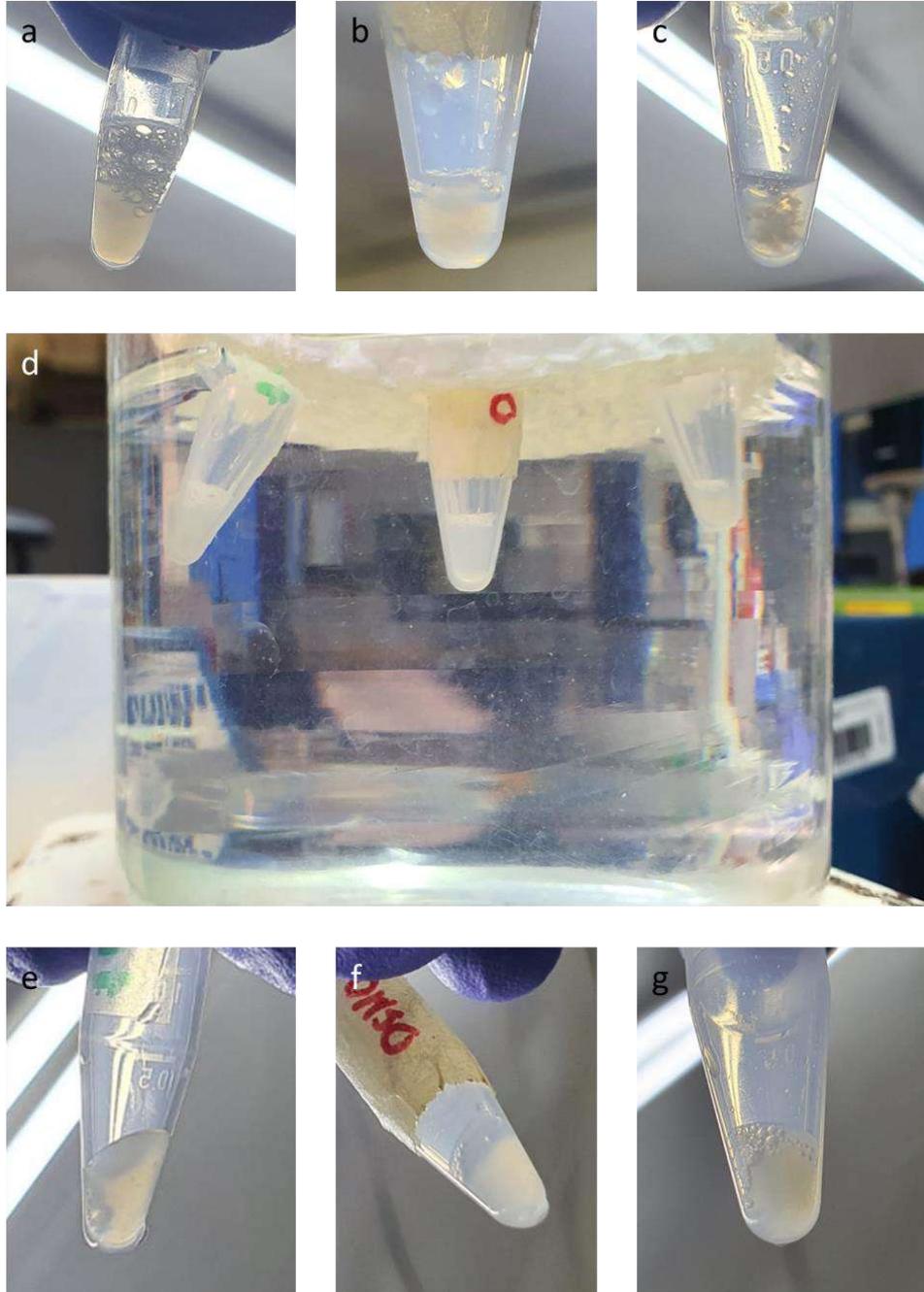


Figura 51. Precipitados tratados con DNAsa I. a) Precipitado control previo a la digestión. b) Precipitado tratado con DMSO al 50%, previo a la digestión. c) Precipitado tratado con DMF al 50%, previo a la digestión. d) Fotografía de los nucleoides siendo tratados con DNAsa I a 37°C. e) Precipitado control posterior a la digestión. f) Precipitado tratado con DMSO al 50%, posterior a la digestión. g) Precipitado tratado con DMF al 50%, posterior a la digestión.

viii. Cuantificación de proteínas

Una vez que se logró solubilizar el precipitado inducido por el tratamiento con DMF, se cuantificó la cantidad de proteína presente en los 3 tratamientos (control, DMSO y DMF) utilizando el espectrofotómetro. Esto con el fin de evaluar si existía una pérdida cuantitativa de masa proteica. La cuantificación del precipitado control indicó una concentración promedio de 1067 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para DMSO fue de 936 $\mu\text{g/ml}$ y para DMF de 1079 $\mu\text{g/ml}$. La similitud entre estas mediciones sugiere que no existe una pérdida significativa, y junto con el resultado del gel de poliacrilamida, indica que cantidades similares y los mismos tipos de proteínas están presentes en todas las muestras, independientemente del tratamiento. A continuación, se muestra una tabla con los resultados de estas cuantificaciones.

Mediciones	$\mu\text{g/ml}$		
	Control	DMSO	DMF
1	1072	983	1034
2	1084	904	951
3	1046	922	1254
Promedio	1067	936	1079

Tabla 3. Mediciones obtenidas al cuantificar la proteína presente ($\mu\text{g/ml}$) en los precipitados resuspendidos correspondientes a los diferentes tratamientos.

DISCUSIÓN

Los bucles estructurales de DNA hiperenrollados anclados a proteínas de la matriz nuclear (NM) mediante regiones de anclaje de bucles (LARs) definen una estructura de orden superior al interior del núcleo (NHOS). La organización de los largos cromosomas eucariotas en dominios topológicos independientes permite disipar el estrés estructural al que la molécula está intrínsecamente sometida sin comprometer su integridad, así como también modificar (ej. durante la transcripción o reparación del DNA) cada uno de estos dominios sin alterar los dominios vecinos. Esta estructura satisface los principios de tenseguridad estructural y otorga al núcleo su estructura, y simultáneamente acopla mecánicamente la cromatina, la NM, el citoesqueleto y la matriz extracelular. La NHOS puede ser estudiada en modelos experimentales denominados nucleoides, y como se muestra en las figuras 44 y 45, el tratamiento agudo de preparaciones de nucleoides con los solventes polares apróticos dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF), así como con el solvente polar glicerol, resulta en cambios observables sobre la NHOS. Esto posiblemente se debe a sus efectos sobre la estructura de las proteínas de NM y el DNA, lo que sugiere que cualquier tipo de alteración estructural en estas biomoléculas resultará en el cambio global de la NHOS.

Nucleoides control

Al visualizar nucleoides bajo el microscopio de fluorescencia, la formación de un halo alrededor de la NM en presencia de un agente intercalante (ej. bromuro de etidio (EtBr) o yoduro de propidio (PI)) es una observación bien descrita (Cook *et al.*, 1976; Roti-Roti y Wright, 1987). Este halo consiste de los bucles estructurales de DNA anclados a conglomerados proteicos pertenecientes a la NM, que pierden su hiperenrollamiento negativo natural como consecuencia de la interacción mecánica con el agente intercalante, adquiriendo una conformación relajada y extendida (Roti-Roti y Wright, 1987). En las preparaciones de nucleoides evaluadas, se observó la formación de este halo alrededor de la NM y se midió su radio, el cual equivale al tamaño promedio de los bucles desde la base hasta la punta (Razin *et al.*, 1995). La medida de radio promedio obtenida de los nucleoides control fue de 17.74 μm , que equivale a un tamaño de bucle de base a punta de 52.17 kbp, por lo que su longitud total es de 104.34 kbp. Estos valores

son similares a los reportados por Maya-Mendoza *et al.* (2005) para radio promedio (16.63 μm), tamaño de bucle de base a punta (48.9 kbp) y longitud total del bucle (97.8 kbp).

Expansión de la NM

Una observación realizada durante la toma de fotografías de contraste de fases y posteriormente comprobada mediante mediciones, es que el diámetro de la NM aumenta simultáneamente con la expansión del halo de DNA. Este aumento, si bien no es de gran magnitud (aprox. 2 μm), es lo suficientemente notorio para apreciarse durante la toma de las imágenes. Probablemente este incremento sea producto de la relajación del DNA, que, de acuerdo con el modelo de tensegridad, es el conector que une a las proteínas de la NM (Maniotis *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2011; Aranda-Anzaldo, 2016). Debido a esto, la pérdida del hiperenrollamiento del DNA como consecuencia de su interacción con el EtBr se traduce como una pérdida de la tensión a lo largo de todo este sistema estructural, aumentando el espacio entre sus componentes proteicos, lo que se visualiza como el aumento de área de la NM bajo el microscopio (fig. 52).

