



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la desregulación epigenética en la enfermedad de Alzheimer en un modelo murino

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

LIBB. Carla Elizabeth Cadena del Castillo

Dr. Félix RecillasTarga
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Federico Bermúdez Rattoni.
Instituto de Fisiología Celular

Dra. Clorinda Arias Álvarez.
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MÉXICO, D. F. Diciembre de 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos académicos

El presente trabajo fue elaborado en el Instituto de Fisiología Celular (IFC) en los laboratorios de los doctores Félix Recillas Targa y Federico Bermúdez Rattoni, con los apoyos DGAPA-UNAM (IN209403 y IN203811) y CONACYT (42653-Q y 128464) para el Dr. Félix Recillas y DGAPA-UNAM (IN209413) y CONACyT (155242) para el Dr. Federico Bermúdez Rattoni. Gracias a ambos por creer en este proyecto y por todas sus enseñanzas.

Los estudios de maestría de la LIBB. Carla Elizabeth Cadena del Castillo se realizaron con el apoyo de la beca de maestría del CONACyT.

Se agradece y reconoce al comité tutor que asesoró esta tesis, el cual estuvo constituido por:

Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular
Dr. Federico Bermúdez Rattoni	Instituto de Fisiología Celular
Dra. Clorinda Arias Álvarez	Instituto de Investigaciones Biomédicas

Se agradece el apoyo de la Dra. Lourdes Massieu y la ayuda técnica de la Biol. Georgina Guerrero Avendaño, el Dr. Fernando Suaste Olmos y la Biol. Teresa Montiel Montes. Así mismo se reconoce el trabajo de los laboratoristas Gianelli Cortés González y Oreste Carbajal.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la unidad de microscopía del IFC y se reconoce el servicio y apoyo prestado por el Biol. Gabriel Orozco Hoyuela.

Adicionalmente se reconoce la asesoría académica del Biol. Christian Valdés Quezada, el LCG. Rodrigo Arzate-Mejía y el M. en C. Daniel Osorio Gómez.

Finalmente se agradece a los miembros del Jurado que revisaron y enriquecieron con sus observaciones este trabajo

Dra. Victoria Chagoya Hazas
Dra. Lourdes Massieu Trigo
Dra. Leonor Pérez Martínez
Dra. María Imelda López Villaseñor
Dra. Gohar Gevorgyan Markosian

A la UNAM, por 10 años de enseñanzas.

“La nostalgia, como siempre, había borrado los malos recuerdos y magnificado los buenos. Nadie se salvaba de sus estragos”. G.G.M.

*A mi mamá,
a mi abuelita Rosy
y
a Carlos*

Agradecimientos personales

A mi mamá y abuelita Rosy por todo su amor y apoyo, por respaldarme siempre y estar presentes cada momento de mi vida.

A Carlos gracias por acompañarme y apoyarme cada día de esta etapa, gracias por compartir tantos sueños y por hacerme creer que todo es posible.

A mi familia, mi papá, mis abuelos, mis tíos y primos, sobre todo a mis tíos Aurorita, Peter, Rita y Gilda por estar siempre al pendiente de mí y darme ánimo y tanto cariño.

A mis amigos Martín, Silvia y Gaby que han estado presentes por tantos años.

A Geito, gracias por todo tu apoyo y volverte parte de la vida de cada uno de los integrantes del laboratorio.

A mis compañeros e integrantes de los laboratorios 122N y BL-201, especialmente a Christian, Daniel, Paco, Kioko y Rodrigo por su apoyo, a Mariana, Estela y Yael porque llenan de alegría el lab y a Cristian, Edgar, Erandi, Fernando Suaste, Fernando, Jesús, Josué, Martín, Mónica, Rosario, Giane, Oreste y todos los que han sido parte de estos dos grandes grupos ¡gracias!

A las chicas de la pista y a los muchachos del gym, en especial a Alicia, gracias por llenarme cada día de energía y muchas risas.

A Tita

Abreviaturas.....	6
Resumen.....	7
1. Introducción.....	8
1. 1. Enfermedad de Alzheimer	8
1. 1. 2. Descripción clínica	8
1. 1. 3. Patofisiología de la enfermedad de Alzheimer	9
1. 1. 3. 1. Cascada Amiloide.....	10
1. 1. 3. 2. La Proteína Precursora de la β -Amiloide y el péptido β -Amiloide en condiciones no patológicas	12
1. 1. 4. Alteraciones genéticas en la enfermedad de Alzheimer	12
1. 1. 5. Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer	13
1. 1. 6. Estudio de la patofisiología de la enfermedad de Alzheimer	14
1. 1. 7. El modelo murino transgénico 3xTg-AD	15
1. 1. 8. Factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer ..	17
1. 1. 8. 1. Efecto del envejecimiento sobre la regulación epigenética.....	18
1. 3. Cromatina y regulación epigenética.....	18
1. 3. 1. Regulación mediada por modificaciones post-traduccionales y variantes de histonas.....	20
1. 3. 2. Metilación del DNA	21
1. 3. 2. 1. Regulación de la metilación del DNA	21
1. 3. 2. 1. 1. 5 hidroximetilcitosina y otras modificaciones de la 5 metilcitosina	23
2. Antecedentes	26
2. 1. Regulación epigenética en el Sistema Nervioso.....	26
2. 2. Regulación epigenética y enfermedad de Alzheimer	28
2. 2. 1. Metilación del DNA y la enfermedad de Alzheimer.....	31
3. Planteamiento del Problema	35
4. Hipótesis	35
5. Objetivo	35
5. 1 Objetivos particulares	36
6. Estrategia experimental.....	37
7. Metodología	38
7. 1. Ratones silvestres y ratones transgénicos 3xTg-AD	38
7. 1. 1. Genotipificación	38

7. 2. Preparación de muestras de cerebro de ratón para inmunofluorescencia .	40
7. 3. Inmunofluorescencias	40
7. 3. 1. Análisis de Imágenes	41
7. 4. Extracción de DNA genómico	42
7. 7. Modificación de DNA por bisulfito de sodio del DNA genómico	42
7. 7. 1. PCR y clonación en plásmido.....	43
8. Resultados y discusión	44
8. 1. Localización celular de la 5hmC en la corteza cerebral de ratón.....	44
8. 2. Cantidad relativa y la distribución global de las modificaciones 5mC y 5hmC en la corteza cerebral de ratón	48
8. 2. 1. Efecto del envejecimiento en el nivel global de la 5mC.....	48
8. 2. 2. Efecto del envejecimiento en el nivel global de la 5hmC.....	50
8. 2. 3. Efecto de los transgenes del ratón 3xTg-AD en el nivel global de la 5mC y 5hmC.....	52
8. 3. Relación entre la IR a βA y a la 5hmC	55
8. 4 Estado de metilación e hidroximetilación de los genes <i>Arc</i> y <i>APP</i> en el modelo 3xTg-AD.....	57
8. 4. 1 Estado de metilación del promotor del gen <i>Arc</i>	57
8. 4. 2 Estado de metilación del promotor del gen <i>APP</i>	59
9. Conclusiones	61
10. Perspectivas	61
Apéndice 1	63
Controles experimentales	63
Apéndice 2.	64
Comunicación corta.....	64
Bibliografía.....	88

Abreviaturas

β A	β -Amiloide
APP	Proteína Precursora de β -Amiloide
CBP	Proteína de unión a CREB
CTF	Fragmento carboxilo terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metil-transferasa
EA	Enfermedad de Alzheimer
EOAD	Enfermedad de Alzheimer de aparición temprana
FAD	Enfermedad de Alzheimer familiar
HAT	Acetil transferasa de histonas
HDAC	Desacetilasa de histonas
IR	Inmunorreactividad
LOAD	Enfermedad de Alzheimer de aparición tardía
LTP	Potenciación a largo plazo
NFT	Marañas Neurofibrilares
pb	Pares de bases
PS1	Presenilina 1
TET	Proteína "Ten-Eleven Translocation".
5mC	5 metilcitosina
5hmC	5 hidroximetilcitosina

Resumen

Uno de los principales factores ligados a la Enfermedad de Alzheimer (EA) es el envejecimiento, mismo que genera cambios a nivel de la expresión genética en el cerebro humano (Berchtold, et al. 2008). Algunos estudios señalan que en la AD las modificaciones epigenéticas pueden estar alteradas, ya sea como una causa de la enfermedad o como parte de las alteraciones que se dan durante el desarrollo de la patología. En la AD la hipometilación del DNA o desmetilación de DNA, ha sido observada, *in vitro* e *in vivo* (Chen K-L, et al. 2009; Mastroeni, et al. 2009; Mastroeni, et al. 2010). En este trabajo se estudiaron la 5mC y la 5hmC en la corteza cerebral de un modelo murino de esta enfermedad. Los resultados de este trabajo muestran que los niveles de la 5mC disminuyen tanto con la edad como con el envejecimiento, por el contrario los niveles de la 5hmC incrementan en el modelo transgénico y dicho aumento es mayor en el envejecimiento. El presente estudio sugiere que las alteraciones epigenéticas del tipo de metilación e hidroximetilación del DNA son parte de las alteraciones que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad y proponemos que éstas podrían influir anormalmente en la función del cerebro.

Estudio de la desregulación epigenética en la enfermedad de Alzheimer en un modelo murino

1. Introducción

Las enfermedades del sistema nervioso central y periférico son conocidas como trastornos neurológicos, dos ejemplos de este tipo de enfermedad son la epilepsia y las demencias. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el mundo hay mil millones de personas que padecen trastornos neurológicos, de los cuales 50 millones sufren epilepsia, y 24 millones padecen demencias, siendo la enfermedad de Alzheimer (EA) la demencia que se presenta con mayor frecuencia (OMS, 2007).

Las demencias son enfermedades crónico-degenerativas que afectan la memoria, el comportamiento y el estado emocional, en fases avanzadas son totalmente incapacitantes. Se ha observado que las demencias son enfermedades que aumentan su incidencia en personas de edad avanzada, por lo que se espera que estas enfermedades aumenten conforme aumenta la edad promedio de la población mundial (Goedert y Spillantini, 2006). En México se estima que para el año 2050 la población de adultos mayores de 65 años de edad aumentará del 5.2% reportado en 2005 a un 21.2%, por lo que la cantidad de personas con demencia podría aumentar dramáticamente (Partida, 2006).

1. 1. Enfermedad de Alzheimer

1. 1. 2. Descripción clínica

La patología de la EA inicia varios años antes de presentarse las primeras manifestaciones clínicas; al inicio de éstas el único síntoma que se presenta es el deterioro cognitivo leve, sin embargo, este impedimento cognitivo no siempre resulta en una demencia como la EA, por lo que no es un buen indicativo de ésta (McKhann, et al. 1984). La progresión de la EA es lenta, primero se presentan olvidos de eventos o actividades recientes, el nombre de familiares y objetos. También se caracteriza por problemas para consolidar la memoria relacionada con

sucesos autobiográficos (memoria episódica) lo que se ha correlacionado con fallas en el procesamiento dependiente del hipocampo (Haass y Selkoe, 2007). En esta primera etapa los afectados también tienen problemas resolviendo operaciones matemáticas. En la segunda etapa de la enfermedad los pacientes olvidan como hacer tareas simples como peinarse o lavarse los dientes, adicionalmente tienen problemas para establecer una conversación, leer y escribir. En la etapa más avanzada aquellos que padecen la enfermedad tienden a ser agresivos o ansiosos para finalmente estar totalmente incapacitados y depender de familiares o cuidadores. En estas últimas etapas la EA evoluciona en pérdida neuronal, pero hay que remarcar que la pérdida neuronal ocurre hasta etapas avanzadas, por lo que no es un factor que esté fuertemente relacionado con el deterioro cognitivo de las etapas iniciales (Selkoe, 2002).

1. 1. 3. Patofisiología de la enfermedad de Alzheimer

Histológicamente la EA se caracteriza por la presencia de marañas neurofibrilares (NFT, por sus siglas en inglés) compuestas por la proteína Tau hiperfosforilada y de placas seniles formadas por el péptido β -Amiloide (β A), que se localizan en el hipocampo y en la región medio-temporal (Querfurth y LaFerla, 2010). Tau es una proteína que en condiciones no patológicas se asocia a los microtúbulos, promueve su estabilización, y permite la apropiada morfología neuronal y el sostenimiento de la maquinaria de transporte axonal. La unión de Tau a los microtúbulos se pierde una vez que ésta es fosforilada y es la forma hiperfosforilada la que se encuentra en las NFT (Götz, et al. 2006). En algunas patologías la hiperfosforilación de Tau es consecuencia de mutaciones en esta proteína, sin embargo, en la EA no se han identificado estas mutaciones. Algunas de las consecuencias de la formación de las NFT son fallas en el transporte axonal, lo que conlleva a problemas en la neurotransmisión y por lo tanto degeneración sináptica. Las NFT también causan el desplazamiento de organelos, la inhibición de la actividad del proteosoma y fallas en el tráfico mitocondrial (Götz, et al. 2006). Actualmente existen varias hipótesis del inicio de la EA, algunas de estas basadas en la proteína tau, la neuroinflamación, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo, sin embargo, una de las teorías más

aceptadas que explica el inicio de la patología tiene que ver con la formación de las placas de β A y se le conoce como la “cascada amiloide”.

1. 1. 3. 1. Cascada Amiloide

Una hipótesis sobre la etiología de la EA es la de la cascada amiloide, la cual postula que alteraciones en la proteína precursora de β -amilode (APP) o proteínas que la procesan y regulan se encuentran alteradas generando la formación y acumulación del péptido β A el cual es el responsable de la oligomerización y formación de las placas seniles.

El β A es un producto del procesamiento de APP, que resulta cuando ésta es procesada por el complejo protéico formado por las secretasas. Inicialmente APP es cortada por la β -secretasa (BACE) y posteriormente por la γ -secretasa. El primer producto de corte genera un fragmento peptídico de 99 aminoácidos denominado APP-C99, el segundo corte da lugar al dominio intracelular de APP (AICD) y al β A que es un péptido de 4 kDa (Figura. 1; Kamenetz et. al. 2003).

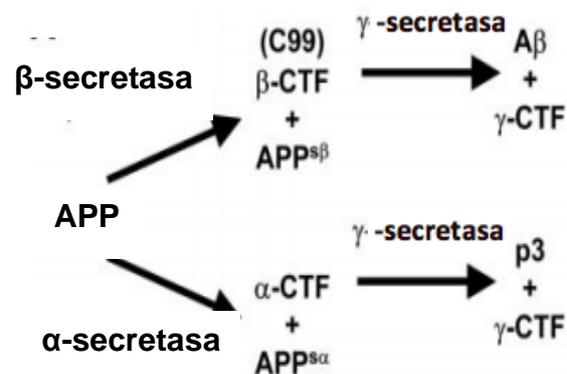


Fig. 1. Procesamiento de APP. APP puede ser procesada por la γ -secretasa y la α o β secretasas y, cuando el corte se genera mediante la β y γ secretasa se da lugar a un fragmento carboxilo terminal (CTF) y al β A, a esta vía de procesamiento se le conoce como vía amiloidogénica. Cuando el corte es por las secretasas α y γ los productos son un fragmento de APP soluble, un CTF y otro péptido denominado P3, esta vía es conocida como no amiloidogénica (modificado de Kamenetz, et al. 2003).

La γ -secretasa, es un complejo compuesto por presenilina 1 (PS1), “presenilin enhancer 2” (PEN-2), nicastrina y APH 1. PS1 contiene el sitio catalítico, PEN-2

estabiliza a la presenilina y la nicastrina es la proteína receptora del sustrato. Los cortes que forman al β A pueden generar dos péptidos de β A, uno de 40 y otro de 42 aminoácidos. En condiciones normales el β A40 es el más abundante, mientras que en la EA el β A42 es más frecuente en algunos casos esto puede ser generado por mutaciones ya sea en APP o alguna presenilina que la procesan (Hardy 1997). Sin embargo, este mecanismo de corte no es el único que ocurre, también es posible que APP se procese en una vía no amiloidogénica por la acción de la α -secretasa (Figura. 1; Kamenetz et. al. 2003).

Diversos estudios demuestran que existe una pobre correlación entre la formación de placas amiloides y el deterioro cognitivo, mientras que la presencia de los oligómeros solubles de β A y la pérdida de sinapsis funcionales correlacionan claramente con el deterioro cognitivo (Walsh, et al. 2002). Dentro de estos oligómeros los formados por el β A42, son los principales responsables de la disfunción sináptica. La producción de éstos es dependiente de la activación de receptores a glutamato del tipo NMDA y es afectada por la actividad neuronal mediante el control del anclaje de la β -secretasa (Kamenetz, et al. 2003). En dos estudios diferentes se ha descrito que inhibidores de la γ -secretasa inhiben la producción del péptido β A42 lo que impacta la formación de oligómeros y revirtiendo el efecto de estos sobre la plasticidad sináptica (Walsh, et al. 2002; Kamenetz, et al. 2003). Por otra parte, uno de los mecanismos propuestos mediante el cual el β A es neurotóxico intracelularmente es porque inhibe el sistema de ubiquitin-proteosoma y disminuye la actividad enzimática en la mitocondria (Zhang, et al. 2011).

Cuando el β A es producida o inyectada en concentraciones picomolares se obtiene un mejoramiento en la memoria, por lo cual se postula que su concentración relativa es la principal diferencia entre el β A en condiciones patológicas y en la fisiología habitual de las células, es de esta forma y mediante el procesamiento de APP en una vía no amiloidogénica como se ha ligado al β A a condiciones no patológicas (Puzzo, et al. 2008).

1. 1. 3. 2. La Proteína Precursora de la β -Amiloide y el péptido β -Amiloide en condiciones no patológicas

Como ya se mencionó APP también es procesada por una vía no amiloidogénica. Cuando APP es digerida por la α -secretasa se da lugar a un péptido de 83 aminoácidos (APP-C83), del cual se parte para el segundo corte por parte de la γ -secretasa, de éste resulta a un fragmento de APP soluble (APPs), un fragmento carboxilo terminal (CTF) y el péptido P3 (Figura. 1; Kamenetz et. al. 2003). Mediante esta vía de procesamiento de APP es que se propone APP tiene funciones neuroprotectoras. Un ejemplo del papel neuroprotector de esta proteína se encontró en la respuesta al daño cerebral traumático, ya que la proteína APP aumenta al inducirse éste y si APP está ausente hay mayor muerte neuronal post-trauma (Corrigan, et al 2012).

1. 1. 4. Alteraciones genéticas en la enfermedad de Alzheimer

Dentro de la patología de Alzheimer se han descrito dos variantes de la enfermedad, pero solo una de ellas correlaciona con mutaciones. Los dos grandes grupos en que se divide la EA son el de tipo familiar (FAD, por sus siglas en inglés) y el esporádico (Figura. 2). El FAD se caracteriza por ser de aparición temprana (EOAD, por sus siglas en inglés) y suele ser debido a mutaciones en diversos genes como *APP* y *PS1*; el FAD solo se presenta en un porcentaje inferior al 5% de los casos de la AD. Por su parte la EA del tipo esporádico inicia a una edad mucho más avanzada que el FAD, es conocido como la EA de aparición tardía (LOAD, por sus siglas en inglés). El LOAD aparece en personas mayores de 65 años de edad, y corresponde al escenario más frecuente en la AD y no presenta mutaciones en genes asociados al procesamiento de APP o a la eliminación del β A como APOE. Por lo anterior y a diferencia de otras patologías la EA más común, que es la EA esporádica, no tiene correlación con defectos de tipo genético, es decir, mutaciones, sin embargo, se han descrito algunas variantes genéticas que generan predisposición al desarrollo de esta enfermedad.