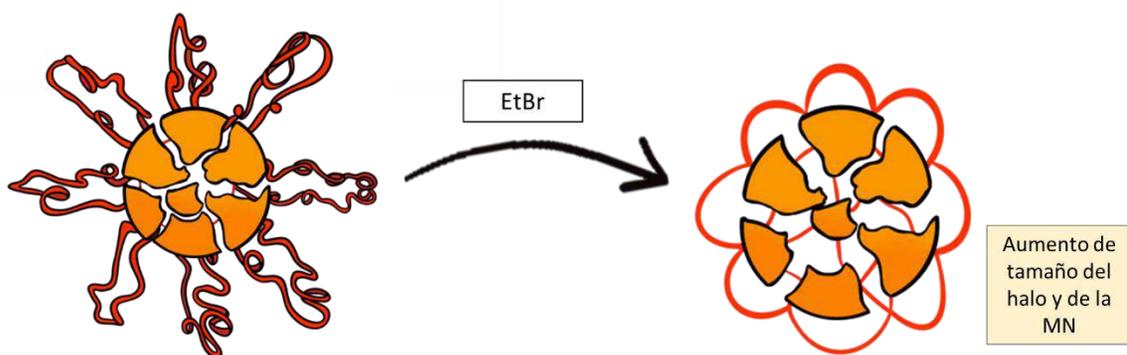


Figura 52. Nucleoides control. A la izquierda se muestra un nucleoide previo a su observación con EtBr, nótese como el DNA de los bucles está hiperenrollado. Una vez que el DNA interactúa con el EtBr, pierde su hiperenrollamiento y aumenta tanto el tamaño del halo como de la NM, debido a la continuidad mecánica que existe entre estos dos componentes.

Nucleoides con solventes al 10%

Al tratar los nucleoides con DMF, DMSO y glicerol al 10% se obtuvo un efecto bastante similar entre los tres tratamientos. Este consistía en una ligera disminución de la

capacidad máxima de expansión del halo en comparación a la observada en los controles. Considerando que el tamaño máximo del halo es equivalente a la longitud de los bucles relajados desde la base a la punta (Pienta y Coffey, 1984; Razin *et al.*, 1995), estos resultados sugieren que el tamaño promedio del bucle se redujo. Una posibilidad es que los efectos observados sean producto de la viscosidad de los solventes, ya que entre más viscoso sea un medio, opondrá mayor resistencia mecánica a la fuerza de expansión del halo, lo que podría limitar su expansión máxima.

Para probar esta hipótesis, se contrastaron las mediciones obtenidas de los distintos tratamientos con los valores de viscosidad reportados para cada solvente. Basándonos en los valores promedio de radio de halo obtenidos, los nucleoides que mostraron mayor disminución en tamaño máximo del halo son los tratados con DMF (promedio de 14.86 μm), seguido de los tratados con DMSO (promedio de 15.43 μm) y, por último, los tratados con glicerol (promedio de 15.94 μm). Si se tratase de la viscosidad, la mezcla con mayor viscosidad, y, por lo tanto, la que más debería oponerse a la expansión del halo, sería la de DMSO 10%, con 2.15 cP (Schichman y Amey, 1971). Sin embargo, el mayor efecto sobre el tamaño del halo lo ejerce DMF 10%, que posee una viscosidad de 2.01 cP (Józwiak *et al.*, 2013). Además, el glicerol al 10% tiene un efecto comparable al de los solventes apróticos, a pesar de que su viscosidad (1.3 cP; Cheng, 2008; Volk y Kähler, 2018) es muy similar a la del medio acuoso estándar (1 cP). Estas observaciones sugieren que la viscosidad del medio no es un factor relevante en definir la capacidad máxima de expansión del halo, y que los efectos observados deben atribuirse a otra propiedad de los solventes.

Otra observación interesante es que, en el tiempo 0 s, tanto la NM como el halo de los nucleoides tratados son ligeramente más grandes que aquellos de los nucleoides control. ¿A qué podría deberse esto? Los tres solventes ensayados tienen la capacidad de inducir la pérdida del hiperenrollamiento del DNA, mediante la alteración de sus interacciones con el medio acuoso que lo rodea (Sínanoğlu y Abdunur, 1964; Lee *et al.*, 1981; Ke *et al.*, 2010). Una posibilidad razonable es que, al momento de agregar el solvente, la pérdida del hiperenrollamiento resultante aumente el tamaño del halo y de la NM, debido a su estrecha interacción mecánica. Sin embargo, dicha pérdida del

hiperenrollamiento debe ser parcial, ya que como se describió anteriormente, al observarse bajo fluorescencia, los halos de los nucleoides tratados expanden ligeramente. Esta expansión del halo indica que aún existe hiperenrollamiento residual a pesar del medio con solvente, hiperenrollamiento que se disipa cuando estos nucleoides se visualizan con EtBr. (Gekko y Timasheff, 1981)

No obstante, esto no explica por qué los nucleoides tratados no alcanzan el tamaño máximo establecido por los nucleoides control una vez que expande el halo. Posiblemente, esto recae en la capacidad de estos solventes de alterar la estructura proteica. El DMSO es capaz de inducir la transición de hélices- α hacia láminas- β (Tunçer *et al.*, 2018), y asumiendo que este también es el caso de la DMF, los solventes polares apróticos perturban la estructura nativa de las proteínas. Sin embargo, dicha perturbación no necesariamente implica desnaturalización, más bien corresponde a la hiperestabilización de una conformación proteica que no corresponde a la estructura nativa. El aumento relativo de láminas- β podría inducir un estado más compacto en la estructura global de la proteína, debido a que estos motivos estructurales son capaces de empacarse densamente y formar estructuras compactas (Cheng *et al.*, 2013); como ocurre en el caso de los priones (Stroylova *et al.*, 2014) y los amiloides en la enfermedad de Alzheimer (Toyama y Weissman, 2011).

La compactación de las proteínas de la NM en turno podría limitar el tamaño del halo, debido a la continuidad mecánica que existe entre estas y el DNA que forma los bucles estructurales (fig. 53). Este cambio conformacional también es capaz de alterar la capacidad de las proteínas de interactuar con otras moléculas (Tjernberg *et al.*, 2006), por lo que la afinidad de unión de las proteínas de la NM por el DNA [misma que cambia dependiendo de la conformación de este último: DNA de doble cadena hiperenrollado, DNA de doble cadena sin hiperenrollamiento y DNA de cadena sencilla] (Hakes y Berezney, 1991; Dickinson y Kohwi-Shigematsu, 1995; García-Vilchis y Aranda-Anzaldo, 2017) puede modificarse al estar en el medio con solvente.

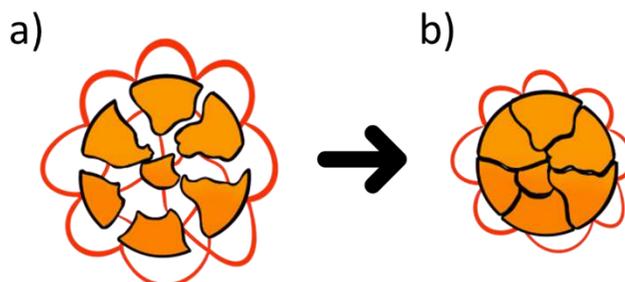


Figura 53. Compactación de la NM. Al agregar el solvente, el halo del nucleosoma pierde el hiperenrollamiento y se expande (a). Sin embargo, por efecto de este mismo solvente, las proteínas de NM se compactan, disminuyendo el tamaño global de la NM y con ello, el tamaño máximo del halo (b), a raíz de la estrecha relación entre los bucles de DNA y las proteínas de NM. Esta figura no tiene la intención de sugerir que la NM esté rota o fragmentada, simplemente se intenta representar de forma sencilla la compactación de sus componentes.

Un fenómeno similar ocurre en los nucleosomas tratados con glicerol al 10%. Sin embargo, en este caso, la compactación de las proteínas de la NM se lleva a cabo mediante un mecanismo distinto, conocido como hidratación preferencial. En este, la interacción del solvente con la superficie polar expuesta de las proteínas resulta desfavorable, por lo que este se excluye de la capa de solvatación de la proteína y favorece su compactación (Arakawa *et al.*, 2007; Vagenende *et al.* 2009). Esto resulta en un efecto muy similar al observado con los solventes polares apróticos.

Como conclusión, la fenomenología observada al tratar los nucleosomas con estos solventes al 10% es muy similar entre los tres tratamientos. Cuando se observan con EtBr, el halo de los nucleosomas tratados se expande, a pesar de que estos solventes tienen la capacidad de inducir la pérdida del hiperenrollamiento. Esto sugiere que esta concentración de solvente es incapaz de inducir la pérdida total del hiperenrollamiento presente en los bucles estructurales, y más bien sólo se trata de una pérdida parcial. Así mismo, la expansión del halo de estos nucleosomas es menor a la experimentada por los nucleosomas control. Se pensaba que esto era producto de la viscosidad de los solventes, pero los datos de viscosidad respectivos no son congruentes con esta idea. Al considerar que estos solventes son capaces de modificar la estructura de las proteínas, se sugiere que los fenómenos observados se deben a la interacción del solvente con las proteínas de la NM, que resulta en una compactación de las proteínas y, por ende, de todo el sistema estructural, debido a su continuidad mecánica (fig. 54). Es importante mencionar

que el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta compactación es distinto entre los solventes polares apróticos y el glicerol. Sin embargo, a esta concentración, ambos resultan en observaciones similares.