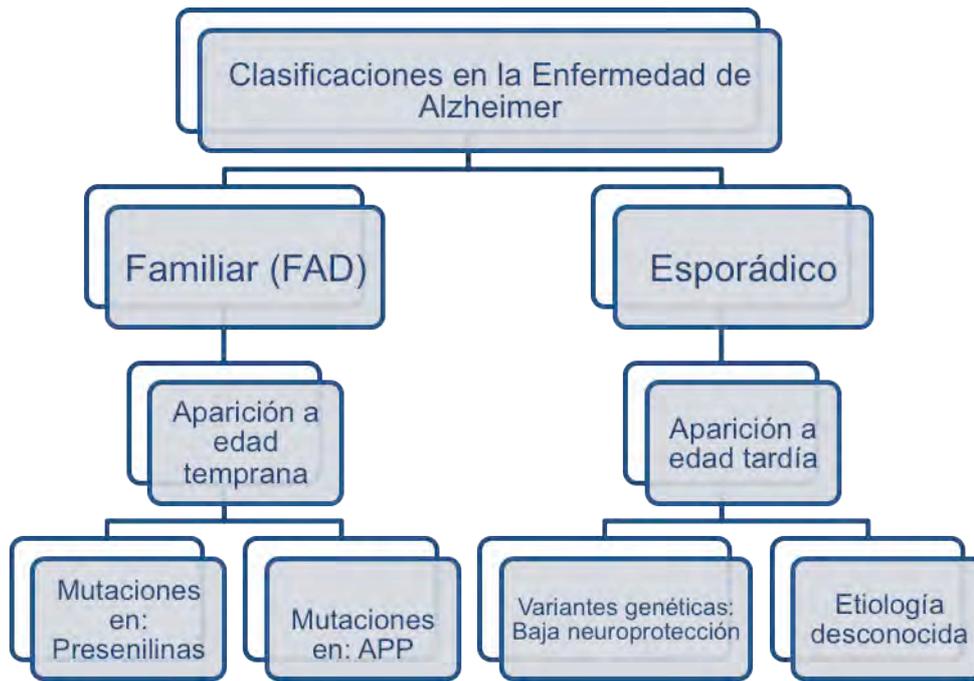


Fig. 2. Esquema de la clasificación de la enfermedad de Alzheimer. Se muestra una de las formas en la que se puede clasificar la AD: Primero en sus dos variantes: familiar (FAD) y esporádico, así mismo se muestra la relación entre los tipos de AD y los componentes genéticos.

1. 1. 5. Tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

A la fecha se han estudiado distintos blancos terapéuticos contra la EA, entre los que destacan la neuroinflamación, el estrés oxidativo, la proteína Tau y el péptido β A. Dado que la EA es multifactorial existen múltiples posibles tratamientos, estos pueden ser modificadores de la enfermedad, denominados “curativos” o bien tratamientos sintomáticos. Actualmente los tratamientos que se utilizan son del tipo sintomático, entre los que se encuentran inhibidores de la acetilcolinaesterasa como el Donepezil, la Rivastigmina y la Galantamina y antagonistas del receptor de glutamato del tipo NMDA como la memantina (Carter et al 2010). Los tratamientos curativos se refieren a aquellos que atacan la causa de la enfermedad como los que se enfocan en la prevención de la formación del β A42 o sus agregados así como en la remoción de estos. Una de las estrategias más estudiadas en este momento es la inmunoterapia. Dentro del grupo de los tratamientos curativos también se hallan varios inhibidores de la beta o gamma secretasa así como moduladores de α -secretasa. Sin embargo, estos estudios están en fase de pruebas clínicas.

Lamentablemente, actualmente para los pacientes aún no está disponible ningún tratamiento que pueda frenar o revertir esta patología.

1. 1. 6. Estudio de la patofisiología de la enfermedad de Alzheimer

Para el estudio de la patofisiología de la EA se han creado múltiples modelos tanto celulares como animales; entre los modelos celulares las líneas neurales tratadas con el β A han sido una gran herramienta. En años recientes se han concentrado los esfuerzos en la generación de células pluripotentes inducidas (iPSCs) y de neuronas inducidas (Ni) provenientes de pacientes con EA familiar y esporádico, actualmente ya se ha iniciado el estudio con Ni, pero aún falta más investigación para determinar la fidelidad de estos modelos (Juopperi, et al 2011).

Otros modelos muy utilizados son los animales, como el nematodo *C. elegans*, la rata tratada con inyecciones de β A o el conejo con dieta alta en colesterol (Sparks, 2008; Calahorro y Ruiz-Rubio. 2011). Los modelos murinos transgénicos son un modelo animal ampliamente usado, éstos tienen distintas inserciones y mutaciones en genes como *PS1*, *Tau*, *APOE* y *Cox-2* entre otros. Algunos de los modelos transgénicos tienen las mutaciones en APP presentes en humanos con la EA como la mutación *Swedish* que resulta en el incremento de la producción y secreción del β A. Adicionalmente se han generado ratones con mutaciones en PS1 y PS2. Estos modelos acumulan el β A pero no replican los síntomas más significativos de la EA. En un intento por tener un modelo que reprodujera más fielmente los síntomas de la enfermedad se crearon ratones dobles transgénicos que incluyen mutaciones en APP y en alguna de las proteínas del complejo de las secretasas. Los dobles transgénicos presentan distintos niveles de acumulación de β A, y son los que tienen mutaciones en PS1 y APP los que presentan de manera algo más cercana los síntomas de la EA, aunque en estos ratones tampoco se observa la pérdida neuronal. Ninguno de los modelos mencionados presenta la acumulación de Tau hiperfosforilado en NFT. Es por esto que el modelo 3xTg-AD es considerado uno de los mejores modelos para el estudio de la AD, ya que adicionalmente a mutaciones en APP y PS1 tiene una mutación en la proteína Tau que promueve su agregación en NFT, con la cual se recapitulan más fielmente las lesiones de la AD, incluidas las NFT (Duyckaerts, et al. 2008).

1. 1. 7. El modelo murino transgénico 3xTg-AD

El modelo triple transgénico 3xTg-AD tiene modificado el gen *PS1*, con la sustitución I145V que lo hace más parecido al gen humano y la mutación ligada a la EA M146V (Guo, et al. 1999). Además cuenta con la inserción de los genes mutantes *APP* y *Tau* bajo el control regulatorio del promotor neural Thy 1.2 (Figura. 3; Oddo, et al. 2003). Como se mencionó anteriormente *PS1* es la parte catalítica del complejo de la γ -secretasa, mutaciones como la M146V en *PS1* promueven el procesamiento de la *APP* para la formación del péptido β A42 en mayor cantidad (Hardy 1997).

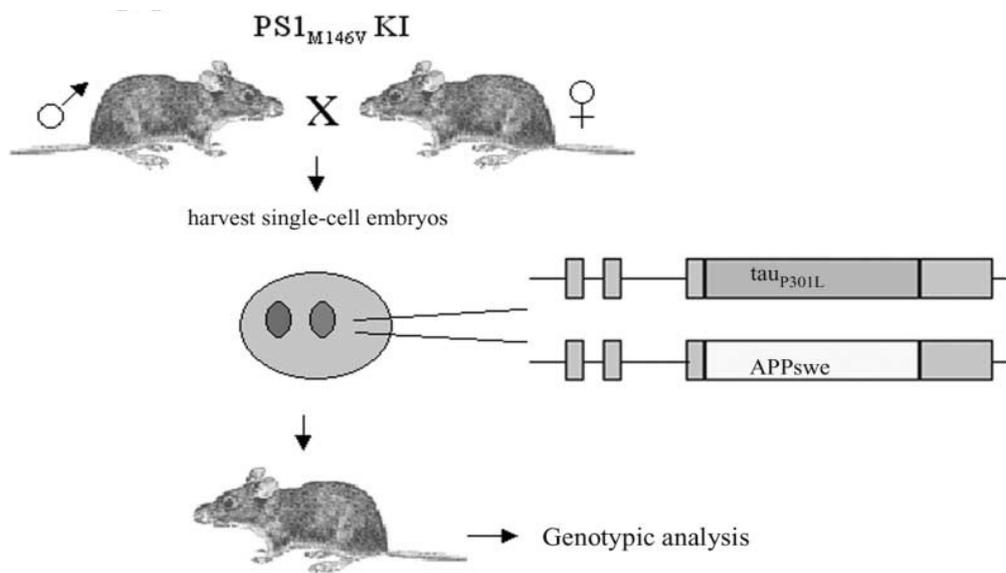


Fig. 3. Generación del ratón 3xTg-AD. En el ratón con la mutación $PS1_{M146V}$ se coinyectaron los genes τ_{P301L} y APP_{Swe} , del tal forma que se generó un ratón con los 3 genes modificados (Oddo et. al. 2003).

El ratón $PS1_{M146V}$ del cual se partió para generar el 3xTg-AD presenta exitotoxicidad por sensibilidad al glutamato en respuesta al aumento en la concentración de calcio libre en el citoplasma (Guo, et al. 1999). Los otros dos genes que tiene insertados este modelo triple transgénico son *APP* y *Tau*; *APP* tiene la mutación conocida como *Swedish*, característica de la EA del tipo familiar (FAD, por sus siglas en inglés; Hardy, 1997). Por otra parte *Tau* ha sido relacionado con más de una patología, principalmente con un grupo de patologías denominadas Taupatías, en éstas se ha observado la hiperfosforilación de *Tau* que causa que pierda su unión a los microtúbulos y los desestabilice formando las NFT, este ratón tiene la mutación P301L la cual promueve su agregación.

El modelo 3xTg-AD desarrolla una neuropatología dependiente de la edad, en ésta se generan placas seniles y NFT (Figura. 4). Las placas seniles y las NFT se asemejan considerablemente a aquellas descritas en humanos con la EA (Figura. 5) Por el orden de aparición de las placas seniles con respecto a las NFT este modelo apoya la hipótesis de la cascada amiloide (Oddo, et al. 2003).

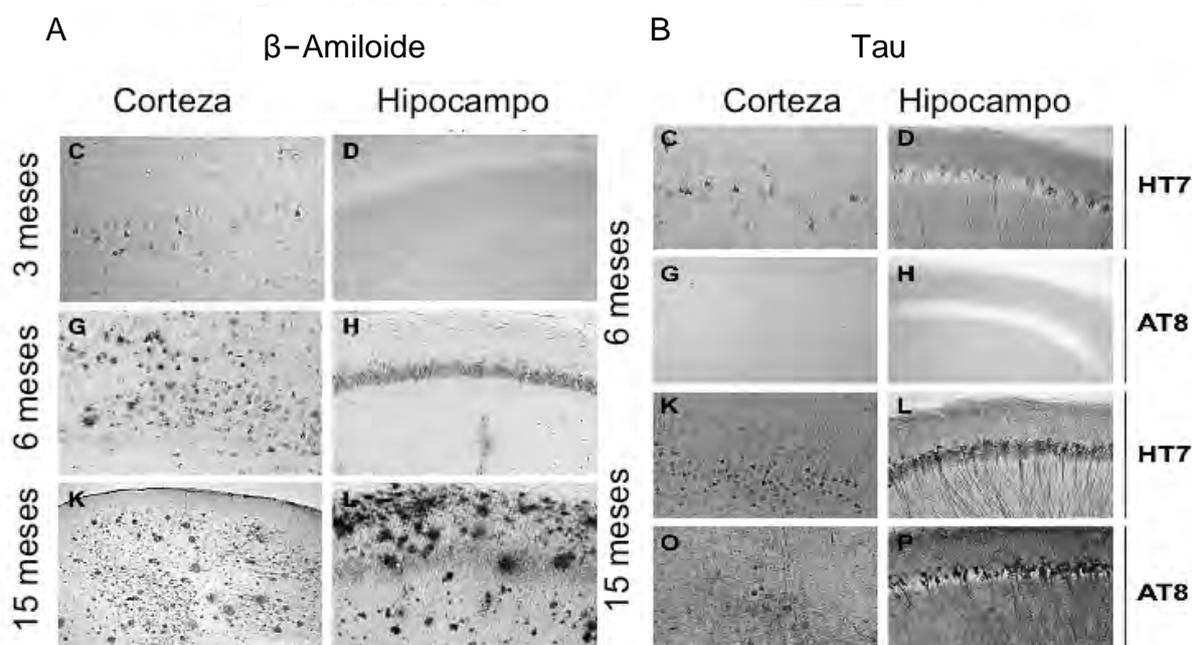


Fig. 4. Progresión de las lesiones histopatológicas en el ratón 3xTg-AD. Ensayos de inmunohistoquímica en cortes de corteza e hipocampo de ratones 3xTg-AD. A) Acumulación de el β A a los 3, 6 y 15 meses, se puede observar como hay un incremento en la acumulación de β A tanto en la corteza como el hipocampo; B) se observa la presencia de TAU total (HT7) a los 6 y 15 meses, pero Tau fosforilado (AT8) solamente se detecta a los 15 meses (modificado de Oddo, et al. 2003).

Fenotípicamente este ratón presenta déficit en un proceso de plasticidad sináptica denominado potenciación a largo plazo (LTP) antes de la formación de las placas amiloides y marañas neurofibrilares, correlacionando con la acumulación intraneuronal de β A que ocurre en etapas previas (Lamprecht y LeDoux 2004; Oddo, et al. 2003 b). El modelo, al ser caracterizado conductualmente a la edad de 2 meses -edad considerada pre-patológica- no muestra ninguna alteración cognitiva. Por el contrario, a los 4 meses post-natales, que es cuando inicia la acumulación del β A intraneuronal en el hipocampo y amígdala, la memoria a largo plazo se ve afectada. Mientras que a los 6 meses de edad, el ratón 3xTg-AD presenta serios problemas en la memoria dependiente del hipocampo (Oddo, et al. 2003). Por otra parte, estudios del laboratorio del Dr. Bermúdez indican que el gen Arg3.1, que

codifica para la proteína de respuesta a actividad Arc, disminuye su expresión con respecto al ratón silvestre en el paradigma conductual de condicionamiento aversivo al sabor lo cual se correlaciona con los déficits que este modelo tiene en el desempeño de este paradigma conductual (Zamorano-NJ Teajan, 2011).

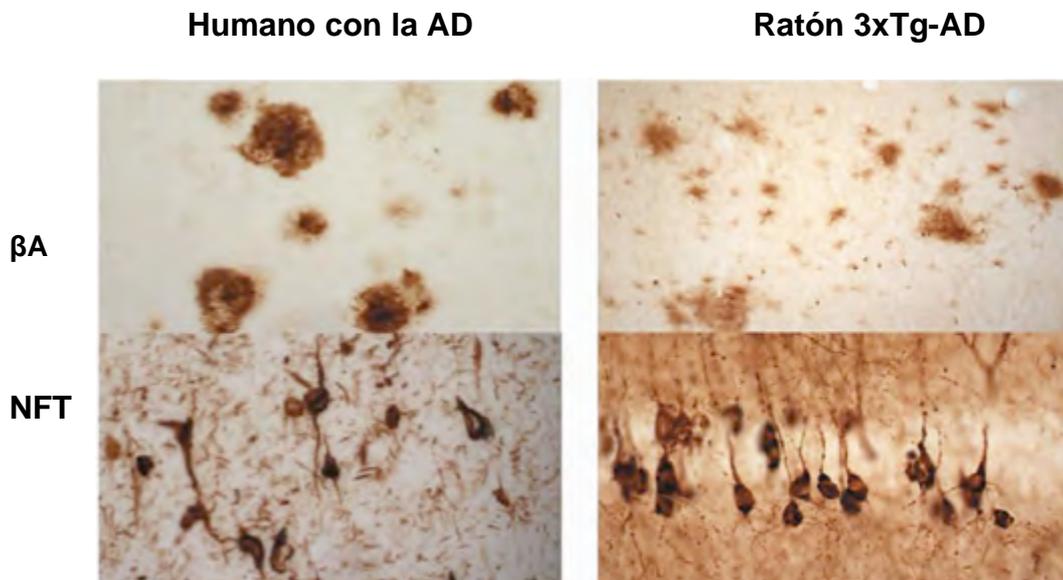


Fig. 5. Comparación de las lesiones histopatológicas del ratón 3xTg-AD con las de pacientes con enfermedad de Alzheimer. En cuanto a la acumulación de β A y la aparición de NFTs el modelo 3xTg-AD desarrolla una histopatología similar a la encontrada en humanos con la enfermedad de Alzheimer.

El daño cerebral traumático (TBI, por sus siglas en inglés) ha sido descrito como un factor ambiental de riesgo para la EA. Mediante el modelo de TBI de impacto cortical controlado (CCI) el ratón 3xTg-AD tiene acumulación intracelular del β A 24 horas y una semana después del daño, lo cual es otra similitud del modelo murino con la EA (Tran, et al. 2011).

1. 1. 8. Factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

El mayor factor de riesgo para desarrollar la EA esporádica es la edad, pero adicionalmente se conocen algunos otros factores de riesgo para desarrollar la patología, como es la de ser portador del alelo 4 de ApoE, proteína a la que se le ha señalado como participante en una de las vías de eliminación del β A, dicha variante tiene una menor eficiencia en la remoción del β A (Jiang, Q, et al 2008). Este alelo incrementa el riesgo de desarrollar la AD en un 40-65%, sin embargo, no es un factor determinante en el desarrollo de la patología. Existen otros factores de riesgo como son polimorfismos de los genes *PICALM*, *CLU* y *CR1*, pero tampoco es claro

su papel en el desarrollo de la EA (Alagiakrishnan, et al. 2012). Muchos otros estudios a nivel de análisis de genoma completo se han realizado, sin embargo no se han encontrado mejores resultados en la búsqueda de genes ligados a la susceptibilidad al AD, es por esto que se han estudiado otros factores de riesgo como los relacionados al medio ambiente (Taner, 2011).

Como se mencionó, las variaciones genéticas no son los únicos factores que influyen en el desarrollo de la EA. La alimentación, el síndrome metabólico y la diabetes actualmente han tomado gran importancia como posibles factores de riesgo. Esto ha llevado a la búsqueda de cambios patológicos que puedan ser inducidos durante el proceso de envejecimiento, como son las modificaciones epigenéticas, que al alterarse pueden modificar drásticamente el perfil de expresión genética. Principalmente se han descrito eventos de hipometilación del DNA y fallas en la función de deacetilasas de histonas, más adelante se abordará este punto con mayor detalle (Mastroeni, et al. 2009; Julien, et al. 2009).

1. 1. 8. 1. Efecto del envejecimiento sobre la regulación epigenética

En estudios donde se desea evaluar la participación de los componentes genéticos y los componentes medioambientales en el desarrollo de una enfermedad, es muy útil analizar gemelos monocigóticos discordantes para enfermedades, sobretodo, en las que el genotipo no correlaciona con el fenotipo como es el caso de la EA (Ketelaar, et al. 2012). Se ha observado que los factores hereditarios tienen mayor impacto en fenotipos que se presentan en una etapa temprana de la vida, comparados con aquellos que se presentan en la vejez, es por esto que los factores medioambientales toman mayor importancia en las patologías asociadas con el envejecimiento como la EA (Steves, et al. 2012).

1. 3. Cromatina y regulación epigenética.

Las células nerviosas como las neuronas y la glía comparten el mismo genoma que el resto de las células somáticas del organismo, sin embargo, tienen características que las distinguen del resto de las células, lo que depende del conjunto de genes transcritos en un tiempo y sitio específico. La transcripción es dependiente de la accesibilidad de factores de transcripción a los genes y sus regiones regulatorias.