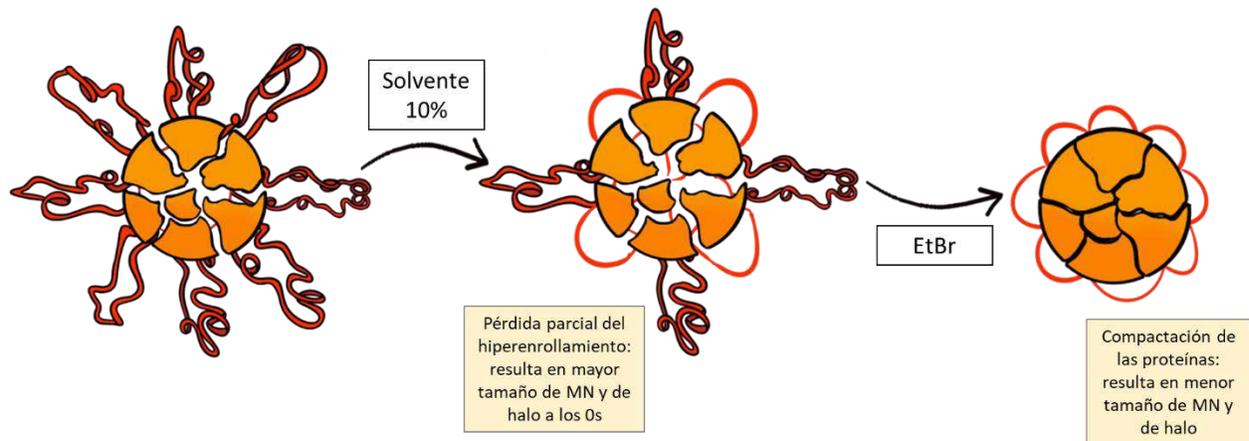


Figura 54. Nucleosidos tratados con solventes al 10%. Al momento en que se agrega el solvente, este induce la pérdida parcial del hiperenrollamiento, lo que resulta en un tamaño ligeramente mayor de NM y de halo en el tiempo 0 s. Posteriormente, se observa que dicho halo no expande al tamaño establecido por los nucleosidos control, debido a la compactación de las proteínas y por ende, de todo el sistema.

Nucleosidos con solventes al 50%

Posteriormente se trataron los nucleosidos con estos mismos solventes a una concentración de 50%. Esta corresponde a la concentración habitualmente empleada para tratar la cistitis intersticial con DMSO (Melchior *et al.*, 2003). Cuando se observan en microscopía de fluorescencia, los nucleosidos tratados con DMSO al 50% poseen una estructura normal, pero a diferencia de los nucleosidos control y los tratados con solventes al 10%, el halo de DNA no se expande durante la observación. Además, este halo es en promedio más pequeño que el observado en los controles.

¿Porqué el halo de estos nucleosidos no se expande? Retomando la idea discutida previamente, una concentración de solvente de 10% no es suficiente para disipar todo el hiperenrollamiento presente en los bucles de DNA, evidenciado por el hecho de que el halo de los nucleosidos aún expande tras añadirse EtBr. Sin embargo, una concentración

de solvente de 50% probablemente disipe todo el hiperenrollamiento desde el momento en que se agrega, previo a la observación en el microscopio, por lo que no se observa expansión alguna. Esto es consistente con lo reportado por Lee *et al.* (1981), donde al agregar concentraciones crecientes de varios solventes, entre los que se incluye DMSO, una molécula de DNA constreñida topológicamente pierde su hiperenrollamiento gradualmente.

Además, se ha reportado que el efecto del DMSO sobre la estructura de las proteínas es dependiente de su concentración (Arakawa *et al.*, 2007; Stepankova *et al.*, 2013), por lo que a una concentración de 50% podría existir un mayor grado de compactación de las proteínas de NM que el obtenido con 10%. Esto a su vez restringe el tamaño máximo que puede alcanzar el halo de DNA, lo que resulta en el halo de menor tamaño observado en este tratamiento, incluso cuando ya perdió todo su hiperenrollamiento (fig. 55).

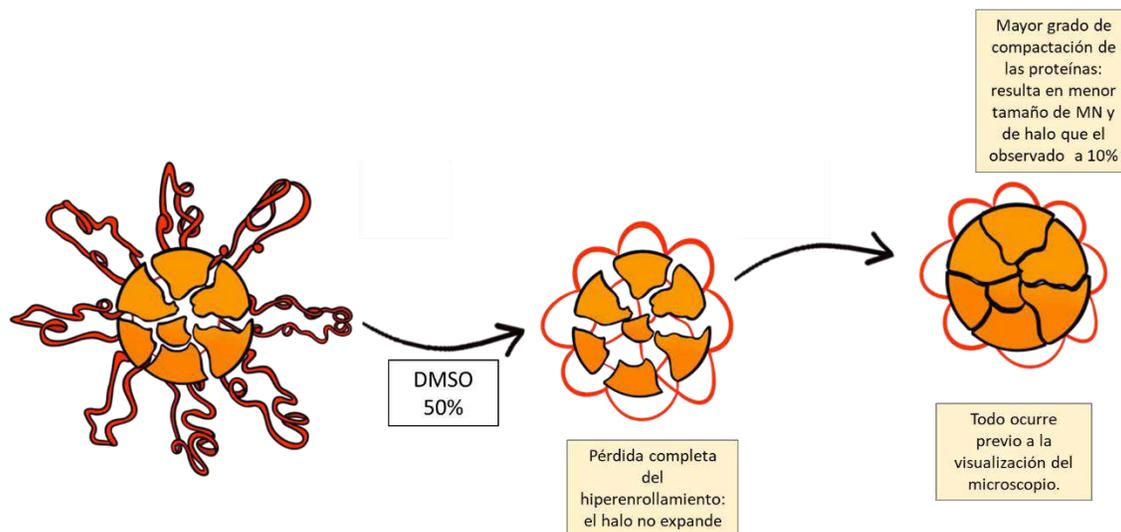


Figura 55. Nucleoides tratados con DMSO al 50%. Al momento en que se agrega este solvente, se disipa todo el hiperenrollamiento del DNA, por esto el halo no expande en observación. Sin embargo, este halo es de menor tamaño debido a una mayor compactación de las proteínas de NM en comparación a lo visto con 10% de este solvente.

Al visualizar los nucleoides tratados con DMF al 50% en microscopía de contraste de fases, se observan NMs diminutas y con ligeras deformaciones. En microscopía de

fluorescencia, estas estructuras poseen a su alrededor un pequeño halo de DNA que no se expande. En sí, el efecto de este tratamiento es una disminución global del tamaño del nucleoide, tanto de la NM como del halo. Como perspectiva, el diámetro de un nucleoide control previo a la expansión del halo es de 24.58 μm , y alcanza 35.48 μm una vez que este expande, mientras que el diámetro de los nucleoides tratados con DMF al 50% es de 12.1 μm .

Una explicación inicial a esta reducción de tamaño es que la DMF ejerza un efecto desnaturalizante sobre las proteínas de la NM, induciendo la pérdida de toda estructura y liberando estas moléculas de la NM, causando el desensamble de nucleoides enteros. Con la finalidad de evaluar esta hipótesis, se contaron en forma comparativa los nucleoides presentes por campo. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la cantidad de nucleoides entre los controles y las muestras tratadas con el solvente, lo que indica que el solvente no provoca el desensamble completo de los nucleoides.

Posteriormente, se propuso que quizás la DMF inducía la desnaturalización y pérdida de una porción del total de proteínas de la NM, lo que resultaba en la reducción de tamaño observada. Considerando esto, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con las proteínas de los nucleoides control y las obtenidas de nucleoides tratados con DMSO y DMF al 50%, con el fin de evaluar si existía una pérdida cualitativa (pérdida de proteínas específicas) entre las proteínas de la NM. Durante el proceso de extracción de proteínas, se observó que las pastillas (“pellets”) resultados de la centrifugación de los nucleoides se pueden disociar y resuspender con facilidad en el caso de los controles y de las muestras tratadas con DMSO, mientras que este no es el caso en las muestras tratadas con DMF. Dada la insolubilidad de los nucleoides tratados con DMF, se procedió a extraer las proteínas del sobrenadante correspondiente. Los perfiles proteicos de los nucleoides control y tratados con DMSO fueron similares a los del sobrenadante de los nucleoides tratados con DMF, indicando que no hay diferencias cualitativas en cuanto a composición proteica entre los tres tipos de muestra.

La insolubilidad del pellet obtenido del tratamiento con DMF 50% podría ser la consecuencia de que las proteínas de la NM formen agregados de tipo amiloide. Dichos amiloides se generan, por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer o en enfermedades

priónicas, y consisten de agregados proteicos muy estables, resistentes al tratamiento con proteasas, altas temperaturas y a la fuerza mecánica (Torrent *et al.*, 2006; Stroylova *et al.*, 2014). Una característica de las proteínas que forman estos agregados es una abundancia relativa de dominios con estructura tipo lámina β , característica que también poseen las proteínas tratadas con DMSO (Tunçer *et al.*, 2018). Considerando que DMSO y DMF son solventes polares apróticos, es factible que ambos puedan formar agregados de este tipo. Entonces, ¿por qué no se observa un pellet insoluble en el tratamiento con DMSO? Los datos reportados por Stepankova *et al.* (2013) sugieren que, a una misma concentración, el grado de perturbación de la estructura proteica es distinto entre los dos solventes. Estos datos muestran que se requiere una mayor concentración de DMSO para igualar los efectos conseguidos a una concentración menor de DMF, lo cual explica las diferencias observadas entre estos dos tratamientos al 50%, así como la insolubilidad y resistencia del pellet.

Los nucleoides constan tanto de proteínas como de DNA, por lo que se trató el pellet insoluble con DNAsa I, para evaluar si esta enzima era capaz de causar cambios en su solubilidad. En un corto lapso, la DNAsa I fue capaz de desintegrar y solubilizar dicho pellet, indicando que la insolubilidad de este precipitado era causada por el DNA y no por las proteínas, ya que las nucleasas, como la DNAsa, no tienen efecto alguno sobre las proteínas. Pero ¿cómo puede el DNA generar un agregado de esta naturaleza? Se propuso que una abundante cantidad de cortes en los bucles de DNA es capaz de inducir la agregación de los nucleoides mediante el enredamiento y apareamiento entre las hebras de DNA de diferentes nucleoides, como se representa en la figura 56.

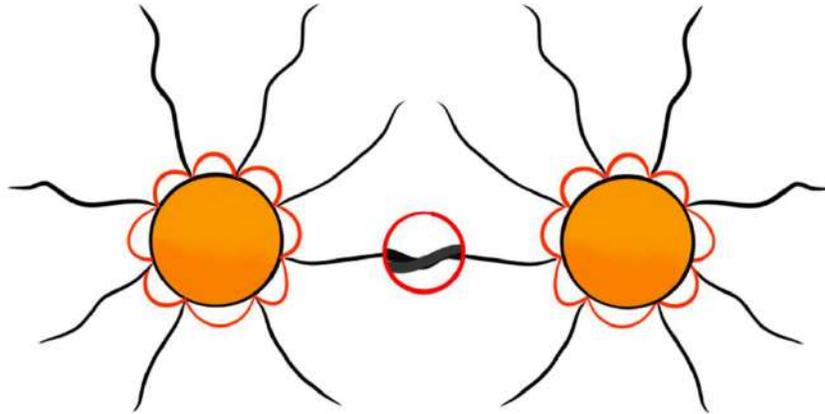


Figura 56. Representación esquemática de los nucleoides tratados con DMF al 50%. Las cadenas de DNA cortadas (líneas negras) previamente formaban bucles estructurales, lo que impedía la agregación de los nucleoides. Como se muestra en el aumento del círculo rojo, estas largas cadenas pueden enredarse y formar apareamientos con las cadenas pertenecientes a otros nucleoides, lo que causa su agregación.

Ejemplo de esto se aprecia en la infección de células HeLa con virus herpes simplex tipo 1, que genera un número significativo de cortes de hebra sencilla en el DNA genómico de la célula huésped (Aranda-Anzaldo, 1992). Los nucleoides extraídos de células infectadas se agregan entre sí, y el grado de agregación depende del tiempo de infección, un mayor tiempo de infección se correlaciona con una mayor cantidad de cortes, por lo que la agregación y enredamiento entre los nucleoides es mayor. Sin embargo, el tratamiento con DNAsa disminuye este enredamiento (fig. 57), sugiriendo que el DNA es responsable de este fenómeno (Aranda-Anzaldo y Dent, 1997). Estas evidencias sugieren que los nucleoides tratados con DMF al 50% poseen abundantes cortes en las moléculas de DNA que previamente formaban sus bucles estructurales, lo que permite su agregación y la formación del pellet insoluble.

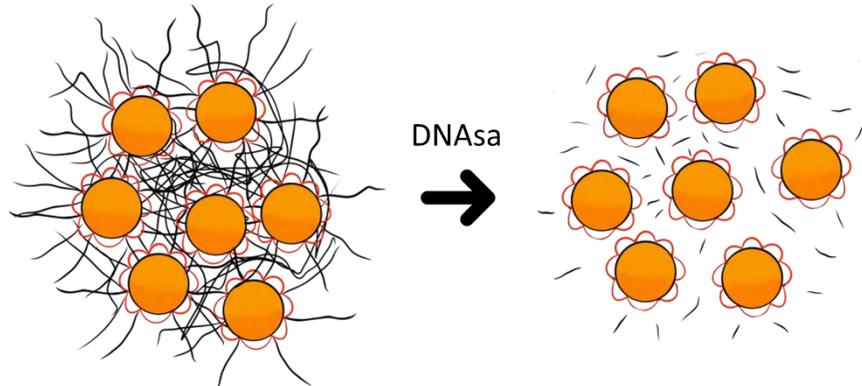


Figura 57. Representación esquemática del agregado de nucleoides y el tratamiento con DNAsa. La resistencia del pellet insoluble se debe al alto grado de interacción entre las cadenas de DNA que se proyectan desde distintos nucleoides (izquierda). El tratamiento con DNAsa corta las cadenas de DNA, empezando por las más expuestas, y rápidamente induce la separación de los nucleoides y la solubilización del pellet (derecha).

Aparentemente, este efecto es exclusivo de DMF, ya que, de ocurrir con los otros solventes, estos probablemente también formarían agregados insolubles. ¿De qué manera puede este solvente inducir roturas en los bucles de DNA? No hay evidencia que indique que la DMF sea capaz de labilizar los enlaces fosfodiéster del DNA, por lo que debe tratarse de un efecto indirecto. Consideramos dos posibilidades. La primera es que el conjunto de proteínas de NM con capacidad de cortar el DNA, como la topoisomerasa II (Berrios *et al.*, 1985), podrían activarse como consecuencia de los cambios conformacionales inducidos por la DMF, realizando cortes en las hebras de DNA. Como segunda posibilidad, las proteínas de la NM podrían compactarse por acción del solvente, o alternativamente, desnaturalizarse y liberarse de la NM, como se explicó previamente. Esto resultaría en la pérdida de una gran parte de los anclajes del DNA a la NM, y como consecuencia, el DNA formaría bucles de gran tamaño (recordemos que un mayor número de anclajes genera bucles cortos, mientras que menos anclajes equivalen a bucles largos). La hidrodinámica y las fluctuaciones térmicas del medio, así como la manipulación de estos nucleoides, fácilmente podrían crear roturas en las hebras de DNA de estos grandes bucles. Independientemente del origen de los cortes, el resultado es la generación de largas cadenas de DNA desnaturalizado que se proyectan desde la NM.

Es posible que el segundo escenario descrito se correlacione con la disminución de tamaño observada en estos nucleoides. Las proteínas de NM podrían compactarse a tal grado que la materia se concentre en el pequeño volumen observado, o, podrían desnaturalizarse y perderse hasta que se alcanza dicho volumen. Para aclarar esta cuestión, se midió la cantidad de proteína presente en los precipitados formados por DMSO 50%, DMF 50% y los controles. Estos precipitados, en principio, se formaron a partir de números aproximadamente iguales de nucleoides, por lo que cualquier diferencia observada podría atribuírsele al efecto de los solventes. Sorprendentemente, las mediciones realizadas no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos, es decir, la cantidad de proteína entre estos se mantiene constante. Estos datos, en conjunto con los resultados del gel de poliacrilamida, sugieren que no existe una pérdida cuantitativa ni cualitativa de proteínas de NM, y más bien, estas se compactan hasta alcanzar el tamaño reducido que se observa en el microscopio.

Lo discutido en los últimos párrafos genera una idea de la posible naturaleza de los efectos que ejerce la DMF al 50% sobre los nucleoides. Sin embargo, surge una pregunta importante. Si el DNA, con abundantes cortes, sigue estando unido a la NM y no se ha liberado al medio, ¿por qué no vemos la formación de un halo de tamaño normal alrededor de la diminuta NM? Esta explicación es relativamente sencilla. El marcador fluorescente utilizado, EtBr, es una molécula hidrofóbica, y requiere encontrarse en un medio hidrofóbico, como es el espacio entre bases donde se intercala, para emitir su fluorescencia. El corte y la desnaturalización del DNA a causa del solvente elimina este espacio hidrófobo, que ahora queda expuesto a las moléculas de agua y de solvente circundantes. La consecuente hidratación del EtBr extingue su fluorescencia (fenómeno conocido como “quenching”; Olmsted III y Kearns, 1977). Dicho de otra forma, las largas cadenas de DNA que ahora se proyectan desde la NM (fig. 58a) no aportan el medio hidrófobo que el EtBr necesita para emitir su señal fluorescente, por lo que no se ven bajo el microscopio de fluorescencia (fig. 58b). El diminuto halo que acompaña a la pequeña NM observada probablemente consta de una minoría de bucles muy cortos y estables, en los cuales todavía predomina la estructura de doble hélice.

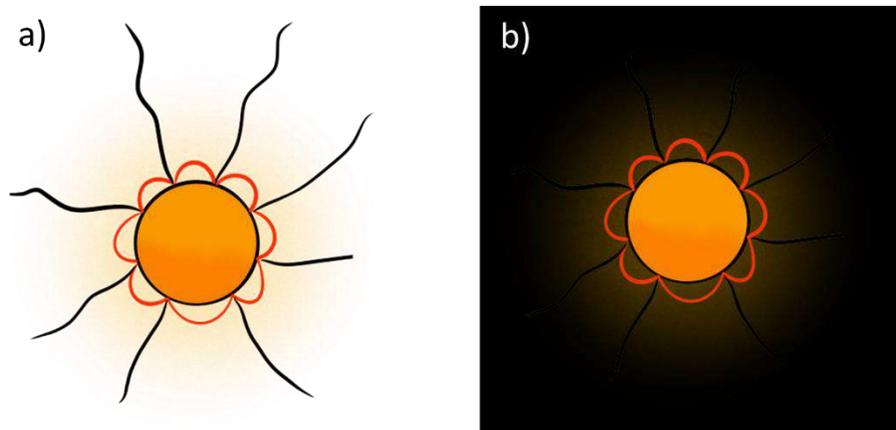


Figura 58. Fluorescencia de los nucleoides tratados con DMF al 50%. a) Estructura propuesta para un nucleoide tratado con DMF 50%. b) Representación esquemática de este nucleoide cuando se observa en microscopía de fluorescencia. Las largas tiras de DNA no se pueden observar debido a que no proporcionan un medio hidrófobo donde el EtBr sea capaz de emitir su fluorescencia.

Como se describió en los resultados, el fondo de las preparaciones tratadas con este solvente fluoresce, y dicha fluorescencia se extingue conforme avanza el tiempo, por lo que a los 30 s de observación ya no es visible. Esto podría ser indicio de la formación de estructuras intramoleculares (p. ej. hairpins) en las largas tiras de DNA proyectándose de la NM, que se generan cuando ocurren apareamientos de bases complementarias dentro de una misma molécula de DNA. Estas interacciones, en principio, proporcionan un medio hidrófobo en el cual el EtBr puede emitir fluorescencia. Sin embargo, la alta concentración de DMF desnatura dichas estructuras (Sınanoğlu y Abdunur, 1964; Ke *et al.*, 2010), disipando la fluorescencia a lo largo de la observación.