Por eso el empaquetamiento del DNA, en una estructura llamada cromatina, tiene importantes efectos en la activación o silenciamiento de un gen, por lo tanto este empaquetamiento contribuye a determinar qué genes se van a expresar en sitios y momentos determinados y con esto se establece la funcionalidad y características de la célula. La unidad primaria de empaquetamiento es el nucleosoma, que está compuesto por un octámero de histonas, el cual incluye dos copias de las histonas H3, H4, H2A y H2B, a este octámero se le enrollan 147 pb de DNA en 1.65 vueltas alrededor de éste dejando aproximadamente 50 pb libres entre nucleosomas (Felsenfeld y Groudine, 2003). Existen distintos niveles en los que se puede estructurar la cromatina, el primer nivel es conocido como “collar de perlas” o fibra de 10 nm. El siguiente nivel de compactación da lugar a la fibra de 30 nm conocida como solenoide, a su vez el solenoide puede formar asas de cromatina de 300 nm y éstas empaquetarse aún más para alcanzar el mayor nivel de compactación del genoma representado por el cromosoma metafásico (Figura 6; Felsenfeld y Groudine 2003).

El cambio en el nivel de transcripción de un gen debido a la modulación de la cromatina y que no modifica la secuencia de DNA es conocido como regulación epigenética (Wood, 2011). La cromatina puede definirse como el conjunto de asociaciones entre proteínas y DNA, ésta puede tener dos estados, eucromatina y heterocromatina. La eucromatina es aquella que está menos compactada, por lo tanto contiene los genes que se están expresando y es la primera en entrar al proceso de replicación, mientras que la heterocromatina es más compacta y de replicación tardía. Por su parte la heterocromatina puede ser constitutiva o facultativa, la primera es aquella que comprende principalmente los telómeros, secuencias repetidas y centrómeros al igual que el cromosoma X silenciado, mientras que la heterocromatina facultativa incorpora aquellos genes que no se están expresando pero que podrían expresarse en respuesta a un estímulo. Entre las modificaciones epigenéticas comúnmente estudiadas están las modificaciones post-traduccionales de las histonas, las variantes de histonas y las modificaciones directas al DNA como la metilación de las citosinas (Felsenfeld y Groudine 2003).

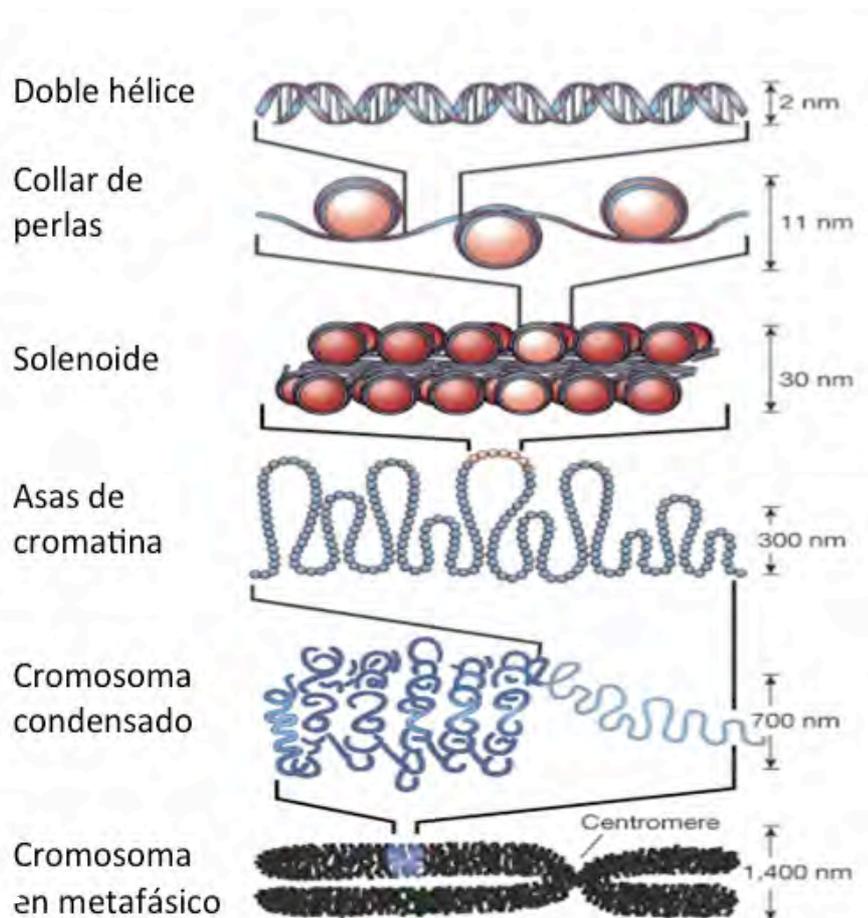


Fig. 6. Estructuración del DNA en cromatina. Se muestran los distintos niveles de compactación del DNA, desde la doble hélice, la fibra de 10nm, el solenoide hasta llegar al cromosoma metafásico (Modificado de FelsenfeldyGroudine 2003).

1. 3. 1. Regulación mediada por modificaciones post-traduccionales y variantes de histonas

Las modificaciones post-traduccionales a histonas pueden ser mediante la metilación, la acetilación, la fosforilación y la ubiquitinación (Margueron y Reinberg 2010). Este tipo de modificaciones se da principalmente en el extremo N-terminal de las histonas y cada una de las modificaciones da lugar a cromatina permisiva (eucromatina) o represiva (heterocromatina). Algunas de las modificaciones post-traduccionales a las que se les ha atribuido activación son la tri-metilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me3) y la acetilación de las histonas. Marcas de heterocromatina (cromatina “cerrada”) son la metilación de las histona H3 en la lisina 9 y 27 (H3K9me3 y H3K27me3; Li, et al. 2007).

Las modificaciones a las histonas son llevadas a cabo por acetil transferasas de histonas (HAT, por sus siglas en inglés), deacetilasas de histonas (HDAC, por sus siglas en inglés), metiltransferasas de histonas y demetilasas de histonas. Adicionalmente existen variantes de histonas como la H2AZ, la H3.3 y la macroH2A, entre otras (Sarma y Reinberg 2005). Tanto las modificaciones post-traduccionales como las variantes de histonas impactan en el estado de compactación de la cromatina y el reconocimiento de ésta por factores transcripcionales, siendo una manera en la que se regula la transcripción.

1. 3. 2. Metilación del DNA

Otra importante modificación a nivel epigenético es la metilación del DNA. En mamíferos, ésta se lleva a cabo mayoritariamente en las citosinas de los dinucleótidos CpG, lo que genera la 5 metilcitosina (5mC; Lister, et al. 2013). Las enzimas encargadas de esta modificación son las DNA metiltransferasas (DNMT, por sus siglas en inglés), estas enzimas se dividen en dos familias, las *de novo* y las de mantenimiento. Entre las *de novo* están la DNMT3a y DNMT3b, en la categoría de las de mantenimiento se localiza a la DNMT1. La metilación del DNA está relacionada con regiones que son silenciadas a largo plazo, algunos ejemplos son los genes improntados, los transposones y el cromosoma X inactivo. Errores en la regulación de la metilación del DNA han sido relacionados ampliamente con cáncer y trastornos neurológicos (Wuy Zhang 2010).

1. 3. 2. 1. Regulación de la metilación del DNA

Una forma en la que puede regularse la metilación del DNA es mediante la regulación de las DNMT, por ejemplo, se ha descrito que las DNMTs son reguladas por RNAs no-codificantes (ncRNA; Denis, et al. 2011). Estudios *in vitro*, muestran que las DNMT3a y b forman complejos con RNA (RNP), y específicamente se ha visto que DNMT3a interactúa con ncRNAs (Denis, et al. 2011). En modelos como *Arabidopsis thaliana* se ha observado que los ncRNAs dirigen el 30% de la metilación del DNA (Denis, et al. 2011). Otra de las formas en las que se puede regular la metilación del DNA es mediante la disponibilidad de los grupos metilo para su transferencia a la citosina, las DNMTs toman el grupo metilo de la S-

adenosilmetionina (SAM). Para la generación del SAM es necesario el llamado “metabolismo de un carbono”, esta vía es regulada por la presencia del folato, vitaminas B12 y B6, por lo que el estado nutricional de un individuo puede afectar la metilación del DNA (Fuso, et al. 2011).

La metilación del DNA solía verse como una marca estable en el genoma que solamente podía perderse con las divisiones celulares, es por esto que la desmetilación del DNA inicialmente fue descrita mediante un mecanismo pasivo en el cual se requiere de la replicación del DNA y la no acción de las DNMTs, de tal forma que con cada división celular el DNA pierda gradualmente su metilación. Recientemente se describió otra vía desmetilante, que se ha denominado como desmetilación activa, éste es un fenómeno que aún sigue en estudio y es más complejo que el pasivo (Dahl, et al. 2011). Para que este tipo de desmetilación ocurra es necesario que una enzima remueva el grupo metilo de la 5mC, y aunque el proceso de desmetilación activa es frecuente y existen múltiples casos en los que ha sido descrito a la fecha no se ha descrito ninguna DNA desmetilasa (Guo, et al. 2011). En el sistema nervioso el proceso de desmetilación activa es ampliamente estudiado y representa uno de los puntos centrales de este trabajo.

Mecanismo de desmetilación activa del DNA

La oxidación mediada por las proteínas *Ten-Eleven Translocation* (TET) es parte de la vía desmetilante activa e implica la existencia de un intermediario denominado 5-hidroximetilcitosina (5hmC). Ésta puede ser procesada por la maquinaria de reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés) eliminándose así la 5mC (Dahl, et al. 2011). En el cerebro de ratón adulto se demostró que TET1 es la hidroxilasa responsable de la generación de 5hmC (Guo, et al. 2011). En el proceso de desmetilación activa la 5hmC es desaminada por las deaminasas AID/APOBEC para transformarse en 5 hidroximetiluracilo (5hmU) y posteriormente es procesada por una DNA glicosilasa, como la Timina DNA glicosilasa (TDG, por sus siglas en inglés; Guo, et al. 2011; Fritz. y Papavasiliou, 2010). En este sistema la proteína Gadd45a también está involucrada ya que junto con la AID forma un complejo con la TDG (Figura. 7; Cortellino, et al. 2011). Este proceso ha tomado gran importancia en

la actualidad, ya que abre el panorama para el estudio de un nuevo proceso regulatorio en células postmitóticas como son las neuronas.

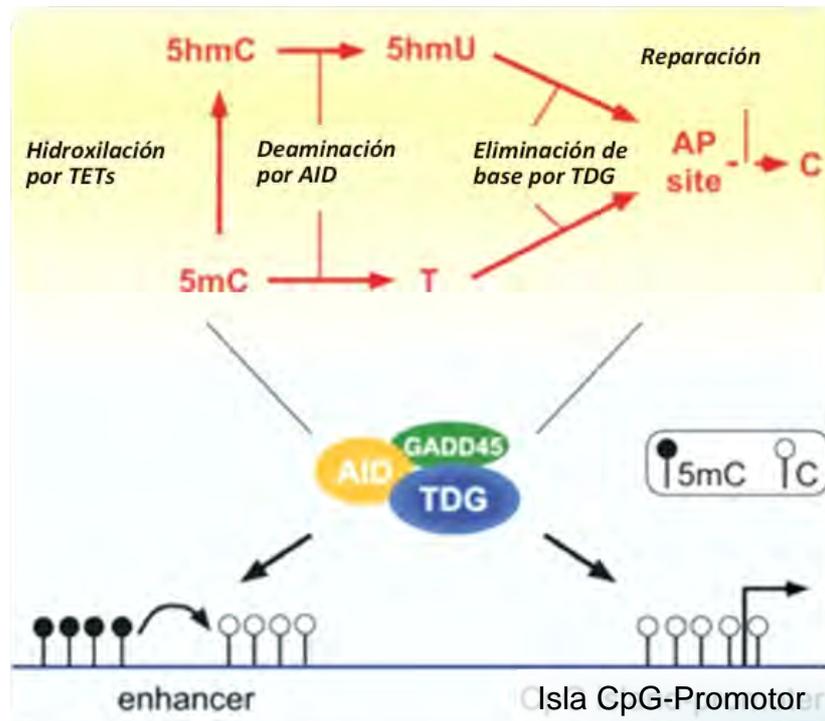


Fig. 7 Vía de desmetilación activa del DNA en el cerebro. Se muestran los componentes conocidos en la vía de desmetilación activa en el cerebro. La 5mC es oxidada a 5hmC por las enzimas TET, posteriormente se deamina por el sistema AID y se convierte en 5hmU, este es reconocido como un “error” y es corregido por el sistema de reparación de bases TDG, convirtiéndose a un sitio abásico y posteriormente se incorpora una citosina no modificada (modificado de Cortellino, et al. 2011).

1. 3. 2. 1. 1. 5 hidroximetilcitosina y otras modificaciones de la 5 metilcitosina

La 5hmC no es la única modificación resultante de la acción de las enzimas TET sobre la 5mC, también es posible encontrar a otros dos productos, la 5 carboxicitosina y la 5 formilcitosina, que también son parte de los sustratos del sistema BER para la desmetilación activa, sin embargo, aún faltan estudios para determinar si tienen alguna otra función celular. Los primeros estudios en esta área sugieren que estas 3 son por sí mismas parte de los mecanismos de regulación epigenética, a la fecha la más estudiada ha sido la 5hmC (Spruijt, et al. 2013).

De manera inicial se consideró a la 5hmC únicamente como parte de la vía de desmetilación activa antes mencionada, primero la 5hmC se describió de forma

abundante en el SN, principalmente en las células de Purkinje, por primera vez se planteó su posible papel para la fisiología y funcionamiento de las neuronas, años después en humanos fue descrita en diversos tejidos, principalmente, en el cerebro hay gran enriquecimiento de ésta (Kriaucionis y Heintz 2009; Li y Liu 2011). De manera casi simultánea a su descubrimiento se encontró que dicha modificación es mediada por la oxidación de la 5mC por las enzimas TET, de forma dependiente del alfacetoglutarato (Tahiliani M, et al. 2009).

Actualmente se ha considerado a la 5hmC como una marca estable en el genoma (Szulwach, et al. 2011; Mellén, et al. 2012; Lister, et al. 2013). Otro de los primeros estudios en el área identificó que la 5hmC está localizada principalmente en células pluripotentes, y en el linaje neural, con lo cual surge el interés de conocer su distribución a nivel genómico en las distintas etapas del desarrollo y diferenciación neuronal (Ruzov, et al. 2011). A finales del año 2011, tan solo año y medio después de su descubrimiento, se realizó el primer mapeo de la 5hmC en el SNC tanto en condiciones adultas como en el desarrollo y envejecimiento. Los datos mostraron que la marca de 5hmC se mantiene durante el desarrollo hasta el envejecimiento y que su localización específica en el genoma tiene algunas variaciones dependiendo de la etapa del desarrollo y tipo celular específico en que se analice (Figura. 8; Szulwach, et al. 2011).

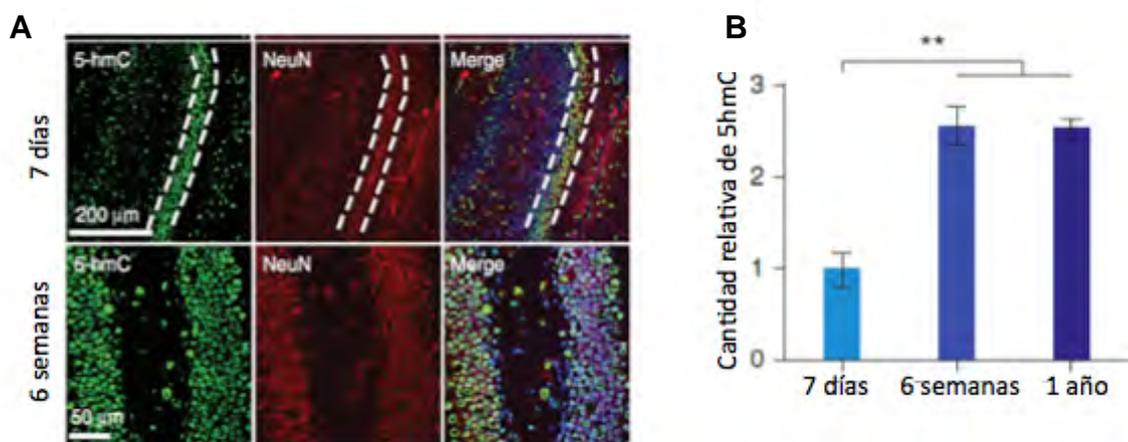


Fig. 8 Presencia y distribución de la 5hmC en el hipocampo de ratón. A- Se puede observar la presencia y la localización de la 5hmC en el hipocampo del ratón a los 7 días post-natales y a las 6 semanas de vida, **B-** Hay aumento de 5hmC al llegar a las 6 semanas con respecto a estadios postnatales (modificado de Szulwach, et al. 2011).

En el SN la primera proteína descrita de unión a la 5hmC es la proteína de unión al DNA metilado denominada MeCP2, en este caso particular se localiza en regiones de cromatina abierta y genes activos, favoreciendo la activación de los mismos (Mellén, et al. 2012). Recientemente se han descrito otras proteínas que pueden reconocer de manera diferencial a la 5hmC de la 5mC, y que varían dependiendo del tipo celular, por ejemplo la helicasa Recql y las glicosilasas Mpg y Neil3 son proteínas de unión a la 5hmC en células madre, y por su función parecen estar implicadas en el proceso de desmetilación activa (Spruijt, et al. 2013). Por otra parte, en precursores neurales se asocian otras proteínas como Uhrf2, una ubiquitín ligasa; en el cerebro el conjunto de proteínas que interactúan con 5hmC cambia nuevamente, ahora son componentes tales como Thap11, Rfc2-5 y Rfc1. Estas observaciones demuestran que las proteínas de unión a la 5hmC son dependientes del tipo celular y estadio del desarrollo, lo que sugiere una función diferencial de esta modificación del DNA durante el desarrollo (Spruijt, et al. 2013).

Hasta el momento los estudios han mostrado que la 5hmC tiene un papel antagónico a la 5mC (Mellén, et al. 2012). También se le ha encontrado enriquecida durante la diferenciación neuronal en el genoma en regiones promotoras, en el cuerpo de los genes y en sitios denominados enhancers, que son regiones no-codificantes que de manera distante tienen acción activadora (Sérandour, et al. 2012; Visel, et al. 2009). Al caracterizar el enriquecimiento de 5hmC en el cerebro, particularmente en la corteza frontal, se observó que los sitios donde está la 5hmC corresponden a los genes relacionados con transporte iónico (Khare, et al. 2012). Además, se corroboró que su enriquecimiento no correspondía a los sitios en los que había mayor 5mC por lo que confirma que estas dos marcas parecen no coexistir y tienen diferentes papeles en la regulación de la transcripción (Jin, et al. 2011).

Dado que esta modificación tiene poco tiempo de haber sido descrita aún se desconoce mucho de ella y su función como parte de la regulación epigenética, es por esto que su estudio en distintas condiciones es muy importante para determinar su posible participación en diversos procesos biológicos. Con la información que se tiene hasta el momento, se ha propuesto que esta marca en el SN no es solamente

un intermediario del proceso de desmetilación activa del DNA, sino que es una marca estable con una función específica y que es antagónica a la 5mC (Jin, et al. 2011). Todo esto da lugar al estudio del papel de estas marcas en el SN, tanto en su fisiología como en condiciones patológicas, un ejemplo es el estudio de ésta modificación en la EA, tema central de esta tesis.

2. Antecedentes

2. 1. Regulación epigenética en el Sistema Nervioso

La memoria es el proceso por el cual, el conocimiento, producto del aprendizaje, es codificado, almacenado y después evocado (Kandel 2000). A su vez la memoria puede dividirse en memoria de corto plazo y memoria de largo plazo, siendo la consolidación el proceso que da lugar a la memoria de largo plazo; la consolidación de la memoria requiere la síntesis de proteínas *de novo*, por lo que alterar los procesos de transcripción y traducción pueden mejorar o impedir la consolidación de la memoria y por lo tanto la memoria a largo plazo (Kandel 2000).