Por último, ¿por qué estos nucleoides no forman agregados cuando los observamos bajo el microscopio, pero si al centrifugarse y generar el pellet insoluble? Cuando se centrifugan durante la extracción de proteínas, los nucleoides, ya tratados con DMF, precipitan, mientras que el agua y la DMF se concentran en el sobrenadante. La eliminación de las moléculas de agua y de DMF del medio del pellet favorece la estrecha asociación entre las tiras “pegajosas” de DNA de los nucleoides, generando el pellet insoluble. Por otro lado, cuando se preparan nucleoides para observarse en el microscopio, primero se centrifugan y luego se les adiciona DMF. Este solvente genera los cambios ya descritos en los nucleoides, sin embargo, en ningún momento se eliminan

las moléculas de agua ni de solvente del medio de los nucleoides, por lo que no se favorece su asociación, y como consecuencia, no se forman agregados durante la observación al microscopio.

Recapitulando, el tratamiento con DMF al 50% posiblemente favorece la compactación de las proteínas de la NM, disminuyendo significativamente su tamaño. El cambio conformacional de las proteínas reduce su capacidad de interactuar con el DNA, por lo que este pierde una gran proporción de sus anclajes a la NM, resultando en grandes bucles que pueden ser labilizados fácilmente. Las largas cadenas de DNA resultantes del rompimiento de estos bucles no pueden ser detectadas en microscopía de fluorescencia debido al “quenching” del EtBr, algo análogo a la materia oscura del universo, que se sabe está presente, pero no es visible. Al centrifugarse, se favorece el enredamiento y el apareamiento complementario entre las cadenas de DNA de diferentes nucleoides, generando el precipitado insoluble. El tratamiento con DNAsa I corta las cadenas de DNA desnaturalizado que mantienen agregados a los nucleoides, por lo que permite resuspender el precipitado. El efecto global de la DMF sobre los nucleoides es el más dramático de entre todos los tratamientos, pero a pesar de esto, se conserva cierta estructura de la NM y el halo.

Durante el tratamiento con glicerol al 50% el tamaño del halo se mantiene constante durante la observación. Como se describió anteriormente en el caso del DMSO, esto probablemente se debe a que el glicerol disipa todo el hiperenrollamiento del halo desde el momento en que se agrega. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con el DMSO, desde el inicio de la observación (tiempo 0 s) los halos de estos nucleoides muestran un mayor tamaño en comparación al halo visto en los controles en este mismo tiempo.

En contraste con los solventes polares apróticos, el efecto del glicerol sobre la estructura de las proteínas es independiente de su concentración (Rariy y Klibanov, 1997; Stepankova *et al.*, 2013), por lo que probablemente el cambio estructural sobre las proteínas de NM sea muy similar, se aplique a 10% o a 50%. Por esto se observa un tamaño relativamente similar al obtenido con glicerol al 10%. La diferencia radica en que al 50%, este solvente induce la pérdida de todo el hiperenrollamiento desde el momento en que se adiciona a los nucleoides (fig. 59).

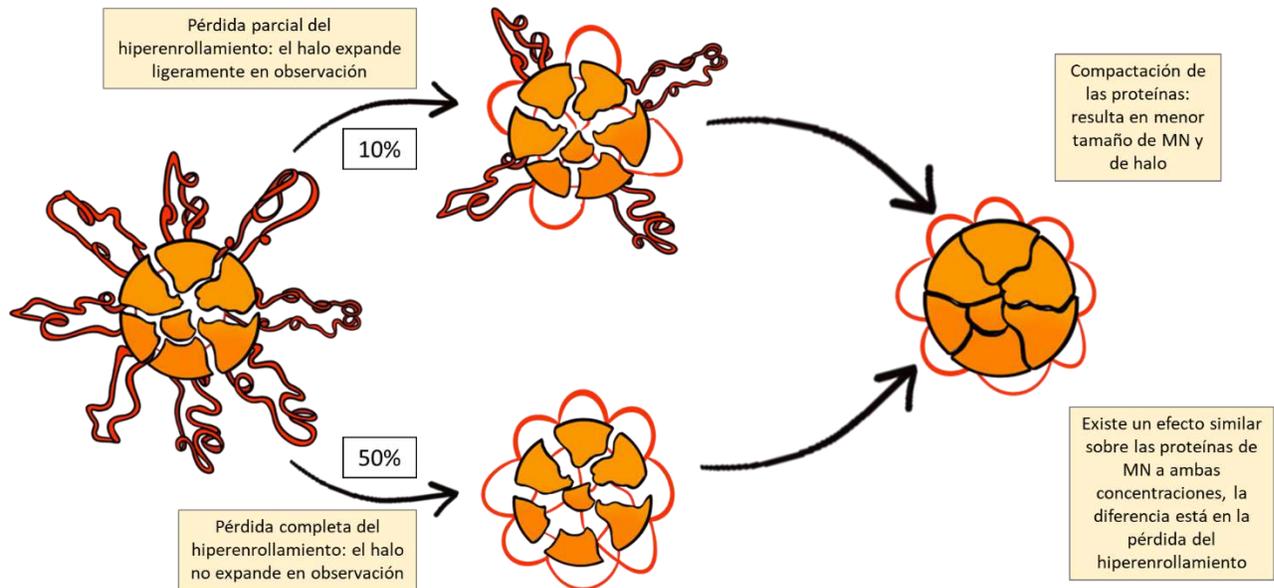


Figura 59. Nucleoides tratados con glicerol al 50%. La compactación de las proteínas de NM es similar a la obtenida con 10% de este solvente, lo que resulta en un tamaño similar. Sin embargo, a 50% el hiperenrollamiento se disipa instantáneamente, por lo que no se observa expansión, a diferencia de lo que ocurre a 10%, donde sólo se disipa parcialmente.

Por último, el tratamiento de los nucleoides con los solventes al 50% durante una hora no muestra diferencias al tratamiento de segundos con esta misma concentración. Esto indica que el solvente induce sus efectos desde el momento en que se agrega, y por lo menos en una escala de una hora, estos efectos se mantienen. Quizás un mayor tiempo de incubación o una mayor concentración de solvente pueda generar otro conjunto de cambios sobre los nucleoides.

Como recapitulación, los tres solventes ensayados, DMSO, DMF y glicerol, generan cambios cualitativos sobre la NHOS. Probablemente estos cambios se deban a los efectos que dichos solventes ejercen sobre la conformación del DNA y de las proteínas. Mediante la alteración de las interacciones entre el DNA con las moléculas de agua de

su entorno, estos solventes inducen la pérdida del hiperenrollamiento. Dichos efectos aumentan con la concentración de solvente. Asimismo, inducen cambios conformacionales en las proteínas mediante mecanismos distintos, aumento relativo de láminas β en el caso de los solventes polares apróticos, e hidratación preferencial en el caso del glicerol. Su aplicación al 50% genera resultados muy distintos entre tratamientos. Estas diferencias individuales posiblemente se deben a la estructura de cada solvente y a sus interacciones con el medio acuoso. De entre los 3 solventes, el que ejerció los efectos más dramáticos sobre la NHOS fue la DMF, sin embargo, en ninguno de los tratamientos existe una pérdida total de esta estructura, lo que sugiere que la perturbación de las proteínas de NM es insuficiente para causar el desensamble del sistema. Estos experimentos también sugieren que los efectos, y posiblemente, la toxicidad de los solventes polares apróticos es dependiente de su dosis, aumentando junto con la concentración de solvente. Las hipótesis descritas en esta discusión se elaboraron con base en el análisis de los resultados obtenidos y la evidencia disponible, sin embargo, futuros experimentos podrían aportar información relevante, y apoyar o modificar lo aquí discutido.

CONCLUSIONES

Los solventes polares apróticos DMSO y DMF, así como el solvente polar clásico glicerol, son capaces de inducir cambios observables en los nucleoides. Dichos cambios consisten en la disminución del tamaño del halo, y en el caso de DMF, también de la NM.

Los cambios observados en los nucleoides son independientes de la viscosidad del solvente, se atribuyen a los cambios que estos ejercen sobre el DNA y las proteínas.

Los efectos de los solventes polares apróticos sobre los nucleoides son dependientes de su concentración.

Con los tratamientos al 10%, el halo de los nucleoides expande, sin embargo, dicha expansión es menor a la de los controles. Esto indica que esta concentración de solvente no es suficiente para disipar por completo el hiperenrollamiento de los bucles de DNA.

Durante el tratamiento con solventes al 50% se observan halos de DNA de menor tamaño que no expanden durante la observación. Esto sugiere que una concentración tan elevada de solvente disipa el hiperenrollamiento de los bucles desde el momento en que se agrega.

A diferencia de los solventes polares apróticos, el efecto del glicerol sobre las proteínas de NM es el mismo a ambas concentraciones. La diferencias observadas entre las distintas concentraciones de glicerol se deben al grado de pérdida del hiperenrollamiento del DNA.

El tratamiento con DMF 50% generó los cambios más notables en los nucleoides de entre los tres solventes. Este resulta en una compactación significativa de las proteínas de NM, lo que disminuye el volumen de la NM y genera nucleoides diminutos.

A pesar de que DMSO y DMF son solventes polares apróticos, los efectos obtenidos al 50% son muy distintos. A esta concentración, el efecto de DMF sobre las proteínas y el DNA es mayor al del DMSO.

La NHOS constituye un sistema interactivo y dinámico, ya que cambios en el tamaño del halo de DNA inducen cambios en el tamaño de la MN y viceversa.

La perturbación de la estructura de las proteínas, en el sentido de estabilizar su estructura interna mediante el aumento de su estructura secundaria, no es suficiente para perder la estructura global de la NHOS.

BIBLIOGRAFÍA

- Alber, F., Dokudovskaya, S., Veenhoff, L. et al. The molecular architecture of the nuclear pore complex. *Nature* 450, 695–701 (2007). <https://doi.org/10.1038/nature06405>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2010) *Biología molecular de la célula*. 5ta ed. Ediciones Omega.
- Alva-Medina, J, Dent, M. A., Aranda-Anzaldo, A. (2010). Aged and post-mitotic cells share a very stable higher-order structure in the cell nucleus in vivo. *Biogerontology*, 11(6), 703-716.
- Alva-Medina, J., Maya-Mendoza, A., Dent, M. A., & Aranda-Anzaldo, A. (2011). Continued stabilization of the nuclear higher-order structure of post-mitotic neurons in vivo. *PLoS One*, 6(6), e21360.
- Amstey, M. S., & Parkman, P. D. (1966). Enhancement of polio-RNA infectivity by dimethylsulfoxide. *Proc Soc Exp Biol Med*, 123(2), 438-442.
- Anigbogu, A. N., Williams, A. C., Barry, B. W., & Edwards, H. G. (1995). Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum. *Int J Pharmaceutics*, 125(2), 265-282.
- Arakawa, T., Kita, Y., & Timasheff, S. N. (2007). Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide. *Biophys Chem*, 131(1-3), 62-70.
- Aranda-Anzaldo, A. (1989). On the role of chromatin higher-order structure and mechanical interactions in the regulation of gene-expression. *Spec Sci Tech*, 12(3), 163-176.
- Aranda-Anzaldo, A. (1992). Early induction of DNA single-stranded breaks in cells infected by herpes simplex virus type 1. *Archives of virology*, 122, 317-330.
- Aranda-Anzaldo, A. (2009). A structural basis for cellular senescence. *Aging*, 1(7), 598.
- Aranda-Anzaldo, A. (2016). The interphase mammalian chromosome as a structural system based on tensegrity. *J Theor Biol*, 393, 51-59.
- Aranda-Anzaldo, A., & Dent, M. A. (1997). Loss of DNA loop supercoiling and organization in cells infected by herpes simplex virus type 1. *Res Virol*, 148(6), 397-408.
- Aranda-Anzaldo, A., & Dent, M. A. (2017). Why cortical neurons cannot divide, and why do they usually die in the attempt? *J Neurosci Res*, 95(4), 921-929.
- Aranda-Anzaldo, A., Dent, M. A., & Martínez-Gómez, A. (2014). The higher-order structure in the cell nucleus as the structural basis of the post-mitotic state. *Prog Biophys Mol Biol*, 114(3), 137-145.

- 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. *Biochim Biophys Acta*, 1446(3), 181-192.
- Ashwood-Smith, M. J. (1961). The radioprotective action of dimethyl sulphoxide and various other sulphoxides. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 3(1), 41-48.
- Ashwood-Smith, M. J. (1975). Current concepts concerning radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. [X radiation]. *Ann NY Acad Sci*, 243.
- Bates, A. D., & Maxwell, A. (2005). *DNA topology*. Oxford University Press, USA.
- Batista, A. N., Batista Jr, J. M., Bolzani, V. S., Furlan, M., & Blanch, E. W. (2013). Selective DMSO-induced conformational changes in proteins from Raman optical activity. *Phys Chem Chem Phys*, 15(46), 20147-20152.
- Bednar, J., Furrer, P., Katritch, V., Stasiak, A., Dubochet, J., & Stasiak, A. (1995). Determination of DNA persistence length by cryo-electron microscopy. Separation of the static and dynamic contributions to the apparent persistence length of DNA. *J Mol Biol*, 254(4), 579-594.
- Belmont, A. S., Hu, Y., Sinclair, P. B., Wu, W., Bian, Q., & Kireev, I. (2011). Insights into interphase large-scale chromatin structure from analysis of engineered chromosome regions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 75, 453–460.
- Berezney, R., & Buchholtz, L. A. (1981). Dynamic association of replicating DNA fragments with the nuclear matrix of regenerating liver. *Exp Cell Res*, 132(1), 1-13.
- Berezney, R. & Coffey D. S. (1974). Identification of a nuclear structural network in rat liver nuclei. *Fed Prec*, 33, 1395.
- Berezney, R., & Coffey, D. S. (1977). Nuclear matrix: isolation and characterization of a framework structure from rat liver nuclei. *J Cell Biol*, 73(3), 616-637.
- Berezney, R., & Wei, X. (1998). The new paradigm: integrating genomic function and nuclear architecture. *J Cell Biochem*, 72(S30–31), 238-242.
- Berrios, M., Osheroff, N., & Fisher, P. A. (1985). In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the Drosophila nuclear matrix fraction. *Proc Nat Acad Sci*, 82(12), 4142-4146.
- Bonvallet, P. A., & Amburgey-Peters, J. C. (2013). Data versus dogma: introducing NMR early in organic chemistry to reinforce key concepts. *NMR Spectroscopy in the Undergraduate Curriculum*, 45-55. Amer Chem Soc.
- Bouliskas, T. (1996). Chromatin domains and prediction of MAR sequences. *Int Rev Cyt*, 162, 279-388.
- Bowater, R. P. (2001). Supercoiled DNA: Structure. *Enc Life Sci*.
- Brayton, C. F. (1986). Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet*, 76(1), 61-90.
- Calladine, C., Drew, H., Luisi, B.F. and Travers, A.A. (2004). *Understanding DNA*. 3rd ed. Elsevier-Academic Press.

- Castillo-Mora, R. C., & Aranda-Anzaldo, A. (2012). Reorganization of the DNA–nuclear matrix interactions in a 210 kb genomic region centered on c-myc after DNA replication in vivo. *J Cell Biochem*, 113(7), 2451-2463.
- Chemmannur, S., & Chattopadhyay, S. (2014, June). Role of nuclear matrix associated region (mar) binding proteins in the regulation of T helper cell differentiation. *Proc Indian Natl Sci Acad*, 80(2), 269.
- Cheng, N. S. (2008). Formula for the viscosity of a glycerol–water mixture. *Ind Eng Chem Res*, 47(9), 3285-3288.
- Cheng, P. N., Pham, J. D., & Nowick, J. S. (2013). The supramolecular chemistry of β -sheets. *J Amer Chem Soc*, 135(15), 5477-5492.
- Chereji, R. V., & Morozov, A. V. (2015). Functional roles of nucleosome stability and dynamics. *Brief Funct Genomics*, 14(1), 50-60.
- Christoph, R., Schmidt, B., Steinberner, U., Dilla, W., & Karinen, R. (2006). Glycerol. *Ullmann's Enc Ind Chem*, 17, 67–82.
- Clayton Jr, J., Barnes, J. R., Hood, D. B., & Schepers, G. W. H. (1963). The inhalation toxicity of dimethylformamide (DMF). *Amer Ind Hygiene Assoc J*, 24(2), 144-154.
- Cockerill, P. N., & Garrard, W. T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell*, 44(2), 273-282.
- Cook, P. R. (1999). The organization of replication and transcription. *Science*, 284(5421), 1790-1795.
- Cook, P. R. (2002). Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity. *Nat Genet*, 32(3), 347-352.
- Cook, P. R., Brazell, I. A., & Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci*, 22(2), 303-324.
- Cozzarelli, N. R., Cost, G. J., Nöllmann, M., Viard, T., & Stray, J. E. (2006). Giant proteins that move DNA: bullies of the genomic playground. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8), 580-588.
- David, N. A. (1972). The pharmacology of dimethyl sulfoxide. *Ann Rev Pharm*, 12(1), 353-374.
- Deal, R. B., Henikoff, J. G., & Henikoff, S. (2010). Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones. *Science*, 328(5982), 1161-1164.
- Dent, M. A., Segura-Anaya, E., Alva-Medina, J., & Aranda-Anzaldo, A. (2010). NeuN/Fox-3 is an intrinsic component of the neuronal nuclear matrix. *FEBS*, 584(13), 2767-2771.
- Dickerson, R. E., & Ng, H. L. (2001). DNA structure from A to B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13), 6986-6988.