De forma no patológica, las modificaciones epigenéticas se han descrito por varios estudios como posibles modificaciones que subyacen a la memoria y a la activación de vías de señalización relacionadas con ésta (Roth, et al. 2010). Un ejemplo está dado en la corteza insular, en la que con la memoria de condicionamiento aversivo al sabor ocurre un aumento de la acetilación de histonas como consecuencia de la inducción de este tipo de memoria (Roosendaal, et al. 2010). En el condicionamiento contextual al miedo también se ha demostrado la participación de procesos epigenéticos tales como la trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me3) aumenta en el hipocampo una hora después del condicionamiento, esta marca regresa a niveles basales 24 horas post-condicionamiento (Gupta, et al. 2010).

Por otra parte, uno de los mecanismos que regula el cambio en los niveles de acetilación de histonas involucra a la proteína CBP (proteína de unión a CREB), que tiene actividad inherente de HAT y que se ha descrito como fundamental para varios tipos de memoria. El ratón nulo para esta proteína tiene serios problemas en la

consolidación de la memoria, por ejemplo en el laberinto acuático de Morris y en condicionamiento al miedo por sonido (Korzus, et al. 2004). Otras observaciones que apoyan la importancia del control epigenético en la memoria fue cuando al inhibir deacetilasas de histonas (HDAC) se facilitó la memoria (Vecsey, et al. 2007). Poco tiempo después se describió que HDAC2 regula negativamente la memoria, y se confirmó que la HDAC2 actúa regulando a nivel epigenético la expresión de genes involucrados en la memoria (Guan, et al. 2009). En ratones se demostró que en el hipocampo la acetilación de la lisina 12 de la histona H4 (H4K12ac) en el envejecimiento se desregula a la baja cuando se realiza el paradigma conductual de condicionamiento al miedo (Peleg, et al. 2010).

En los últimos años también se ha descrito la participación de la regulación epigenética mediada por la metilación del DNA como un mecanismo de regulación asociado a la memoria. Inicialmente se describió que las DNMTs regulan la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP), que es un proceso de plasticidad sináptica, considerado un modelo de aprendizaje y memoria (Lamprecht y LeDoux 2004; Day y Sweatt, 2010). El ratón doble mutante para DNMT1 y DNMT3a en el cerebro, presenta baja habilidad para el aprendizaje en el laberinto acuático de Morris (Day y Sweatt, 2010). Por otra parte, en la amígdala lateral, la acetilación de la histona H3 y el aumento en la DNMT3a también se han relacionado con la consolidación de la memoria de condicionamiento al miedo por un sonido (Monsey, et al. 2011). De manera más específica se ha encontrado que con la inducción de la memoria la metilación del promotor de la proteína Reelina disminuye, mientras que en el del gen de *PP1* aumenta, lo cual correlaciona con la función de estas proteínas en la memoria, la primera tiene que ver con la formación de la memoria y la segunda es un represor de ésta (Day y Sweatt, 2010). En la corteza prefrontal, un día después del condicionamiento al miedo, se observó que el promotor del gen de calcineurina aumenta en sus niveles de metilación del DNA (Day y Sweatt, 2010). Además el bloqueo de las DNMTs mediado por el uso de análogos de la citosina elimina la asociación del condicionamiento al miedo por contexto (Day y Sweatt, 2010). Un estudio más amplio probó que con estimulación electro-convulsiva el estado de metilación del DNA de las neuronas del giro dentado sufría modificaciones, que podían ser transitorias o perdurar en el tiempo (Ma, et al. 2011).

Los datos anteriores muestran que el estado de metilación del DNA es dinámico, lo cual, apoya la participación de la vía de desmetilación activa en el cerebro de manera dependiente a la estimulación, más específicamente en el proceso de aprendizaje y memoria. Adicionalmente los resultados de los estudios en los que se utilizaron análogos de citosinas indican que parte del mecanismo de la desmetilación activa implica la remoción de 5mC y la incorporación de citosinas *de novo*. Otro dato más que refuerza la propuesta de la participación del proceso de desmetilación activa en la funcionalidad del cerebro es que Gadd45b ha sido descrito como un gen de inducción temprana en el hipocampo y esta proteína junto con Gadd45a está involucrada en el proceso de desmetilación activa (Wu y Sun 2009; Cortellono, et al 2011). La mutación nula de Gadd45b en el ratón genera fallas en la proliferación de precursores neurales y déficit en el crecimiento de dendritas en neuronas jóvenes en el hipocampo, aparentemente el mecanismo por el cual ocurren estas fallas es por falta de expresión de las proteínas BDNF y FGF, lo que se relaciona con la no desmetilación de sus promotores (Ma, et al. 2009). Sin embargo, algunos estudios han mostrado datos contradictorios sobre el efecto de la eliminación de Gadd45b sobre la memoria dependiente de hipocampo, ya que mientras un estudio muestra que la memoria mejora en el ratón nulo para esta proteína otro muestra el efecto inverso (Sultan, et al. 2012; Leach, et al. 2012).

La regulación de la metilación de DNA es fundamental en la función del sistema nervioso, especialmente en los procesos cognoscitivos, por esto es que su estudio en neuropatologías que tengan fallas en procesos de aprendizaje y memoria es de gran interés y es justo éste el proceso que aborda el presente estudio.

2. 2. Regulación epigenética y enfermedad de Alzheimer

Como se mencionó con anterioridad en la EA existen algunas mutaciones o variantes génicas identificadas como factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, ninguno de éstos determina la presencia de la enfermedad en la mayoría de los casos. Es por esto que tanto los factores no genéticos como los ambientales se han tomado en consideración como posibles participantes en la etiología de la EA (Alagiakrishnan, et al. 2012). Algunos de los

factores medioambientales propuestos como posibles coadyuvantes en la EA son la hipertensión, la hipercolesterolemia y el estado nutricional del individuo (Gillette-Guyonnet, et al. 2013; Sparks 2008).

En cuanto a la participación de la regulación epigenética respecta, estudios recientes se ha relacionado la acetilación de histonas con el mejoramiento de la memoria en ratas viejas, esto mediante la inhibición de HDACs (Stilling y Fischer, 2011). Por ejemplo en un modelo de la EA varios genes son regulados negativamente por la HDAC2, uno de estos genes es *Arc* (Graff, et al. 2012). Con miras a obtener algún tratamiento efectivo contra el déficit cognitivo en la EA, se ha intentado utilizar fármacos que afecten el estado de acetilación de histonas en el cerebro de modelos de la EA. Previamente ya se había observado que el tratamiento con inhibidores de HDACs mejora la memoria en un modelo transgénico de la EA y que los niveles de la deacetilasa SIRT1 se relacionan con la severidad de la patología de la EA (Kilgore, et al. 2010; Julien, et al. 2009). En el 3xTg-AD se demostró que con el tratamiento con nicotidamida, un inhibidor de la deacetilasa SIRT (NAD⁺ dependiente) mejora el aprendizaje, aunque el mecanismo aún no se conoce ya que no se analizó el efecto sobre las histonas (Green, et al. 2008). En otro modelo transgénico se probó que el tratamiento por 6 meses con fenilbutirato (PBA, por sus siglas en inglés) que es un inhibidor de HDACs mejora la memoria, sin embargo, en este trabajo tampoco se analizó el mecanismo (Ricobaraza, et al. 2011). Modificaciones en el estado epigenético de células neurales también ha sido reportado en condiciones de envejecimiento y patologías como la EA, por ejemplo, existe una asociación positiva entre la localización de la histona H3 fosforilada y la EA (Ogawa, et al. 2003).

Además, dado que uno de los principales factores en común en la EA es la edad avanzada, el estudio de los procesos de regulación genética y epigenética relacionados al envejecimiento es un área que ha ido ganando interés en los últimos años. Un estudio mostró que el aumento de edad genera cambios a nivel de la expresión genética en el cerebro humano; en las regiones corticales se observó que estos cambios se dan en gran cantidad entre los 60 y 70 años de edad (Berchtold, et al. 2008). En este mismo estudio se mostró que los cambios se presentan con dimorfismo sexual, ya que en los hombres hay un decremento de genes

relacionados con el catabolismo y anabolismo, fenómeno que no ocurre en las mujeres estudiadas (Berchtold, et al. 2008). Otro estudio que refuerza lo anterior mostró que con la edad en la corteza frontal se reduce el nivel transcripcional de genes relacionados con la función sináptica y la plasticidad, mientras que aumenta el nivel de genes de respuesta a estrés y reparación (Lu, et al. 2004). Recientemente se ha descrito que en cuanto a la expresión genética los pacientes con la EA presentan un patrón similar al observado en personas de edad más avanzada, sugiriendo un envejecimiento prematuro con la EA (Cao, et al. 2010). Uno de los genes que podría estar desregulado por metilación anormal del DNA es *Arc*. En rata se encontró que el envejecimiento conlleva una hipermetilación del promotor del gen de *Arc* en el hipocampo (Penner, et al. 2011). Adicionalmente se ha observado que hay cambios en la expresión de *Arc* resultantes de condiciones relacionadas a la EA como la neuroinflamación (Rosi, et al. 2005). Sumando a lo anterior en un modelo transgénico de la EA se encontró disminuida la expresión de esta proteína con respecto a lo observado en ratones no transgénicos (Palop, et al. 2011). En una región de la Isla CpG río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *Arc* fue reportada como enriquecida la 5hmC en el hipocampo en ratones de un año sobre ratones de 6 semanas (Szulwach et al 2011).

Por otra parte, las deficiencias severas de la vitamina B12 generan un aumento de la homocisteína (HCY), que es un intermediario del metabolismo de la S-adenosin-metionina (SAM), principal donador de grupos metilo en la célula (Fuso, et al. 2005). Por eso es que los niveles de vitamina B12 pueden afectar la metilación de distintos componentes celulares como las histonas, factores protéicos nucleares y especialmente el DNA y con ello favorecer el desarrollo de la EA cuando éstos disminuyen (Fuso, et al. 2008). En líneas de neuroblastoma se ha descrito que la deficiencia de vitamina B produce alteraciones en la metilación del DNA en el promotor del gen de *PS1* (Fuso, et al. 2005). También se ha probado que en ratones transgénicos para APP hay una afección temprana relacionada con una dieta baja en vitamina B (Fuso, et al. 2008), y en estos mismos ratones se demostró que había hipometilación de una región en el extremo 5' del promotor del gen de *PSEN1* que puede ser modulada con cambios en la cantidad de la vitamina B en la dieta (Fuso, et al. 2011 a). Poco después se describió que la deficiencia en la vitamina B podía causar en neuroblastoma y cerebro de ratón el incremento en la proteína de unión al

DNA metilado MBD2 y la disminución de las metiltransferasas DNMT3a y DNMT3b (Fuso, et al. 2011b). Sin embargo, en estudios con humanos los resultados sobre la deficiencia en vitamina B y el aumento en HCY no se ha confirmado como un factor predisponente para desarrollar la EA, además el decremento de la HCY no parece tener un efecto significativo en la reducción del declive cognitivo (Ho, et al. 2011; Kwok, et al. 2011). El efecto del estado nutricional sobre las modificaciones al DNA hace de mayor interés el estudio de estas modificaciones en la EA ya que aunque parece no ser una causa de la enfermedad por los datos previos se sabe que sí puede influir en el desarrollo de la misma.

2. 2. 1. Metilación del DNA y la enfermedad de Alzheimer

Los datos que más claramente se han encontrado relacionados con la EA son cambios en la metilación del DNA, concretamente, los referentes a la existencia de hipometilación o desmetilación del DNA. Los primeros estudios en esta área revelaron la hipometilación del promotor del gen de *APP*. En esos se describió que un paciente con la EA presentaba hipometilación en una región del promotor de este gen, en comparación con el nivel de metilación de la misma región del DNA en un paciente con una enfermedad no relacionada, lo que podría promover un incremento en *APP* (West, et al. 1995). Este dato junto con el fenotipo de acumulación de β A en sujetos con trisomía 21, ha apoyado que la sobreexpresión promueve la formación de las placas amiloides (Oddo, et al. 2008). Sin embargo, cuando el análisis del estado de metilación de genes asociados al envejecimiento se realizó en humanos, no se encontraron modificaciones en la metilación del promotor de *APP*. Por otro lado estudios en gemelos mostraron que los niveles y regiones de metilación de DNA en gemelos infantiles (3 años de edad) eran muy similares, mientras que si se comparaban gemelos en edad adulta (50 de edad) existían diferencias considerables en los patrones de metilación del DNA (Figura 9; Fraga, et al. 2005). Este estudio se ve complementado por el hecho que conforme avanza la edad existe la tendencia a perder metilación de DNA tanto en regiones codificantes como en regiones intergénicas; las regiones que se conservan metiladas en cada individuo, no tienen una correlación alta con otros individuos, lo que sugiere que éste es un proceso que

podría modificar el perfil de expresión de cada individuo de manera independiente a su genotipo (Heyn, et al. 2012).



Fig. 9. Diferencias en el estado de metilación de DNA en gemelos monocigóticos. Se puede observar que en el cromosoma 17 a los 3 años de edad la metilación es prácticamente idéntica entre los gemelos, esto representado por la cohibridación en amarillo que es la suma de las sondas rojo y verde de que representan las regiones del genoma que están metiladas en cada gemelo; mientras que a los 50 años las regiones metiladas son diferentes, lo que da como resultado la hibridación diferencial en el cromosoma (modificado de ...)

En un estudio independiente mediante un análisis global se encontró hipometilación del DNA como una consecuencia del tratamiento de células endoteliales de cerebro en cultivo con el péptido β A40 (Chen, et al. 2009). Posteriormente se descubrió que la desmetilación se presenta de forma global en el genoma en pacientes con la EA. En un estudio de gemelos monocigóticos se descubrió que la metilación global del DNA en el gemelo con EA estaba disminuida en la corteza temporal anterior con respecto a su gemelo que no había padecido esta enfermedad, es importante remarcar que en el cerebelo, que es una estructura no relacionada, la metilación era similar en ambos hermanos (Figura. 10; Mastroeni, et al. 2009). También se describió que este fenómeno de la pérdida de inmunorreactividad (IR) a 5mC y marcadores de mantenimiento de metilación como DNMT1 y MBD2 se reproducía cuando se comparaba la corteza entorrinal de enfermos de EA contra enfermos con otra demencia no relacionada como la enfermedad de Pick (Mastroeni, et al. 2010). Estos datos vuelven a la metilación del DNA un punto importante de estudio en el desarrollo de la patología de la EA.

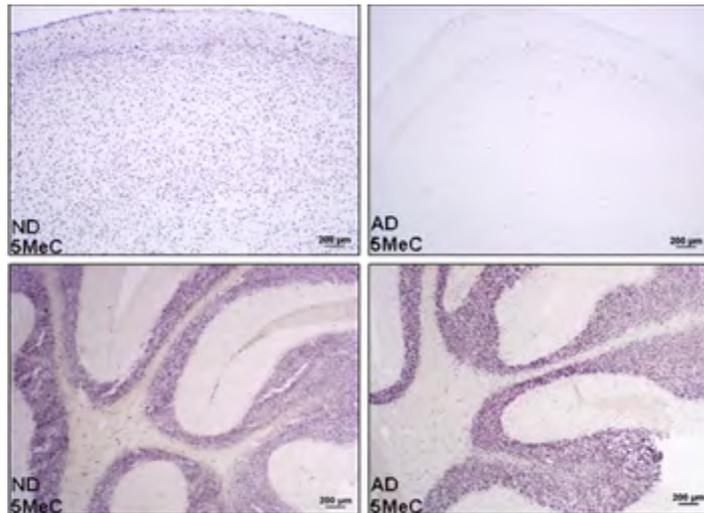


Fig. 10. Cambios en el estado de metilación de DNA en la corteza en gemelos discordantes para la AD. Inmunohistoquímicas utilizando un anticuerpo anti-5mC en cortes de corteza (panel superior) y cerebelo (panel inferior) de un paciente sin Alzheimer (ND) y uno con AD. En la corteza se puede observar la falta de inmunorreactividad a la 5mC de forma general en el sujeto con la AD (Mastroeni, et al. 2009).

Estudios recientes del grupo del Dr. Rutten señalan que en el giro dentado del hipocampo de ratón existen 2 subpoblaciones de células inmunorreactivas a DNMT3a, que se diferencian por su nivel de IR a esta proteína. Este mismo estudio indica que las que tienen una mayor IR a DNMT3a coinciden con ser neuronas jóvenes, además esta sub-población de células disminuye con el envejecimiento (Chouliaras et al 2011). Este mismo grupo describió que el envejecimiento conlleva a cambios en el nivel de la IR a la 5mC y a la 5hmC en el hipocampo de ratón, pues ésta aumenta con la edad, ambos incrementos son contrarrestados por la restricción calórica (Chouliaras, et al. 2012; Chouliaras, et al. 2012b).

Dado que las neuronas son células postmitóticas y para que exista la hipometilación es necesario que haya ocurrido mediante el proceso de desmetilación activa. Se ha planteado que algunos componentes de este proceso podrían estar alterados en la EA, tal es el caso de la 5hmC y Gadd45, esta última es una proteína que se activa como respuesta al β A y se encuentra aumentada en la EA (Santiard-Baron 1999). Es probable que esta desmetilación esté relacionada con la edad ya que en pacientes mayores de 70 años de edad se ha identificado la desmetilación del promotor del gen de *APP* que no está presente en sujetos de menor edad (Tohgi, et al. 1999), sin embargo en pacientes menores a 70 años de edad no se reportan

diferencias en el estado de metilación del DNA en análisis de sangre periférica (Schiepers, et al. 2011).

Con base en trabajos previos podemos considerar a la epigenética como un factor más a tomarse en cuenta en el tratamiento de la EA, ya que posiblemente no baste con eliminar el β A del cerebro para que éste regrese a un estado funcional, pues ya habrán alteraciones causadas por múltiples factores entre ellos los cambios celulares a nivel epigenético (Graff et al 2012). Es por esto, que en el presente trabajo exploramos la hipometilación del DNA y la 5 hidroximetilación del DNA durante el desarrollo de la AD.

3. Planteamiento del Problema

Las modificaciones epigenéticas han surgido como un nivel de regulación que puede estar alterado en la EA. De manera específica, las modificaciones directas al DNA como la metilación e hidroximetilación están involucradas en las etapas finales de la enfermedad, sin embargo, se desconoce si estas modificaciones son causales de la enfermedad o si son parte de la patofisiología de la misma. Es por esto que analizar el estado de metilación e hidroximetilación del DNA durante el desarrollo de la EA es de gran importancia. Para lo que se plantea utilizar el modelo murino transgénico 3xTg-AD, ya que se desconoce si éste presenta las características epigenéticas encontradas en la EA como la hipometilación de forma global en la corteza cerebral en las distintas etapas de la patología. Además este trabajo plantea analizar si la hipometilación se encuentra de manera específica en algunos genes relacionados con la EA como es el caso de los genes *APP* y *Arc*.

4. Hipótesis

En la EA existen procesos epigenéticos alterados que se han vinculado principalmente a la edad, dentro de los cuales se presenta una pérdida global y significativa de la metilación del DNA. Como consecuencia de lo anterior postulamos que debe existir un incremento en el proceso de desmetilación activa, el cual, estará asociado a la ganancia de hidroximetilación del DNA.

5. Objetivo

Determinar si el modelo murino transgénico 3xTg-AD presenta cambios epigenéticos similares a los que se presentan en la EA. Específicamente evaluar el estado metilación e hidroximetilación de DNA, en la corteza cerebral y determinar si se presentan cambios de metilación del DNA en la región promotora de los genes que codifican para *Arc* y *APP*.

5. 1 Objetivos particulares

1. Determinar la distribución de la 5hmC en neuronas y células gliales en la corteza cerebral.

2. Establecer el efecto del envejecimiento y del desarrollo de la patología de la EA sobre los niveles de metilación e hidroximetilación de DNA en la corteza cerebral del ratón.

3. Conocer si se regulan mediante metilación del DNA en su región promotora dos genes asociados a la enfermedad: Arc (Arg 3. 1) y APP en el modelo 3xTg-AD.

6. Estrategia experimental

Estudiar en el ratón la corteza cerebral, ya que previamente en esta estructura se describió la pérdida de la modificación 5mC en pacientes con la EA, la región a analizar fue la correspondiente a las coordenadas Bregma -0.94 y Bregma -1.64 (Figura. 11)

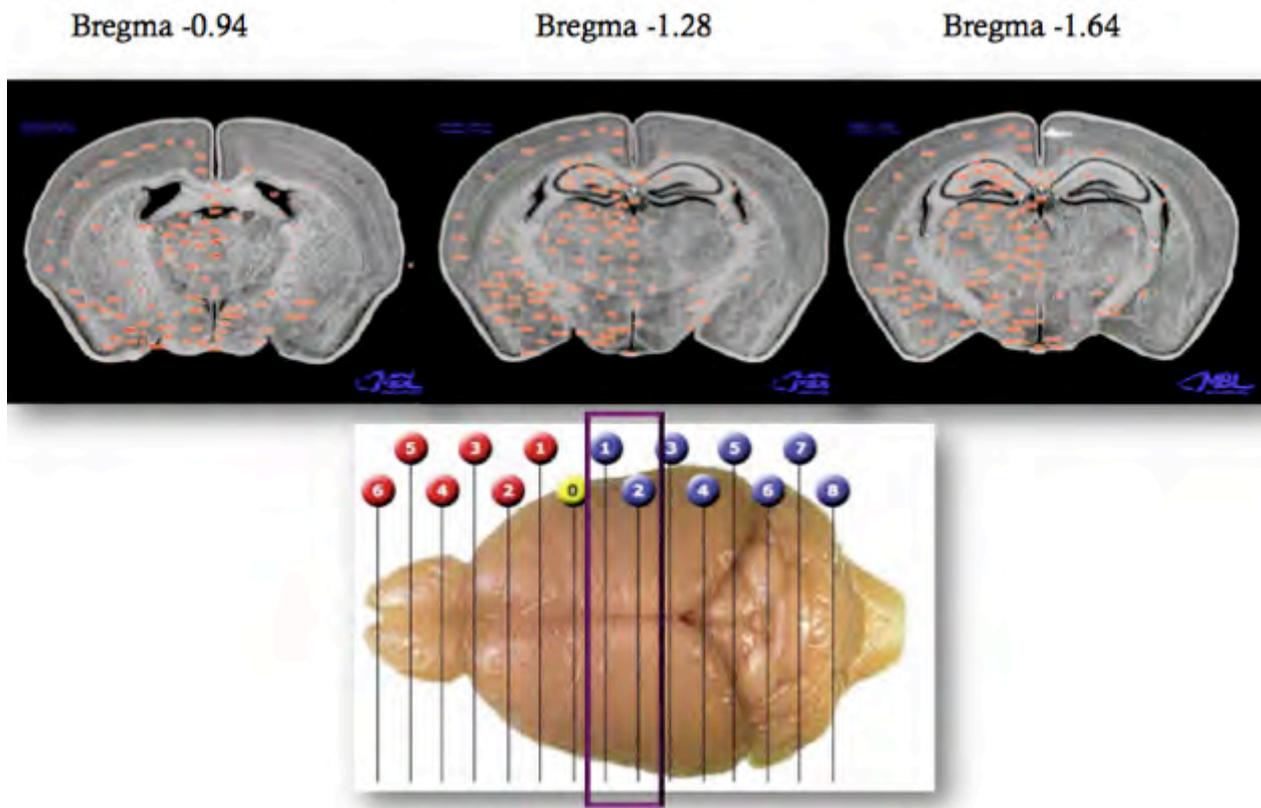


Fig. 11. Región a analizar. Se analizó la corteza cerebral entre las coordenadas Bregma -0.94 y Bregma -1.64

Para determinar la presencia de la 5hmC en neuronas y células gliales y para establecer el efecto del envejecimiento y del desarrollo de la patología tipo Alzheimer sobre los niveles de metilación e hidroximetilación de DNA en la corteza cerebral del ratón, se decidió hacer un análisis comparativo mediante la técnica de inmunofluorescencia y determinar la IR a la 5mC y la 5hmC entre tipos celulares, edades y genotipos.

7. Metodología

7. 1. Ratones silvestres y ratones transgénicos 3xTg-AD

Todos los ratones permanecieron en el vivario de la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular. Los ratones se mantuvieron en cajas acrílicas con filtro en socialización con al menos otro ratón y tuvieron el ciclo luz-oscuridad de 12hr/12hr, siempre con acceso a alimento y agua *ad libitum*.

7. 1. 1. Genotipificación

Para confirmar el genotipo de los ratones 3xTg-AD a utilizar se procedió a realizar su genotipificación (Figura. 12).

Extracción de DNA

Se cortaron 2mm de cola a cada ratón utilizado antes de realizar el sacrificio, posteriormente a cada fragmento de cola se le agregaron 75 µL de reactivo de lisis (NaOH 10 N 250 µl, EDTA 0.5 M 40 µL H₂O c.b.p. 100 mL), y se incubó por 1 hr a 95°C, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente, a esta preparación se le adicionaron 75 µL de reactivo de neutralización (Tris-HCl 40 mM), se mezcló perfectamente con un vortex. Se centrifugó por 30 segundos a 2000 x g. Con el DNA obtenido se realizaron 2 reacciones de PCR, la primera para poder amplificar los transgenes APP y Tau y la segunda para amplificar el gen PS1 (Tabla 1), el fragmento de PS1 se digiere con la enzima BstEII. En los ratones transgénicos se obtienen 2 productos de PCR para los genes APP y Tau, de 500 y 350 pb, en el caso de PS1 en ambos genotipos se obtiene un producto de PCR de 550 pb, éste se digiere BstEII mínimo por 2 horas a 60°C generando en los ratones 3xTg-AD 2 fragmentos de 250 y 300 pb.

Oligonucleótidos	Secuencia	TM (°C)	Tamaño (bases)
5TAU REV	TCCAAAGTTCACCTGATAGT	59	19
APPinternal 5'	GCTTGCACCAGTTCTGGATGG	59	21
Thy12. 4	GAGGTATTCAGTCATGTGCT	59	20
PS1k 13	CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC	62	27
PS1k 15	AGGCAGGAAGATCACGTGTTCCAAGTAC	62	28

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para genotipificar los ratones 3xTg-AD

Reacción PCR	Gen a amplificar	
Reactivos	APP y TAU	PS1
DNA	3 μ l	3 μ l
Coral load	2.5 μ l	2.5 μ l
10mM dNTPs	0.5 μ l	0.5 μ l
Mezcla de primers*	1.5 μ l	1.5 μ l
Taqpol	0.125 μ l	0.25 μ l
H ₂ O	21.875 μ l	21.875 μ l
Volumen Final	28 μl	28 μl

Programa PCR

APP-TAU			PS1		
Temperatura	Tiempo		Temperatura	Tiempo	
94°C	5 min		94°C	5 min	
40°C	30 s		40°C	40 s	
53°C	30 s	X 25	62°C	40 s	X 35
72°C	1 min		72°C	1 min	
72°C	3 min		72°C	3 min	

Digestión PS1

Producto PCR	20 μ l
10xBuffer NEB	3.33 μ l
Bst EII	0.4 μ l
H ₂ O	9.6 μ l
Volumen final	33.33 μl

Imágenes representativas:

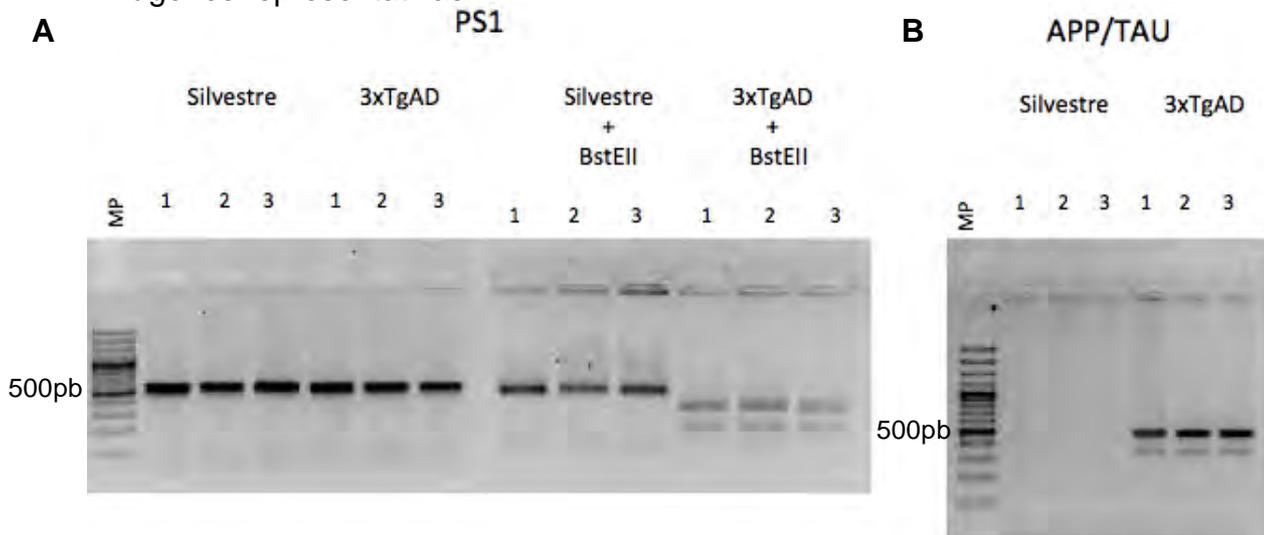


Fig. 12. Imagen representativa de genotipificación PS1 y APP/TAU. A PCR PS1 seguida de digestión BstEII. En los ratones silvestres no se digiere con BstEII la banda correspondiente al fragmento de PS1 cosa que ocurre en los 3xTg-AD. B PCR de los transgenes APP/Tau. Las bandas de APP/Tau únicamente están presentes en los 3xTg-AD. MP: marcador de peso, 3 ejemplos representativos

7. 2. Preparación de muestras de cerebro de ratón para inmunofluorescencia

Los ratones fueron administrados intraperitonealmente con una sobredosis de Pentobarbital (0.1-0.2ml). Una vez anestesiados se perfundieron transcárdicamente con solución salina (NaCl 0.9%) a temperatura ambiente, una vez que se eliminó la sangre del hígado se continuó la perfusión con paraformaldehído (PFA) 4% a 4°C. Posteriormente se disectó el cerebro y se mantuvo una noche en postfijación con PFA al 4%; al finalizar este proceso se deshidrató el cerebro usando un gradiente de sacarosa 10, 20 y 30% en PB 0.1 M. Finalmente se preparó una mezcla de sacarosa 30% y medio de congelación Tissue-Tek 1:1 y se dejó equilibrar el cerebro toda la noche en esta mezcla, al día siguiente se congeló con nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta el momento en que se procesaron simultáneamente los cerebros de cada condición a comparar.

7. 3. Inmunofluorescencias

Los cerebros se llevaron a una temperatura de -20°C y mediante la utilización de un criostato se cortaron coronalmente con un espesor de 8 micrómetros. Se cuidó que en cada laminilla quedara 1 corte de cada condición a comparar (silvestre joven -3 meses-, silvestre viejo -17 meses-, 3xTg-AD joven -3 meses- y 3xTg-AD viejo -17 meses-). Se dejaron secar las laminillas 30 minutos en vacío y 10 minutos en una plancha caliente (50°C). En una jarra Kopplin se lavaron 3 veces por 3 minutos con PBS (0.1 M) y se permeabilizaron con PBS-T (PBS 0.1 M, Tritón-X 0.3 %), una vez transcurridos 10 minutos las laminillas se lavaron 2 veces con PBS y se pusieron a hervir 35 minutos en amortiguador de citratos (Citrato de Sodio 10 mM, Tween 0.05%, pH 6) para desenmascarar antígenos -para desenmascarar el epítipo 5mC en lugar de amortiguador de citratos se usó una solución básica (Tris 10 mM, EDTA 1 mM y Tween 0.05% pH8.5) durante 45 minutos a 95°C. Al finalizar el desenmascarado de antígenos las laminillas se dejaron enfriar hasta llegar a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS y se dejaron bloqueando con solución de bloqueo (Glicina 100 mM en PBS) en cámara húmeda al menos una hora. El mismo día se realizó la incubación con anticuerpo primario en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante toda la noche (Tabla 2). A la mañana siguiente se lavaron 3 veces por 3 minutos con PBS y se dejaron incubar dos horas con anticuerpo secundario (Tabla 2) diluido en PBS, se realizaron 3 lavados más con

PBS de 3 minutos cada uno. Finalmente los cortes se incubaron con el colorante fluorescente DAPI (300 nM en PBS) por 45 segundos, inmediatamente se lavaron 3 veces durante 3 minutos con PBS. Al finalizar se utilizó el medio de montaje para fluorescencia Dako y se selló con barniz. Para verificar la especificidad de los anticuerpos se realizaron controles negativos sin anticuerpo primario (Apéndice 1, Figura 24).

Anticuerpo	Marca	Especie	Dilución
NeuN	Millipore	Ratón	1:300
GFAP	DAKO	Conejo	1:500
Tau HT7	Thermoscientific	Ratón	1:100
Bamyloide (6E10)	Signet	Ratón	1:200
CTCF	Millipore	Conejo	1:100
5hmC	Active Motif	Conejo	1:100
H3 ac	Millipore	Conejo	1:100
H3k18ac	Millipore	Conejo	1:100
5mC	Abdserotec	Ratón	1:50
Alexa Fluor 568-Anti-conejo	Invitrogen	Cabra	1:400
FITC-Anti-ratón	Millipore	Cabra	1:400

Tabla 2. Anticuerpos. Se enlistan los anticuerpos utilizados para las IF, la marca de cada uno de ellos, la especie en que fueron hechos y la concentración utilizada.

7. 3. 1. Análisis de Imágenes

Cada laminilla se analizó en el microscopio confocal Olympus FV1000 de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular. El primer corte a analizar fue el proveniente del ratón silvestre de 3 meses y con éste se definieron los parámetros de la intensidad del láser, apertura confocal (pinhole) y sensibilidad del detector de fotones. Los parámetros se mantuvieron constantes por laminilla para todas las muestras y canales a analizar. Las imágenes de confocal se analizaron en el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A todas las imágenes en los distintos canales se les ajustó el brillo y contraste hasta que el ruido de fondo quedó eliminado, cuidando de mantener siempre las modificaciones iguales en toda la serie. Posteriormente se utilizó la función Measure contenida en el menú Analyze,

asegurándose que el tamaño de la escala se encontrara en pixeles y que todas las imágenes fueran del mismo tamaño. Para obtener el análisis tridimensional es necesario utilizar el complemento “3D Surface Plot” contenido en el menú Analyze. El análisis estadístico se realizó con el programa R “R software” versión 3.0.1 mediante la prueba de Wilcoxon- Mann-Whitney (prueba U), se utilizó una significancia de $p \leq 0.05$.

7. 4. Extracción de DNA genómico

Para este experimento, los animales experimentales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se disecó la región del cerebro deseada, en este caso la corteza cerebral. Se desintegró el tejido mediante la congelación con nitrógeno líquido y la trituración con mortero. Posteriormente el tejido pulverizado se resuspendió en amortiguador de lisis de DNA y se trató toda la noche a 65 °C con 50 µg de RNAsa y 50 µg de Proteinasa K. La purificación se realizó mediante la extracción con Fenol-Cloroformo estándar, brevemente, se agregó 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se mezcló perfectamente y se centrifugó 5 minutos a 1620 x g, se recuperó el sobrenadante y se precipitó adicionándole 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C, se mezcló por inversión y se incubó a -70°C 1 hora, transcurrido ese tiempo se centrifugó a 16200 x g a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante se descartó y se lavó con etanol al 70%, se volvió a centrifugar, se descartó nuevamente el sobrenadante y se resuspendió en agua libre de nucleasas a 65°C por 1 hora.

7. 7. Modificación de DNA por bisulfito de sodio del DNA genómico

Este protocolo se utiliza para poder identificar si una citosina está o no metilada, ya que las citosinas no metiladas son deaminadas a uracilo, por lo tanto al secuenciar el DNA tratado con bisulfito de sodio se obtienen secuencias con timina en lugar de citosina. Para este tipo de análisis se partió de 3 µg DNA genómico purificado de la corteza cerebral de ratón resuspendidos en 18 µl de agua libre de nucleasas. Se prepararon en el momento las soluciones de Hidroquinona 100 mM y de bisulfito de sodio 2 M pH 5 y se mantuvieron protegidas de la luz para evitar su oxidación. Como primer paso se desnaturalizó el DNA a 95°C por 5 minutos, luego se trató con 2 µl de NaOH 3 M a 37°C, se le agregaron 12 µl de hidroquinona 10 mM y 208 µl de bisulfito de sodio y se cubrió con 100 µl de aceite mineral. La reacción se incubó 16 horas a

55°C en oscuridad. Para eliminar el bisulfito de sodio se realizó la purificación del DNA por columna de purificación y se eluye en 30 µl. Para analizar la secuencia modificada es necesario clonarla en un vector, en este caso se utilizó el plásmido pGEM®-T Easy. Para tener la secuencia disponible para clonar se procedió a realizar la amplificación de la misma por PCR.

7. 7. 1. PCR y clonación en plásmido

Para tener la cantidad necesaria para la clonación de los fragmentos de PCR se realizaron 5 reacciones de PCR para cada una de las muestras y genes a comparar, siempre bajo las siguientes condiciones:

Reactivos	APP/ Arc
DNA convertido	3 µl
Buffer 10X	2 µl
10mM dNTPs	0.5 µl
Mezcla de primers	1 µl
HotStart polimerasa	0.1 µl
H₂O	c. b. p. 20 µl
MgCl₂ 25 mM	0.8/ 0.4 µl
Volumen Final	20 µl

APP		Arc		
Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo	
95°C	15 min	95°C	15 min	
95°C	30 s	95°C	30 s	L
60°C	45 s	58°C	30 s	
72°C	45 s	72°C	45 s	X 45
72°C	5 min	72°C	5 min	ciclos

Oligonucleótidos	Secuencia	TM (°C)	Tamaño (bases)	Fragmento (pb)
APPisIBS-F1	GGTAGGGTTGGGTTAGAGT	58	19	579
APPisIBS-R2	CCCAACTTAATTCCCAAACC	58	20	
FwBs5hArc	TTGTAGGATTATATTGGGTTTG	58	22	507
RvBs5hArc	CAACAAAACACATTAATCACTC	58	22	

Se purificó el PCR mediante el kit “High PurePlasmidIsolation Kit” (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con el producto de PCR purificado se realizó la ligación con el plásmido pGem-T-Easy según la recomendaciones del fabricante y se transformó el plásmido en bacterias *E. coli DH5α*, por choque térmico, las bacterias se dejaron recuperar y crecer a 30°C para evitar recombinación de los plásmidos. De cada condición y gen se purificó el DNA de 10 clonas y se secuenció en el High Throughput Genomics Center, Seattle, WA.

8. Resultados y discusión

8. 1. Localización celular de la 5hmC en la corteza cerebral de ratón

Como se mencionó la modificación de la citosina 5hmC está presente de forma abundante en el SNC (Kriaucionis y Heintz, 2009), sin embargo, no en todo el cerebro se han caracterizado de manera específica los tipos celulares en los que se encuentra. Por esto es que el primer punto a estudiar fue en qué tipos celulares de la corteza cerebral del ratón silvestre de 3 meses de edad se localiza mayoritariamente la 5hmC. Para poder determinar esto, se decidió realizar una serie de inmunofluorescencias en cortes de la corteza cerebral de ratones silvestres de 3 meses con un anticuerpo que reconoce a la 5hmC (Figura. 13).