- Dickinson, L. A., & Kohwi-Shigematsu, T. (1995). Nucleolin is a matrix attachment region DNA-binding protein that specifically recognizes a region with high base-unpairing potential. *Mol Cell Biol*, 15(1), 456-465.
- Ding, S., & Jiao, N. (2012). N, N-dimethylformamide: A multipurpose building block. *Angewandte Chemie Int Ed*, 51(37), 9226-9237.
- Elfbaum, S. G., & Laden, K. (1968). The effect of dimethyl sulfoxide on percutaneous absorption: a mechanistic study. *J Soc Cosmet Chem*, 19, 119-27.
- Engelke, R., Riede, J., Hegermann, J., Wuerch, A., Eimer, S., Dengjel, J., & Mittler, G. (2014). The quantitative nuclear matrix proteome as a biochemical snapshot of nuclear organization. *J Proteome Res*, 13(9), 3940-3956.
- Ferrai, C., de Castro, I. J., Lavitas, L., Chotalia, M., & Pombo, A. (2010). Gene positioning. *Cold Spring Harbor Perspect Biol*, 2(6), a000588.
- Fey, E. G., & Penman, S. (1988). Nuclear matrix proteins reflect cell type of origin in cultured human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(1), 121-125.
- Frank-Kamenetskii, M. D., & Prakash, S. (2014). Fluctuations in the DNA double helix: A critical review. *Phys Life Rev*, 11(2), 153-170.
- Freshney R.1. (1994) Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. Wiley-Liss, New York. ISBN 0-471-58966-7.
- Fussner, E., Strauss, M., Djuric, U., Li, R., Ahmed, K., Hart, M., & Bazett-Jones, D. P. (2012). Open and closed domains in the mouse genome are configured as 10-nm chromatin fibres. *EMBO J*, 13(11), 992-996.
- Galindo-Murillo, R., & Cheatham III, T. E. (2021). Ethidium bromide interactions with DNA: an exploration of a classic DNA–ligand complex with unbiased molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Res*, 49(7), 3735-3747.
- Galli, C., Guizzardi, S., Passeri, G., Macaluso, G. M., & Scandroglio, R. (2005). Life on the wire: on tensegrity and force balance in cells. *Acta Biomed*, 76(1), 5-12.
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. R., & Cordeiro, M. F. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J*, 28(3), 1317-1330.
- Gan, L., Ladinsky, M. S., & Jensen, G. J. (2013). Chromatin in a marine picoeukaryote is a disordered assemblage of nucleosomes. *Chromosoma*, 122, 377-386.
- García-Vilchis, D., & Aranda-Anzaldo, A. (2017). DNA length modulates the affinity of fragments of genomic DNA for the nuclear matrix in vitro. *J Cell Biochem*, 118(12), 4487-4497.
- Garton, S. D., Hilton, J., Oku, H., Crouse, B. R., Rajagopalan, K. V., & Johnson, M. K. (1997). Active site structures and catalytic mechanism of *Rhodobacter sphaeroides* dimethyl sulfoxide reductase as revealed by resonance Raman spectroscopy. *J Amer Chem Soc*, 119(52), 12906-12916.
- Gekko, K., & Timasheff, S. N. (1981). Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, 20(16), 4667-4676.

- Gekko, K., & Timasheff, S. N. (1981). Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol. *Biochemistry*, 20(16), 4677-4686.
- Gescher, A. (1993). Metabolism of N, N-dimethylformamide: key to the understanding of its toxicity. *Chem Res Toxicology*, 6(3), 245-251.
- Ghoshdastidar, D., & Senapati, S. (2018). Dehydrated DNA in B-form: ionic liquids in rescue. *Nucleic Acids Res*, 46(9), 4344-4353.
- Gögelein, C., Wagner, D., Cardinaux, F., Nägele, G., & Egelhaaf, S. U. (2012). Effect of glycerol and dimethyl sulfoxide on the phase behavior of lysozyme: Theory and experiments. *Journal Chem Phys*, 136(1), 01B603.
- Görög, P., & Kovacs, I. B. (1969). Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on various experimental cutaneous reactions. *Pharmacology*, 2(5), 313-319.
- Haigler, H. J., & Spring, D. D. (1983). Comparison of the analgesic effects of dimethyl sulfoxide and morphine. *Annals NY Acad Sci*.
- Hakes, D. J., & Berezney, R. (1991). DNA binding properties of the nuclear matrix and individual nuclear matrix proteins. Evidence for salt-resistant DNA binding sites. *J Biol Chem*, 266(17), 11131-11140.
- He, D. C., Nickerson, J. A., & Penman, S. (1990). Core filaments of the nuclear matrix. *J Cell Biol*, 110(3), 569-580.
- Hemmerich, P., Schmiedeberg, L., & Diekmann, S. (2011). Dynamic as well as stable protein interactions contribute to genome function and maintenance. *Chromosome Res*, 19, 131-151.
- Heravi, M. M., Ghavidel, M., & Mohammadkhani, L. (2018). Beyond a solvent: triple roles of dimethylformamide in organic chemistry. *RSC Adv*, 8(49), 27832-27862.
- Hormeño, S., Moreno-Herrero, F., Ibarra, B., Carrascosa, J. L., Valpuesta, J. M., & Arias-Gonzalez, J. R. (2011). Condensation prevails over BA transition in the structure of DNA at low humidity. *Biophys J*, 100(8), 2006-2015.
- Hozák, P., Hassan, A. B., Jackson, D. A., & Cook, P. R. (1993). Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton. *Cell*, 73(2), 361-373.
- Huber, M. D., & Gerace, L. (2007). The size-wise nucleus: nuclear volume control in eukaryotes. *J Cell Biol*, 179(4), 583-584.
- Hunter, C. A. (1993). Sequence-dependent DNA structure: the role of base stacking interactions. *J Mol Biol*, 230(3), 1025-1054.
- Ingber, D. E., Wang, N., & Stamenović, D. (2014). Tensegrity, cellular biophysics, and the mechanics of living systems. *Rep Prog Phys*, 77(4), 046603.
- Ivanovic-Matic, S., Dinic, S., Vujosevic, M., & Poznanovic, G. (2000). The protein composition of the hepatocyte nuclear matrix is differentiation-stage specific. *IUBMB*, 49(6), 511-518.
- Jackson, D. A., & Cook, P. R. (1985). Transcription occurs at a nucleoskeleton. *EMBO J*, 4(4), 919-925.

- Jackson, M., & Mantsch, H. H. (1991). Beware of proteins in DMSO. *Biochim Biophys Acta*, 1078(2), 231-235.
- Jacob, S. W., & Herschler, R. (1986). Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*, 23(1), 14-27.
- Józwiak, M., Tyczyńska, M., & Bald, A. (2013). Viscosity of Urea in the Mixture of N, N-Dimethylformamide and Water. *J Chem Eng Data*, 58(2), 217-224.
- Ke, F., Luu, Y. K., Hadjiargyrou, M., & Liang, D. (2010). Characterizing DNA condensation and conformational changes in organic solvents. *PLoS One*, 5(10).
- Kim, T. H., & Kim, S. G. (2011). Clinical outcomes of occupational exposure to n, n-dimethylformamide: perspectives from experimental toxicology. *Saf Health Work*, 2(2), 97-104.
- Knubovets, T., Osterhout, J. J., & Klibanov, A. M. (1999). Structure of lysozyme dissolved in neat organic solvents as assessed by NMR and CD spectroscopies. *Biotech Bioeng*, 63(2), 242-248.
- Koudelka, G. B., Mauro, S. A., & Ciubotaru, M. (2006). Indirect Readout of DNA Sequence by Proteins: The Roles of DNA Sequence-Dependent Intrinsic and Extrinsic Forces. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 81, 143-177.
- Lee, C. H., Mizusawa, H., & Kakefuda, T. (1981). Unwinding of double-stranded DNA helix by dehydration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(5), 2838-2842.
- Lindsley, Janet E. (2005). DNA Topology: Supercoiling and Linking. John Wiley and Sons Ltd, Chichester.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A. & Scott, M. (2016). *Biología Celular y Molecular*. 7ma ed. Médica Panamericana.
- López-García, P., & Forterre, P. (1997). DNA topology in hyperthermophilic archaea: reference states and their variation with growth phase, growth temperature, and temperature stresses. *Mol Microbiol*, 23(6), 1267-1279.
- Lovelock, J. E., & Bishop, M. W. H. (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183(4672), 1394-1395.
- Luderus, M. E., Van Steensel, B., Chong, L., Sibon, O. C., Cremers, F. F., & De Lange, T. (1996). Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J Cell Biol*, 135(4), 867-881.
- Lusser, A., & Kadonaga, J. T. (2004). Strategies for the reconstitution of chromatin. *Nat Meth*, 1(1), 19-26.
- Magsumov, T., Ziyang, L., & Sedov, I. (2020). Comparative study of the protein denaturing ability of different organic cosolvents. *Int J Biol Macromolecules*, 160, 880-888.
- Maniotis, A. J., Bojanowski, K., & Ingber, D. E. (1997). Mechanical continuity and reversible chromosome disassembly within intact genomes removed from living cells. *J Cell Biochem*, 65(1), 114-130.

- 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(1), 79-88.
- 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(2), 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(21), 6168-6179.
- Maya-Mendoza, A., Hernández-Muñoz, R., Gariglio, P., & Aranda-Anzaldo, A. (2005). Natural ageing in the rat liver correlates with progressive stabilization of DNA–nuclear matrix interactions and withdrawal of genes from the nuclear substructure. *Mech Ageing Dev*, 126(6-7), 767-782.
- Mazumder, A., Roopa, T., Basu, A., Mahadevan, L., & Shivashankar, G. V. (2008). Dynamics of chromatin decondensation reveals the structural integrity of a mechanically prestressed nucleus. *Biophys J*, 95(6), 3028-3035.
- McGhee, J. D., Rau, D. C., Charney, E., & Felsenfeld, G. (1980). Orientation of the nucleosome within the higher order structure of chromatin. *Cell*, 22(1), 87-96.
- Melchior, D., Packer, C. S., Johnson, T. C., & Kaefer, M. (2003). Dimethyl sulfoxide: does it change the functional properties of the bladder wall?. *J Urol*, 170(1), 253-258.
- Mirkin, Sergei M. (2001) *DNA topology: fundamentals*. John Wiley and Sons Ltd, Chichester.
- Minchin, S., & Lodge, J. (2019). Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays Biochem*, 63(4), 433-456.
- Mirkovitch, J., Mirault, M. E., & Laemmli, U. K. (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*, 39(1), 223-232.
- Morrison, L. R. (2000). Glycerol. *Kirk-Othmer Enc Chem Tech*.
- Mortillaro, M. J., Blencowe, B. J., Wei, X., Nakayasu, H., Du, L., Warren, S. L., & Berezney, R. (1996). A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(16), 8253-8257.
- Muzart, J. (2009). N, N-Dimethylformamide: much more than a solvent. *Tetrahedron*, 65(40), 8313-8323.
- Nickerson, J. (2001). Experimental observations of a nuclear matrix. *J Cell Sci*, 114(3), 463-474.
- Nikolova, E. N., Zhou, H., Gottardo, F. L., Alvey, H. S., Kimsey, I. J., & Al-Hashimi, H. M. (2013). A historical account of Hoogsteen base-pairs in duplex DNA. *Biopolymers*, 99(12), 955-968.