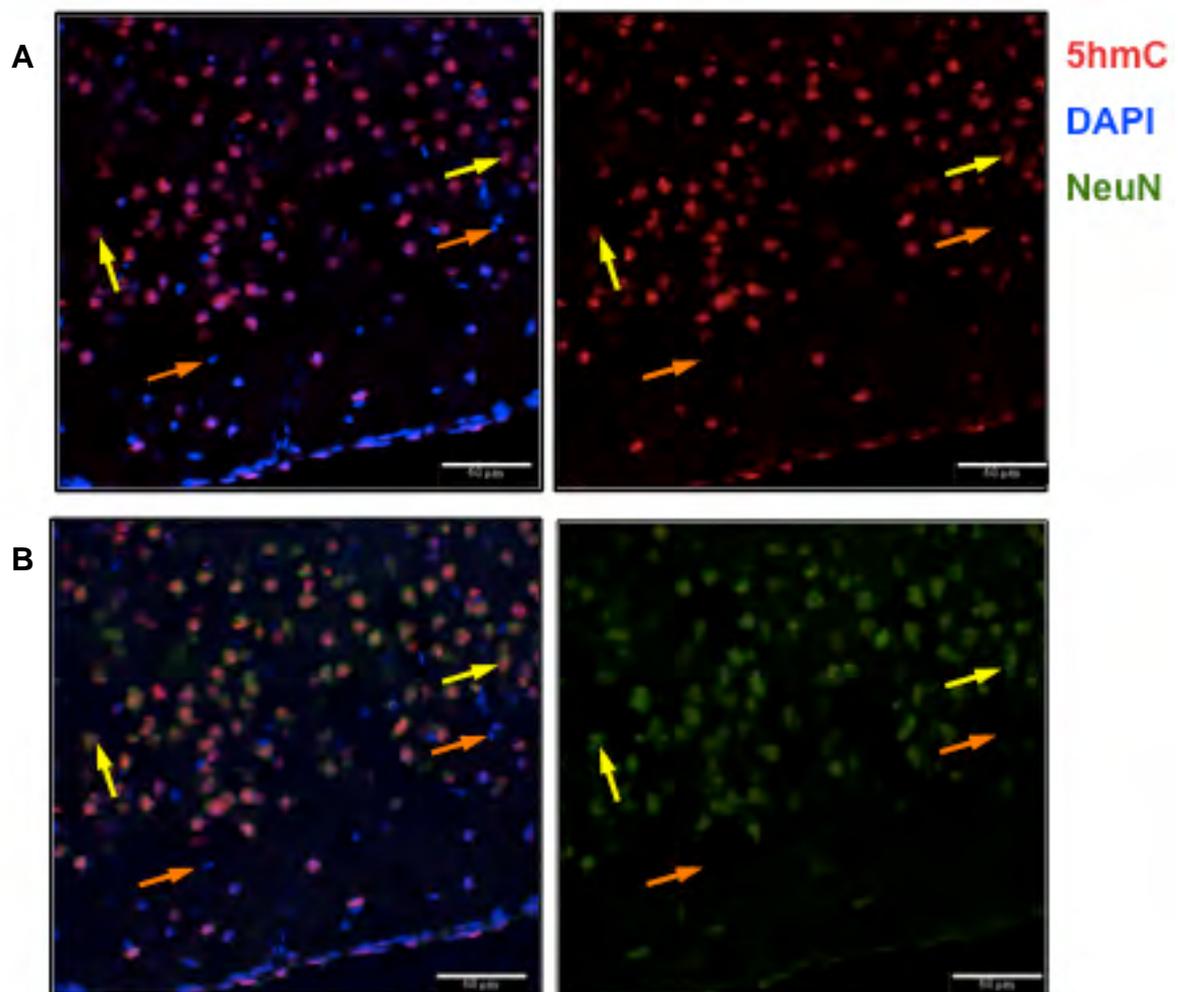


Fig. 13. Distribución celular de la modificación en el DNA 5hmC en cortes de corteza cerebral de ratón. A- Se observa que algunos de los núcleos (Dapi/Azul) son negativos a la 5hmC (rojo), en la imagen se señala con flechas anaranjadas. **B-** Imágenes donde se muestra una inmunofluorescencia doble que marca las neuronas con NeuN (Verde), y la marca de 5hmC en rojo; se puede ver que las células positivas a NeuN son también positivas a la 5hmC (flechas amarillas), mientras que las negativas a NeuN son también negativas a la 5hmC en una alta proporción. Imagen representativa de 3 ratones silvestres de 3 meses. Barra de escala 50 μ m n=3.

El resultado de este experimento mostró que no todos los núcleos tienen IR a la 5hmC (Figura. 13A, flechas anaranjadas) por lo que se decidió analizar si estos núcleos no inmunorreactivos pertenecen a neuronas u otro tipo celular como son las células gliales. Este mismo efecto fue observado en otras regiones del cerebro, como la amígdala, la región CA1 del hipocampo y el giro dentado (Figura 14). Se realizó otra serie de inmunofluorescencias en la corteza, pero en este caso además del anticuerpo anti-5hmC se utilizó el anticuerpo anti-NeuN, que es un marcador neuronal (Figura 13B), para determinar la especificidad de este segundo anticuerpo se realizó una IF doble contra NeuN y el marcador glial GFAP la cual mostró que estas marcas no se encuentran en la misma célula por lo tanto son específicas de neuronas y glia respectivamente (Apéndice 1, figura 25).

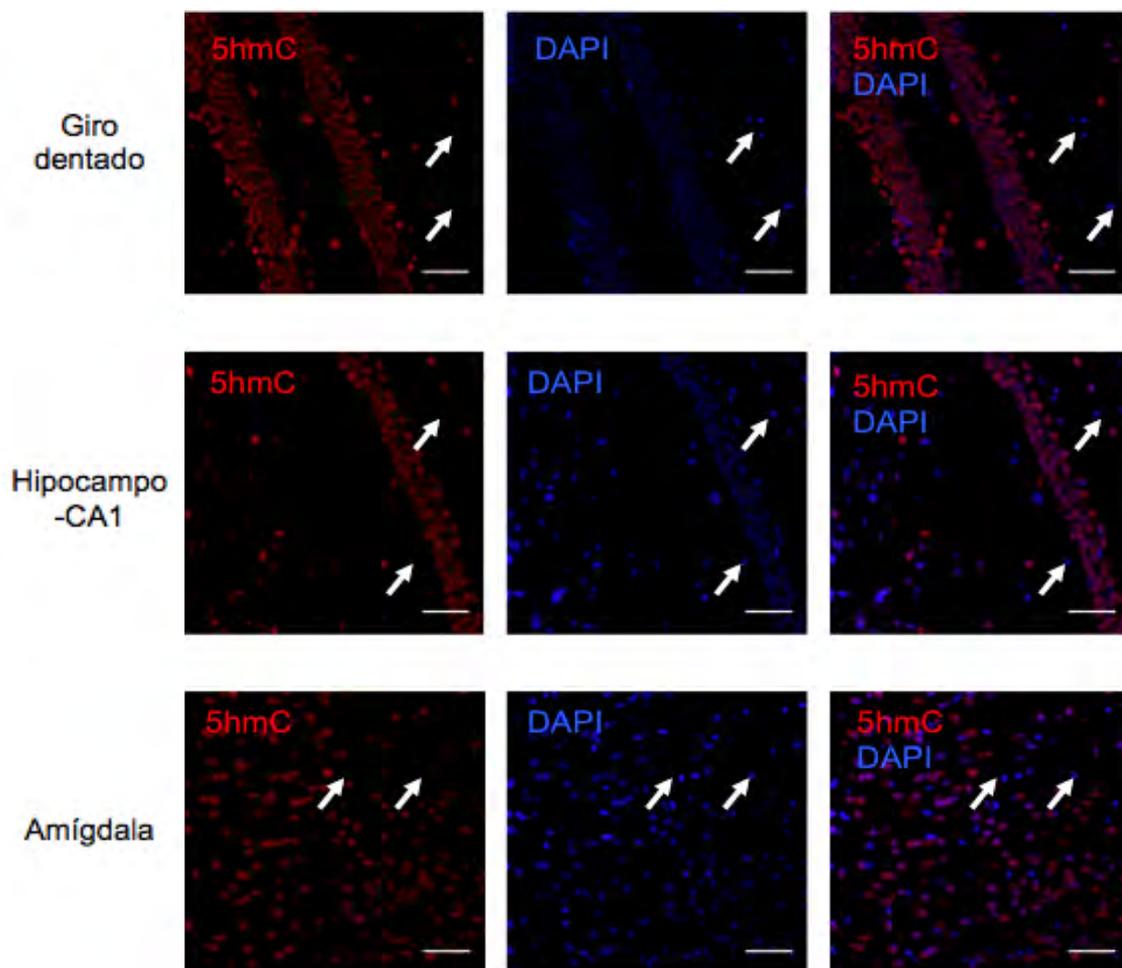


Fig 14. Localización celular de 5hmC en hipocampo y amígdala. Inmunofluorescencia contra 5hmC, esta modificación se encuentra distribuida principalmente en las regiones donde se localizan las neuronas, mientras que en células no neurales se observa en menor proporción. Imagen representativa de 3 ratones silvestres de 3 meses Barra de escala 50 μ m n=3.

Al analizar en detalle los resultados obtenidos determinamos que prácticamente todas las células positivas al marcador neuronal NeuN son también positivas a la 5hmC (Figura. 13B flechas amarillas), mientras que las células negativas a NeuN y con morfología nuclear de menor tamaño no son IR a la 5hmC (Vazdarjanova y Guzowski 2004). Este resultado se reprodujo en más de la mitad de las células negativas al marcador neural NeuN (Figura 13 B; flechas anaranjadas). Este patrón coincide con lo reportado en 2011 en el desarrollo del hipocampo y cerebelo (Szulwach et, al. 2012). En el cerebelo la 5hmC se ha descrito principalmente en sitios transcripcionalmente activos del genoma, los cuales coinciden con zonas de eucromatina (Mellén, et al. 2012). Hay que tomar en cuenta que la eucromatina es más abundante en los núcleos neuronales que en los núcleos de otras células nerviosas como las gliales y que las neuronas tienen un metiloma con mayores variaciones que las células gliales (Iwamoto et. al 2011). Adicionalmente los datos recientes sugieren que la 5hmC es una marca de activación que puede actuar en conjunto con MeCP2 para regular transcripcionalmente genes neurales (Mellén, et al. 2012). Es por esto que los datos obtenidos en este trabajo sumados a lo reportado previamente hacen posible sugerir que la presencia de la 5hmC en las neuronas podría ser parte de dos procesos. Uno el reflejo del proceso activo de desmetilación, el cual podría estar relacionado con los mecanismos de plasticidad neuronal y el segundo ser una marca estable que regule la transcripción en neuronas.

Para determinar si esta modificación a las citosinas podría tener una función específica en las neuronas o si es la consecuencia de tener cromatina más laxa, se decidió analizar una marca de cromatina abierta como la acetilación de la histona H3 y la histona H3K18ac en los mismos ratones previamente analizados, y si bien, hay células negativas a estas marcas la proporción de células negativas es mucho menor que en el caso de la 5hmC (Figura. 15). Este dato podría apoyar la idea de que la 5hmC es una modificación que se localiza en las neuronas con una función específica y no solo como una marca de eucromatina.

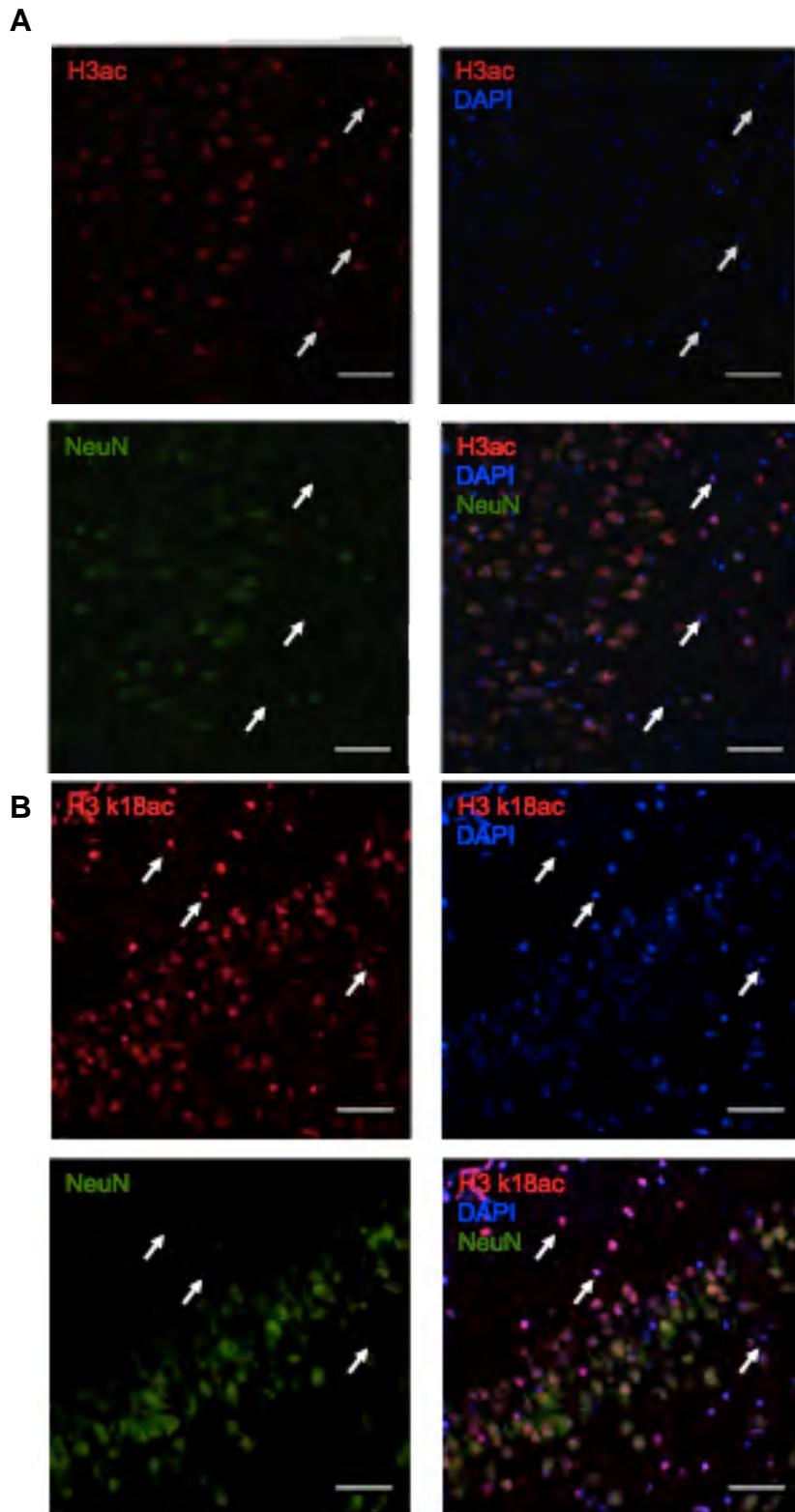


Fig. 15. Localización celular de H3ac y H3K18ac en la corteza cerebral del ratón. Inmunofluorescencia contra H3ac (A) y H3K18ac (B) la imagen muestra que la marca se localiza en el núcleo tanto de células neurales como no-neurales (flechas). Imagen representativa de 3 ratones silvestres de 3 meses Barra de escala 50 μ m n=3.

8. 2. Cantidad relativa y la distribución global de las modificaciones 5mC y 5hmC en la corteza cerebral de ratón

Una vez determinada la localización de la 5hmC en la corteza se procedió a analizar si existían cambios entre las condiciones experimentales previamente establecidas (Silvestre y 3xTg-AD jóvenes y viejos, 3 y 17 meses de edad respectivamente). Mediante la técnica de inmunofluorescencia se analizó la IR a la 5mC y 5hmC en la corteza cerebral en las 4 condiciones arriba mencionadas. De manera inicial se decidió estudiar el efecto del envejecimiento y posteriormente el efecto de los transgenes del ratón 3xTg-AD. Dado que los antecedentes en los que se sustentó este trabajo demuestran que la 5mC disminuye con el envejecimiento y con la EA, decidimos iniciar con esta modificación el estudio.

8. 2. 1. Efecto del envejecimiento en el nivel global de la 5mC

En primer lugar se analizó si el envejecimiento genera cambios en la cantidad y distribución de la 5mC en la corteza cerebral del ratón, para esto se compararon ratones de 3 y 17 meses de edad. Inicialmente se analizó la IR a la 5mC e identificamos que hay un decremento de IR a la 5mC en los cortes de la corteza cerebral de los ratones de 17 meses con respecto a los 3 meses en ambos genotipos (Figura. 16), este resultado correlaciona con lo observado previamente (Heyn, et al. 2012). La pérdida en la IR a la 5mC puede ser por la oxidación de la 5mC a la 5hmC, ya sea que se concluya el proceso completo de desmetilación activa o bien que la marca de 5hmC se acumule. Para determinar esto se realizaron las IF contra la 5hmC.

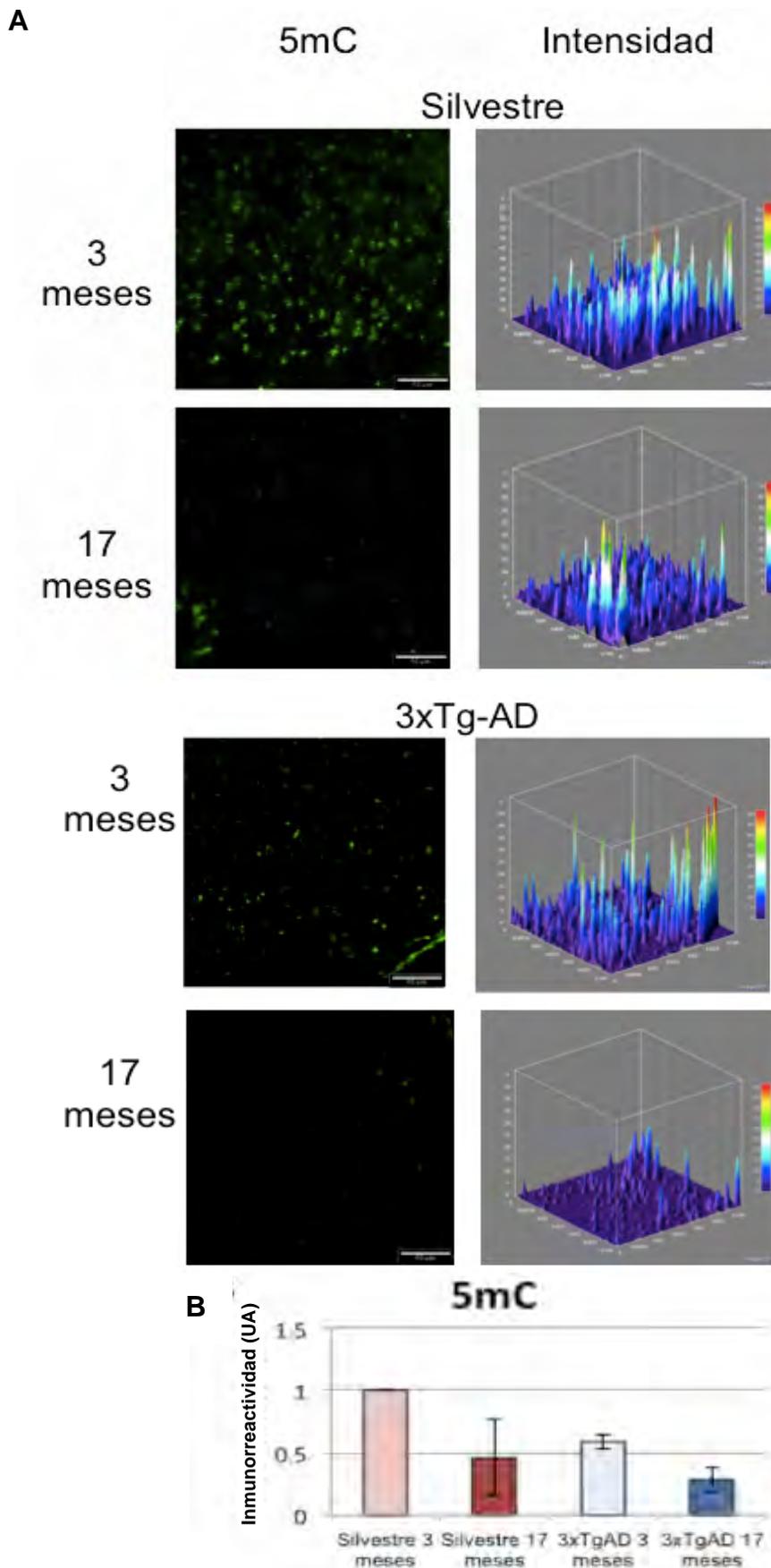


Fig. 16 Disminución en la inmunorreactividad a la 5mC con el envejecimiento y el desarrollo de la patología de Alzheimer. **A-** Imágenes representativas de inmunofluorescencia contra 5mC, seguida de su imagen en 3D de su espectro de intensidad. Se puede observar que la inmunorreactividad a la 5mC es menor en la corteza de ratones de 17 meses comparando con aquellos de 3 meses, este decremento se puede observar desde los 3 meses en ratones 3xTg-AD. **B-** Gráfica de Inmunorreactividad a la 5mC. Se analizaron 3 ratones de cada condición. n=3 Barra de escala 50um. UA- Unidades arbitrarias, 5mC- 5 metil citosina.

8. 2. 2. Efecto del envejecimiento en el nivel global de la 5hmC

Con la finalidad de determinar si la 5mC se está oxidando a 5hmC en la corteza cerebral del ratón se decidió comparar las condiciones previamente analizadas, pero con el anticuerpo primario anti-5hmC. Encontramos que hay cambios con el envejecimiento ya que se puede observar un aumento de IR a la 5hmC en la corteza cerebral de los ratones de 17 meses con respecto a la corteza de ratones de 3 meses, esto tanto en los ratones silvestres como en el modelo 3xTg-AD, siendo más marcado el aumento en la condición 3xTg-AD (Figura 17).

El aumento en IR a la 5hmC coincide con lo descrito previamente en el 2012, ya que se reportó que en el hipocampo de ratón con la edad aumenta la incorporación de 5hmC (Chouliaras, et al. 2012b). Tanto la pérdida de la 5mC como la ganancia de 5hmC concuerdan con lo reportado previamente por Heyn, que describió que con el envejecimiento existe la tendencia a perder la metilación del DNA (Heyn, et al. 2012). Si bien, el incremento de la 5hmC con el envejecimiento podría estar ocurriendo como parte de un proceso activo de desmetilación, también existe la posibilidad de que la 5hmC se acumule y sea parte de un mecanismo de regulación independiente ya que ésta existe de forma estable y abundante en el SNC durante distintas etapas de la vida del individuo. Aún no es posible determinar si el incremento que observamos de 5mC se debe al proceso de desmetilación activa o a la acumulación de la 5hmC, pero el presente trabajo nos permite sugerir al envejecimiento como un modelo de estudio del papel de la 5hmC en el control transcripcional de las células, más específicamente de las neuronas.

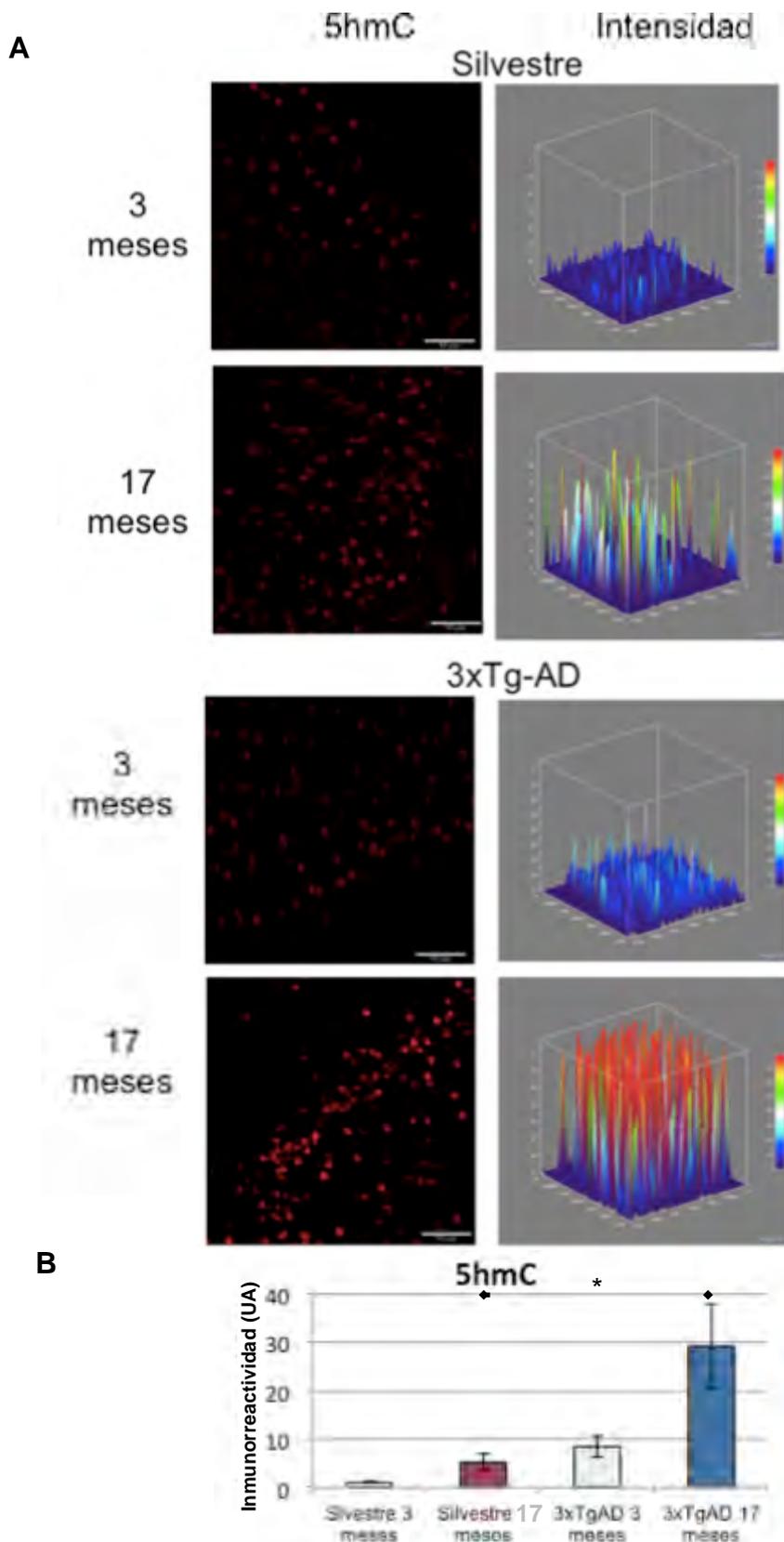


Fig. 17. Aumento en la inmunorreactividad a la 5hmC con el envejecimiento y en la AD. A. Inmunofluorescencia contra 5hmC, seguida de su imagen en 3D de su espectro de intensidad. Se puede observar que la IR a la 5hmC es mayor en la corteza de ratones de 17 meses comparando con aquellos de 3 meses, este aumento se puede observar desde los 3 meses en ratones 3xTg-AD. **B-** Gráfica de Inmunorreactividad a la 5hmC. Se analizaron 3 ratones de cada condición. n=3. Barra de escala 50um. UA- Unidades arbitrarias, 5hmC- 5 hidorimetilcitosina.

8. 2. 3. Efecto de los transgenes del ratón 3xTg-AD en el nivel global de la 5mC y 5hmC

Una vez determinado el efecto del envejecimiento sobre las modificaciones 5mC y 5hmC se procedió a realizar la comparación entre ratones silvestres y transgénicos para poder analizar el efecto del desarrollo de la patología de la EA sobre estas modificaciones. El análisis se realizó a dos edades y se puede observar un decremento en la IR a la 5mC en la condición 3xTg-AD (Figura 16). Por el contrario se encuentra un incremento en la IR a la 5hmC en los ratones 3xTg-AD (Figura 17), este efecto fue observado en ambas edades, lo cual puede ser consecuencia de un evento de envejecimiento prematuro en la condición 3xTg-AD (Figura 16 y 17). Como control adicional se decidió analizar una marca de cromatina abierta como la histona H3 acetilada (H3ac), la cual ya ha sido caracterizada en el envejecimiento como una marca que no sufre modificaciones (Peleg, et al. 2010). En este trabajo los resultados indican que ni el envejecimiento ni la progresión de la patología genera cambios en su IR (Figura 18). Los resultados obtenidos de los cambios en los niveles de 5mC y 5hmC pudieran tener una relación con lo observado en cuanto a la expresión genética en enfermos con la AD y datos reportados previamente por Mastroeni en humanos con esta enfermedad (Cao, et al. 2010; Mastroeni, et al. 2010). Sin embargo es necesario saber si la disminución de la 5mC y el aumento de 5hmC es ocasionado por la expresión de los transgenes y contribución de éstos a la patología. Para abordar la pregunta anterior se analizó en ambos genotipos la corteza cerebral a la edad de 1 mes, edad que corresponde a un periodo prepatológico sin ningún efecto de los transgenes a nivel histológico ni a nivel conductual (Oddo, et al. 2003). Al mes de edad no se encontró ninguna diferencia en la intensidad de la IR a la 5mC y 5hmC (Figura 19), con lo que probamos que las diferencias encontradas previamente son un efecto debido al desarrollo de la patología, que inicia desde etapas tempranas (3 meses), pero no parece ser previo a los primeros daños producidos por la patología. En estudios *postmortem* se ha mostrado que la IR a la marca de 5hmC disminuye en el hipocampo de pacientes con la AD en comparación con la IR del hipocampo de personas sin esta enfermedad y que dicha disminución correlaciona con el avance de la enfermedad (Chouliaras, et al. 2013). En el presente estudio encontramos el efecto contrario en la corteza cerebral, sin embargo hay que tomar en cuenta que este trabajo fue realizado en un modelo murino sin ningún tratamiento farmacológico previo, mientras

que el estudio en humanos pudiera reflejar el efecto de la manipulación farmacológica a la que los pacientes son sometidos durante la vida y particularmente durante la progresión de la enfermedad, este puede ser un motivo por el que se obtienen diferentes resultados en ambos estudios. Además el modelo murino 3xTg-AD es un modelo de la enfermedad de tipo familiar, mientras que en pacientes la enfermedad suele ser del tipo esporádico.

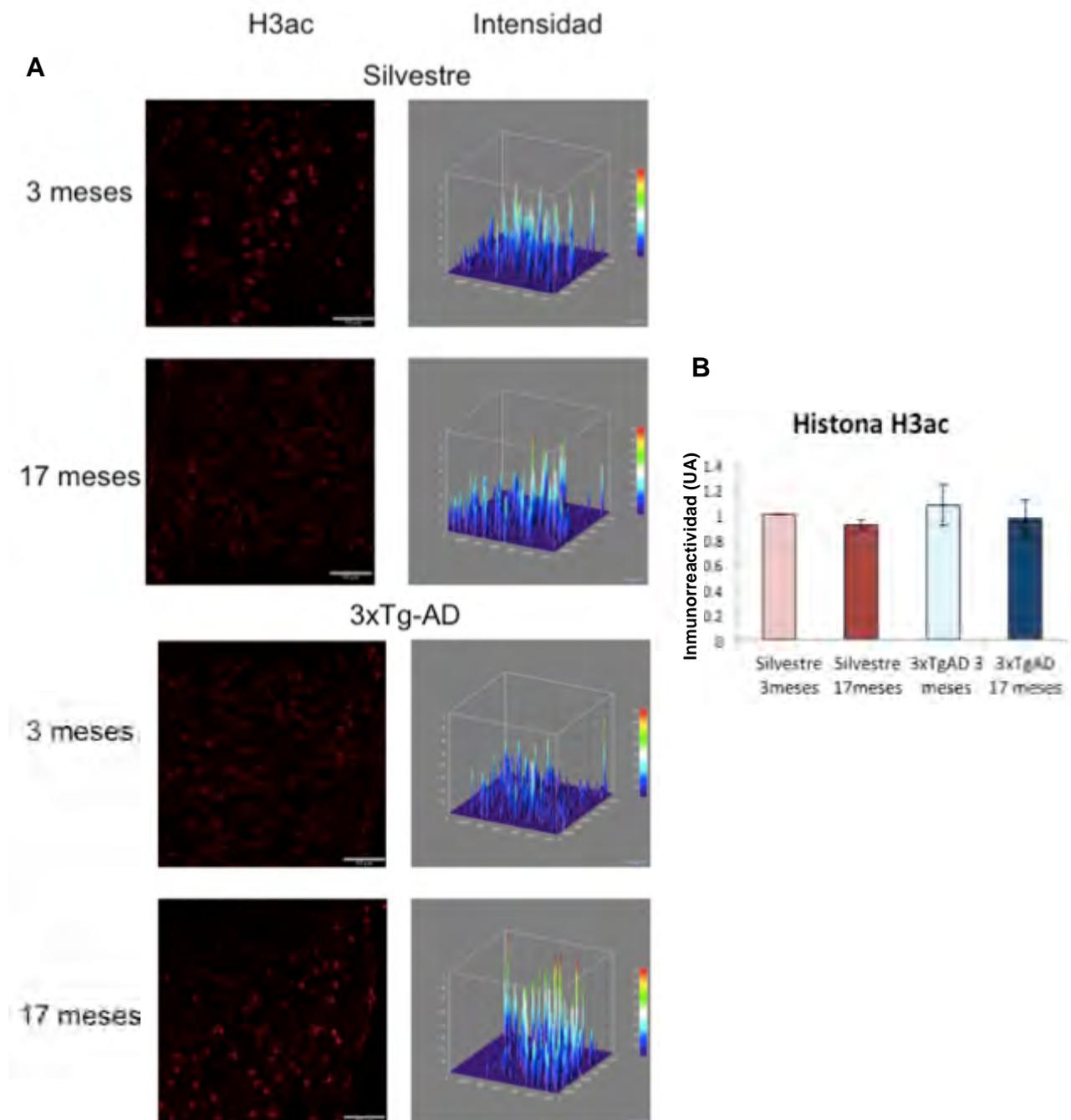


Fig 18. Niveles constantes de la histona H3 acetilada. IF para H3ac, seguida de su imagen en 3D de su espectro de intensidad. Se puede observar que la IR a H3ac es igual en la corteza cerebral de todos los ratones sin importar ni su edad ni genotipo. B Gráfica de inmunorreactividad a H3ac en las distintas edades en el ratón silvestre y 3xTg-AD. Se analizaron 3 ratones de cada condición. Barra de escala 50 μ m n=3. UA- Unidades arbitrarias.

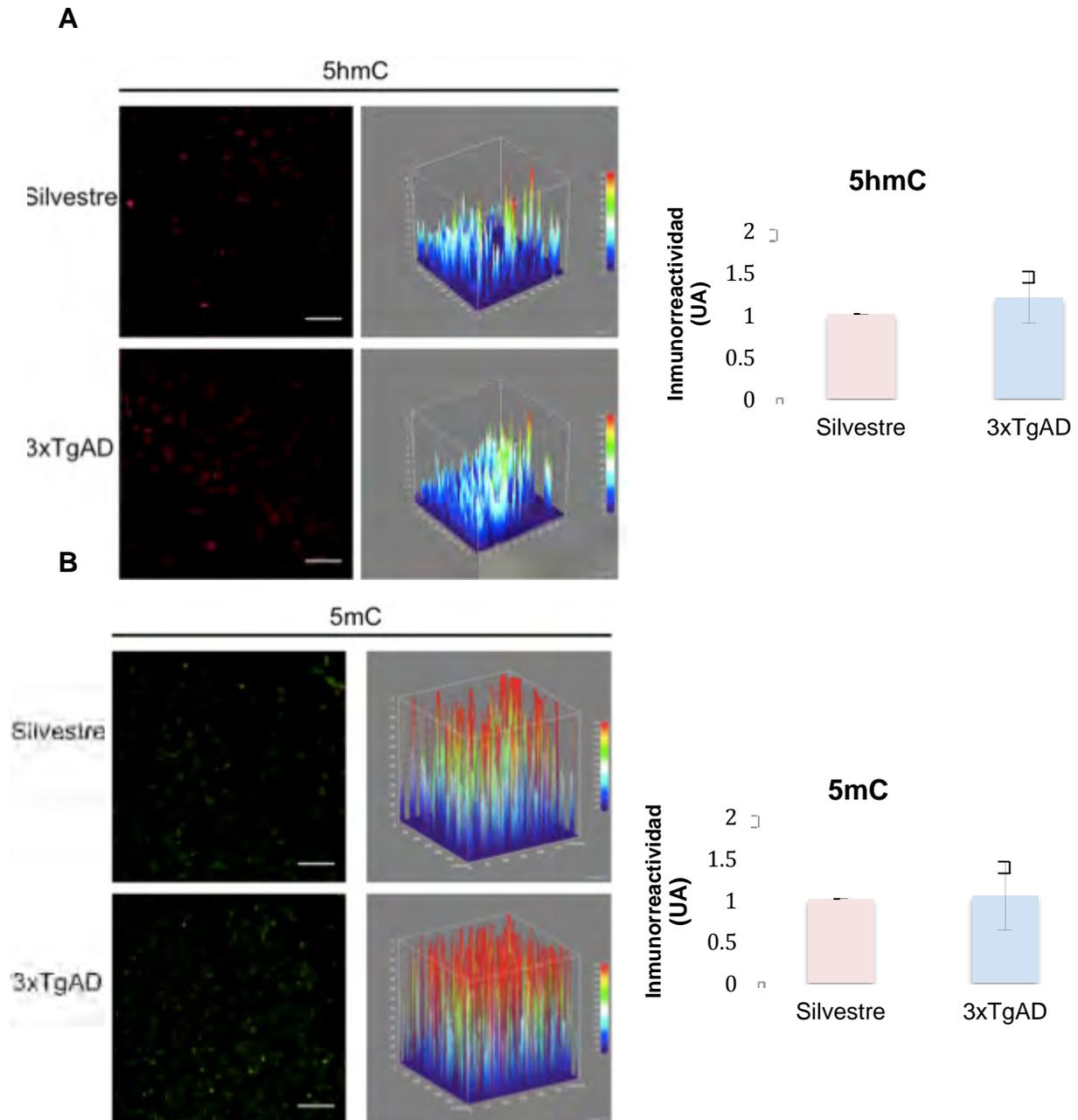


Fig. 19 5hmC y 5mC en la etapa prepatológica de 1 mes de edad. Inmunofluorescencia para 5hmC (A) y 5mC (B), seguida de su imagen en 3D de su espectro de intensidad y gráfica de inmunorreactividad. Se puede observar que la inmunorreactividad a 5mC y 5hmC es igual en la corteza de ratones de 1 mes en ambos genotipos. Se analizaron 3 ratones de cada condición. Barra de escala 50 μ m. Se analizaron 3 ratones de cada condición. n=3. UA- Unidades arbitrarias, 5hmC- 5 hidorimetilcitosina, 5mC- 5 metil citosina.