- Olmsted III, J., & Kearns, D. R. (1977). Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids. *Biochemistry*, 16(16), 3647-3654.
- Ottaviani, D., Lever, E., Takousis, P., & Sheer, D. (2008). Anchoring the genome. *Genome Biol*, 9(1), 1-6.
- Paunescu, D., Fuhrer, R., & Grass, R. N. (2013). Protection and Deprotection of DNA—high-temperature stability of nucleic acid barcodes for polymer labeling. *Angewandte Chemie Int Ed*, 15(52), 4269-4272.
- Peppenella, S., Murphy, K. J., & Hayes, J. J. (2014). Intra-and inter-nucleosome interactions of the core histone tail domains in higher-order chromatin structure. *Chromosoma*, 123, 3-13.
- Peters, J. P., & Maher, L. J. (2010). DNA curvature and flexibility in vitro and in vivo. *Q Rev Biophys*, 43(1), 23-63.
- Pfaffle, P., & Jackson, V. (1990). Studies on rates of nucleosome formation with DNA under stress. *J Biol Chem*, 265(28), 16821-16829.
- 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*, 1, 123-135.
- Rao, A. N., & Grainger, D. W. (2014). Biophysical properties of nucleic acids at surfaces relevant to microarray performance. *Biomaterials Sci*, 2(4), 436-471.
- Rariy, R. V., & Klibanov, A. M. (1997). Correct protein folding in glycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25), 13520-13523.
- 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(1), 59-70.
- Razin, S. V., & Gavrillov, A. A. (2014). Chromatin without the 30-nm fiber: constrained disorder instead of hierarchical folding. *Epigenetics*, 9(5), 653-657.
- Razin, S. V., Gromova, I. I., & Iarovaia, O. V. (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.
- Rivera Mulia, Juan Carlos. (2010). "Caracterización de los bucles estructurales del DNA del locus multigénico de la familia albúmina en la rata y establecimiento de una correlación física y funcional entre los bucles y las unidades de replicación in vivo". (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/91610>
- 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(1), 23-35.
- Rivera-Mulia, J. C., Hernández-Muñoz, R., Martínez, F., & Aranda-Anzaldo, A. (2011). DNA moves sequentially towards the nuclear matrix during DNA replication in vivo. *BMC Cell Biol*, 12(1), 1-16.

- Robergs, R. A., & Griffin, S. E. (1998). Glycerol: biochemistry, pharmacokinetics and clinical and practical applications. *Sports Med*, 26, 145-167.
- Roti, J. R., & Wright, W. D. (1987). Visualization of DNA loops in nucleoids from HeLa cells: assays for DNA damage and repair. *Cytometry*, 8(5), 461-467.
- Roy, T., Szuttor, K., Smiatek, J., Holm, C., & Hardt, S. (2019). Conformation and dynamics of long-chain end-tethered polymers in microchannels. *Polymers*, 11(3), 488.
- Sams Jr, W. M. (1967). The effects of dimethyl sulfoxide on nerve conduction. *Ann N Y Acad Sci*, 141(1), 242-247.
- Scailteur, V., & Lauwerys, R. R. (1987). Dimethylformamide (DMF) hepatotoxicity. *Toxicology*, 43(3), 231-238.
- Schichman, S. A., & Amey, R. L. (1971). Viscosity and local liquid structure in dimethyl sulfoxide-water mixtures. *J Phys Chem*, 75(1), 98-102.
- Schwartzman, J. B., & Stasiak, A. (2004). A topological view of the replicon. *EMBO J*, 5(3), 256-261.
- Senoh, H., Aiso, S., Arito, H., Nishizawa, T., Nagano, K., Yamamoto, S., & Matsushima, T. (2004). Carcinogenicity and chronic toxicity after inhalation exposure of rats and mice to N, N-Dimethylformamide. *J Occup Health*, 46(6), 429-439.
- Sínanoğlu, O., & Abdulnur, S. (1964). Hydrophobic stacking of bases and the solvent denaturation of DNA. *Photochem Photobiol*, 3(4), 333-342.
- Smith, C.A., Wood, E.J., 1992. Cell Biology. Chapman and Hall, London, p. 81.
- Stepankova, V., Damborsky, J., & Chaloupkova, R. (2013). Organic co-solvents affect activity, stability and enantioselectivity of haloalkane dehalogenases. *Biotech J*, 8(6), 719-729.
- Sterling, H. J., Prell, J. S., Cassou, C. A., & Williams, E. R. (2011). Protein conformation and supercharging with DMSO from aqueous solution. *J Am Soc Mass Spectrom*, 22(7).
- Stroylova, Y. Y., Kiselev, G. G., Schmalhausen, E. V., & Muronetz, V. I. (2014). Prions and chaperones: Friends or foes?. *Biochemistry*, 79, 761-775.
- Stuurman, N., Meijne, A. M., van der Pol, A. J., de Jong, L., van Driel, R., & Van Renswoude, J. (1990). The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins. *J Biol Chem*, 265(10), 5460-5465.
- Sun, M., Kawamura, R., & Marko, J. F. (2011). Micromechanics of human mitotic chromosomes. *Phys Biol*, 8(1), 015003.
- Tanaka, K. I. (1971). Toxicity of dimethylformamide (DMF) to the young female rat. *Int Arch Arbeitsmed*, 28(2), 95-105.
- Tjernberg, A., Markova, N., Griffiths, W. J., & Hallén, D. (2006). DMSO-related effects in protein characterization. *J Biomol Screen*, 11(2), 131–137.

- Torrent, J., Alvarez-Martinez, M. T., Liautard, J. P., & Lange, R. (2006). Modulation of prion protein structure by pressure and temperature. *Biochim Biophys Acta*, 1764(3), 546-551.
- Toyama, B. H., & Weissman, J. S. (2011). Amyloid structure: conformational diversity and consequences. *Ann Rev Biochem*, 80, 557-585.
- Travers, A. A. (2004). The structural basis of DNA flexibility. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.*, 362(1820), 1423-1438.
- Travers, A., & Muskhelishvili, G. (2015). DNA structure and function. *FEBS*, 282(12), 2279-2295.
- Trevilla-García, C., & Aranda-Anzaldo, A. (2011). Cell-type-specific organization of nuclear DNA into structural looped domains. *J Cell Biochem*, 112(2), 531-540.
- Trevilla-García, C., & Aranda-Anzaldo, A. (2012). The organization of a large transcriptional unit (Fyn) into structural DNA loops is cell-type specific and independent of transcription. *Gene*, 493(1), 1-8.
- Tsutsui, K. M., Sano, K., & Tsutsui, K. (2005). Dynamic view of the nuclear matrix. *Acta Med Okayama*, 59(4), 113-120.
- Tunçer, S., Gurbanov, R., Sheraj, I., Solel, E., Esenturk, O., & Banerjee, S. (2018). Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Sci Rep*, 8(1), 1-15.
- Vagenende, V., Yap, M. G., & Trout, B. L. (2009). Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. *Biochemistry*, 48(46), 11084-11096.
- Van Rijswijk, M., & Griffin, J. P. (1981). Dimethylsulphoxide. *Lancet*, 317(8210), 41.
- Verheijen, R., Kuijpers, H., Vooijs, P., van Venrooij, W., & Ramaekers, F. (1986). Protein composition of nuclear matrix preparations from HeLa cells: an immunochemical approach. *J Cell Sci*, 80(1), 103-122.
- Villeponteau, B. (1997). The heterochromatin loss model of aging. *Exp Gerontol*, 32(4-5), 383-394.
- Volk, A., & Kähler, C. J. (2018). Density model for aqueous glycerol solutions. *Exp Fluids*, 59(5), 75.
- Volokh, K. Y., & Vilnay, O. (1997). "Natural", "kinematic" and "elastic" displacements of underconstrained structures. *Int J Solids Structures*, 34(8), 911-930.
- Wang, N., Tytell, J. D., & Ingber, D. E. (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(1), 75-82.
- 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(5382), 1502-1505.

- Weissmann, G., Sessa, G., & Bevans, V. (1967). Effect of DMSO on the stabilization of lysosomes by cortisone and chloroquine in vitro. *Ann N Y Acad Sci*, 141(1), 326-332.
- Woodcock, C. L., Frado, L. L., & Rattner, J. B. (1984). The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J Cell Biol*, 99(1), 42-52.
- Woodcock, C. L., & Ghosh, R. P. (2010). Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a000596.
- Yamasaki, S., Terada, T., Kono, H., Shimizu, K., & Sarai, A. (2012). A new method for evaluating the specificity of indirect readout in protein–DNA recognition. *Nucleic acids Res*, 40(17), e129-e129.
- Yang, X., Jiang, L., Jia, Y., Hu, Y., Xu, Q., Xu, X., & Huang, H. (2016). Counteraction of trehalose on N, N-dimethylformamide-induced *Candida rugosa* lipase denaturation: Spectroscopic insight and molecular dynamic simulation. *PLoS One*, 11(3), e0152275.
- Yuan, Y., Yang, Y., Tian, Y., Park, J., Dai, A., Roberts, R. M., & Han, X. (2016). Efficient long-term cryopreservation of pluripotent stem cells at –80 C. *Sci Rep*, 6(1), 1-13.
- 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 U S A*, 101(22), 8337-8341.