8. 3. Relación entre la IR a β A y a la 5hmC

Para observar si la acumulación intracelular del β A tiene una correlación con la IR a la 5hmC se realizó una IF doble contra ambas marcas. Se compararon los niveles de IR a la 5hmC en las células positivas a β A y en las negativas a ésta, tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo y la amígdala (Figuras 20 y 21). Se pudo observar que en este modelo no hay una correspondencia a nivel celular entre la acumulación intracelular de β A y la IR a la 5hmC. Lo que podría sugerir que el aumento en la IR a la 5hmC previamente descrito es un efecto generalizado en toda la estructura afectada y no solamente en aquellas células que tienen acumulación intracelular de β A, sin embargo, con el análisis realizado en este trabajo no nos es posible sugerir un mecanismo para los cambios observados.

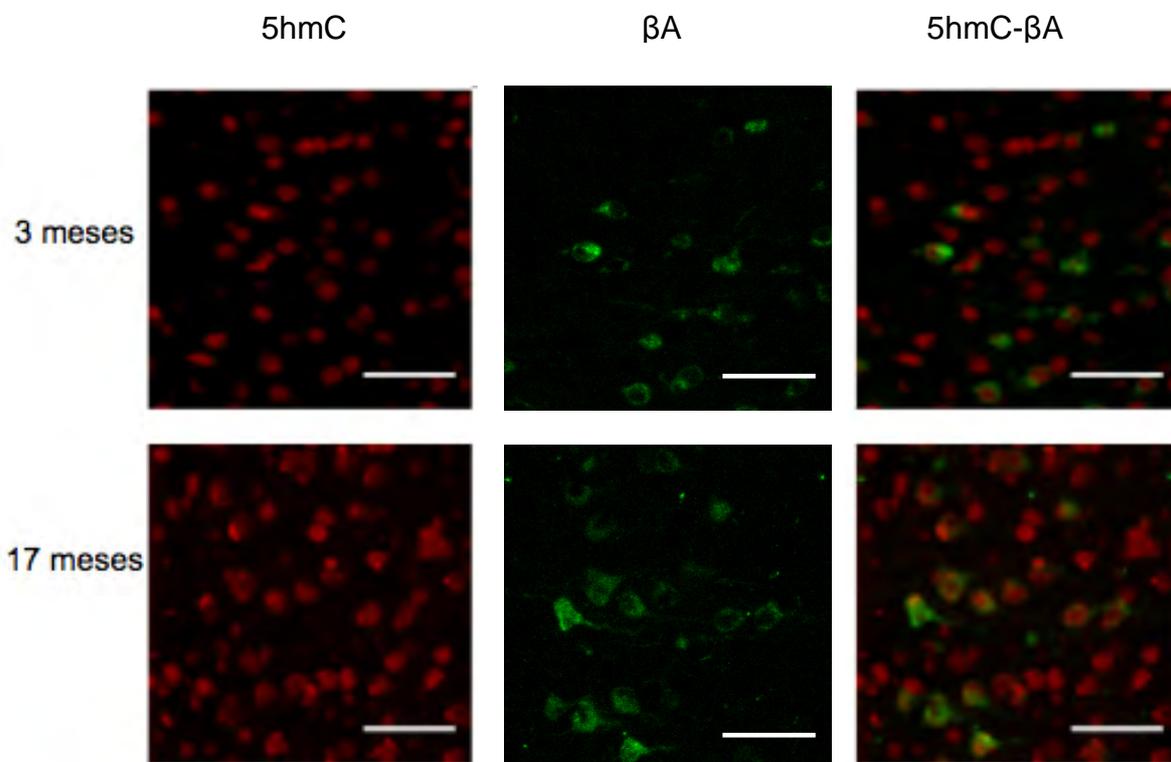


Fig. 20. Relación entre la acumulación de β A y la 5hmC en la corteza cerebral del ratón 3xTg-AD. IF contra 5hmC y contra β A. Se observa que ni a los 3 meses ni a los 17 meses hay una relación entre la acumulación de β A y la IR a la 5hmC. Se analizaron 3 ratones de cada condición. Barra de escala 50 μ m n=3.

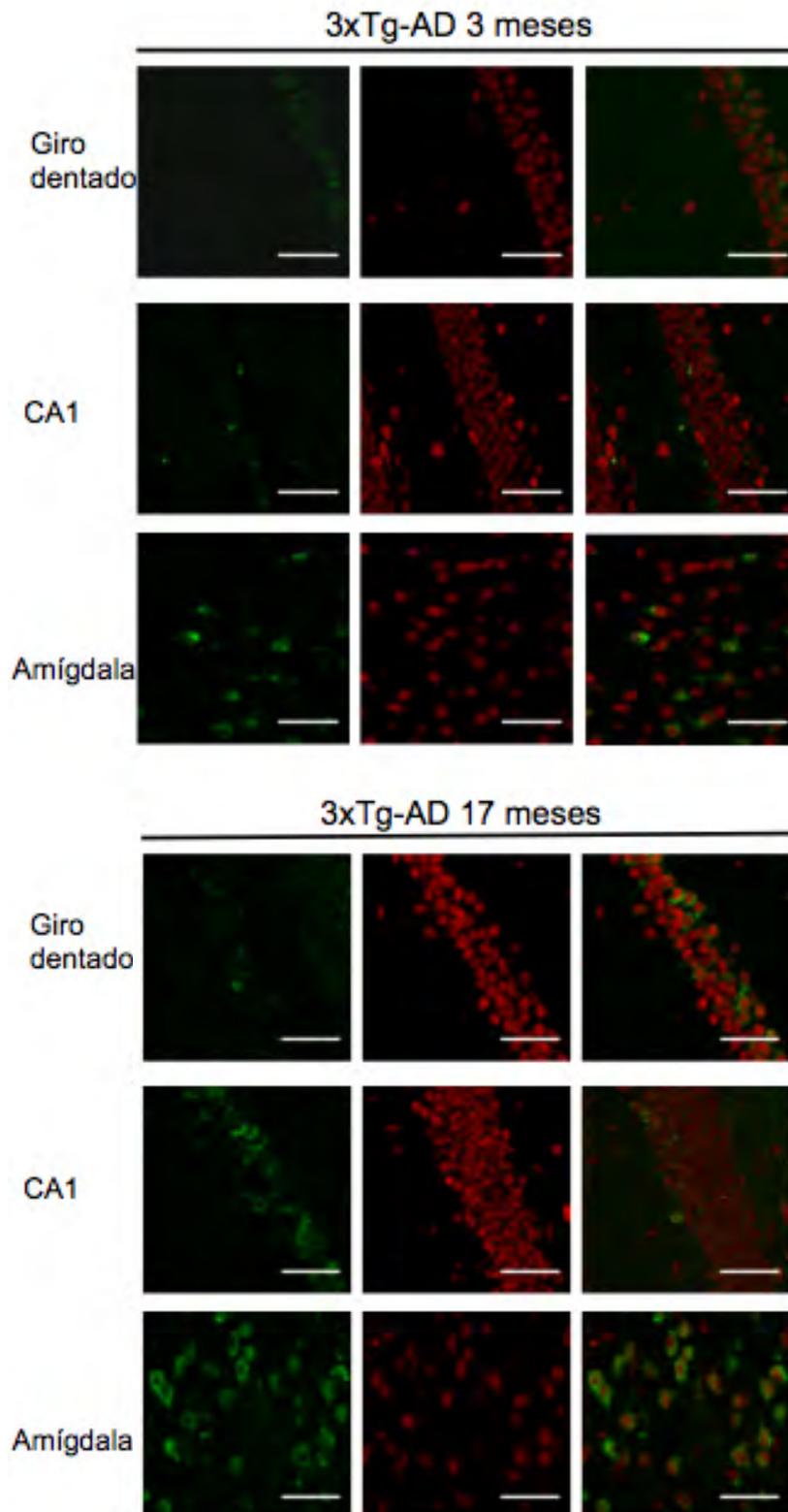


Fig. 21 Relación entre la acumulación de β A y 5hmC en la amígdala e hipocampo. IF contra 5hmC y contra β A. Se observa que ni a los 3 meses ni a los 17 meses hay una correlación entre la acumulación de β A y la IR a la 5hmC en ninguna de las 3 estructuras estudiadas. Se analizaron 3 ratones de cada condición. Barra de escala 50 μ m n=3.

8. 4 Estado de metilación e hidroximetilación de los genes *Arc* y *APP* en el modelo 3xTg-AD

En la segunda parte del trabajo se planteó identificar si se regulan epigenéticamente por metilación de DNA en su región promotora los genes *Arc* y *APP* en el modelo 3xTg-AD durante el envejecimiento, por lo cual decidimos determinar los patrones de metilación a partir de DNA genómico aislado de la corteza cerebral de ratones silvestres y 3xTg-AD a los 3 y 17 meses.

8. 4. 1 Estado de metilación del promotor del gen *Arc*

Se decidió estudiar una fracción de la región promotora del gen *Arc*, (*Arg3.1*) dado que cuenta con una isla CpG y en estudios previos se reportó como enriquecida en 5hmC en el hipocampo durante el envejecimiento (Szulwach, et al. 2011). Por otra parte datos generados en el laboratorio del Dr. Bermúdez sugieren que la expresión de este gen se ve disminuída en el modelo 3xTg-AD (Zamorano-NJ Teajan, 2011). Los resultados obtenidos en la corteza cerebral indican que la región del promotor estudiada no está metilada en ninguna de las condiciones (Figura 22), a pesar de que cambios en metilación de este promotor ya habían sido previamente descritos en el hipocampo de la rata de forma dependiente a la actividad neuronal (Dyrvig, et al. 2012). Existe la posibilidad de que el fenómeno de metilación del DNA en el promotor del gen de *Arc* sea un efecto exclusivo del modelo de rata o bien que se encuentre solamente metilado en la región hipocampal y que el mecanismo de regulación en la corteza sea otro. Un mecanismo alternativo que podría estar dándose en la corteza es la regulación por modificaciones a histonas, en este caso existen antecedentes de regulación mediada por la desacetilasa de histonas HDAC2 (Graff, et al. 2012). Otra posibilidad es que el déficit de *Arc* esté relacionado con la falla en la activación neuronal y no tanto con el silenciamiento de este gen. Para poder esclarecer si los defectos en la expresión del gen *Arc* son debido a alteraciones epigenéticas, proponemos analizar el estado de acetilación de la región promotora de este gen, tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo, de tal forma que sea posible determinar si se regula de manera distinta en diferentes regiones del cerebro.



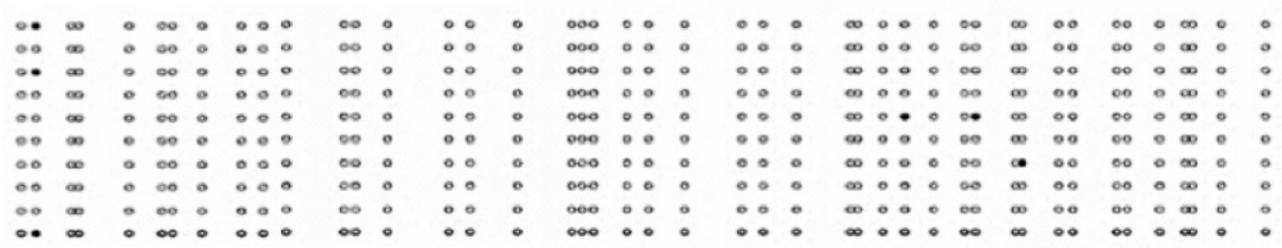
Silvestres 3 meses 1% metilado



Silvestres 17 meses 1.8% metilado



3xTα-AD 3 meses 1.1% metilado



3xTα-AD 17 meses 0.7% metilado



Fig. 22. Estado de metilación del promotor del gen *Arc*. Se puede observar que en todos los casos más del 98% las citosinas se encuentran no modificadas por metilación, las cuales se representan como círculos abiertos, las citosinas metiladas están marcadas como círculos negros.

8. 4. 2 Estado de metilación del promotor del gen *APP*

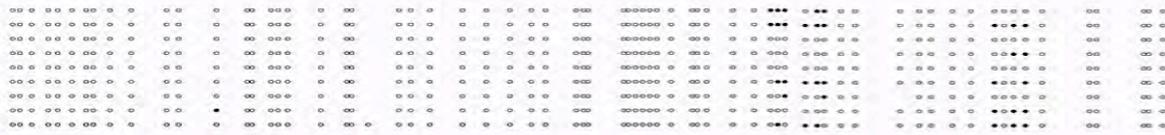
Para analizar si el incremento de IR a la 5hmC que previamente se describió está reflejado en el promotor del gen de *APP* y si este incremento se puede dar como respuesta al daño producido por la progresión de la AD, se decidió analizar un fragmento de la región promotora de *APP*.

De forma general se observó que el promotor no está metilado (Figura 23), sin embargo, una región de 90 pb presenta metilación y se ve interrumpida por 50pb que corresponden a un sitio de enriquecimiento del factor transcripcional CTCF encontrado en precursores neurales y no en células troncales. Este dato es similar al patrón observado para 5hmC en células troncales de ratón, donde se describió que alrededor de los sitios de unión de CTCF hay incremento de la marca de 5hmC (Sun, et al. 2013). También encontramos que esta misma región tiene citosinas presuntamente metiladas en un contexto no-CpG, este tipo de metilación recientemente se reportó en la corteza cerebral de ratón durante el desarrollo adulto del individuo (Lister, et al. 2013). Sin embargo, los niveles de metilación en todas las condiciones es muy similar, por lo que no parece que en la corteza cerebral exista regulación por metilación de DNA de manera diferencial en el envejecimiento ni en la condición 3xTg-AD.

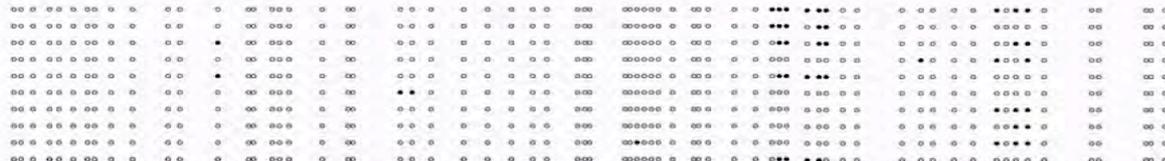
A

Densidad CpG

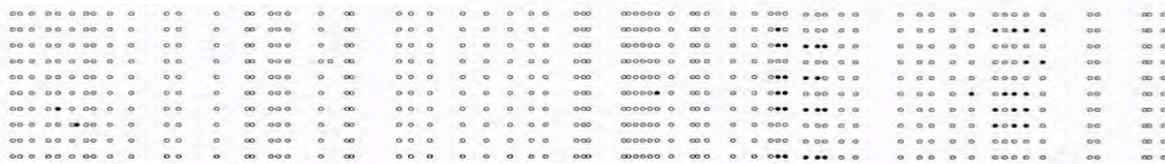
Silvestre 3 meses 5.7 % metilado



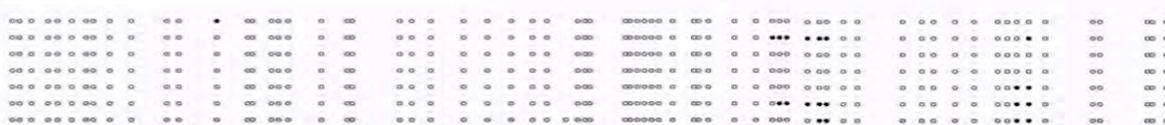
Silvestre 17 meses 6.7 % metilado



3xTg-AD 3 meses 5.4 % metilado



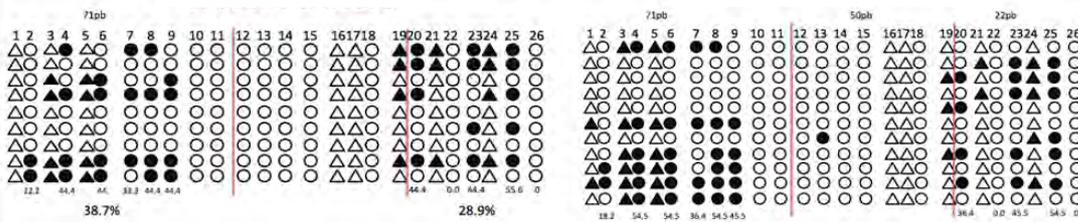
3xTg-AD 17 meses 4.4 % , metilado

**B**

△ CH

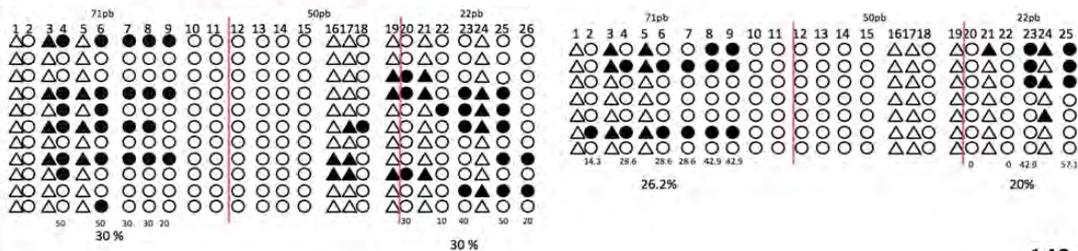
Silvestre 3 meses

Silvestre 17 meses



3xTg-AD 3 meses

3xTg-AD 17 meses



143 pb

Fig. 23. Estado de metilación e hidroximetilación del promotor del gen *APP*. **A** En las 4 condiciones la mayor parte de las citosinas se encuentran no modificadas (círculos claros) **B** hay una región posiblemente metilada que además muestra una región carente de modificaciones a las citosinas y algunas modificadas en contexto no-CpG (triángulos negros).

9. Conclusiones

En la corteza cerebral de ratón la modificación al DNA 5hmC aumenta en el envejecimiento, tanto en los ratones silvestres como en los ratones 3xTg-AD. Se observó también que ésta incremento en los ratones 3xTg-AD con respecto a los silvestres en ambas edades. La 5mC tiene el patrón inverso, ya que con el envejecimiento y en el desarrollo de la patología de Alzheimer ésta disminuye. En este estudio no se vio una relación directa entre el β A acumulado intraneuronalmente y el incremento en 5hmC, si no que en el envejecimiento y la patología de Alzheimer hay aumento en 5hmC generalizado en la corteza cerebral.

En la corteza cerebral de ratón de manera global regiones asociadas a los elementos promotores de los genes de *Arc* y *APP* no muestran ganancia de metilación. Sin embargo, la APP tiene una posible zona de citosinas modificadas, en la región del enriquecimiento reportado para el factor CTCF, esta modificación se conserva en el tiempo y no varía en el modelo 3xTg-AD.

10. Perspectivas

El campo de la neuro-epigenética se encuentra en una etapa muy joven por lo que aún tiene muchas interrogantes. El estudio de las modificaciones a la citosina ha crecido en los últimos años y su estudio en el SNC apenas inicia. En específico el perfil de distribución de la 5hmC ha demostrado que ésta se localiza de manera diferencial en células troncales y en las células nerviosas (Sun, et al. 2013; Mellén, et al. 2012). En el mes de abril de 2013 se describió por primera vez la localización de la marca 5-formil-citosina en células troncales de ratón pero aún se desconoce lo que ocurre en células nerviosas, por lo que es necesario analizar la presencia, distribución y función de esta marca en el SNC (Song, et al. 2013 y Shen, et al. 2013). De la misma manera la 5-carboxi-citosina ha sido poca estudiada y aún no se ha caracterizado su distribución en el genoma.

Este trabajo analizó la distribución histológica global de 5hmC en la corteza cerebral y ayudó a remarcar la importancia que esta modificación tiene al ser predominantemente localizada en neuronas en comparación con otras células nerviosas. Sin embargo, aun es necesario definir si esta modificación está relacionada al funcionamiento de las neuronas, más específicamente con la plasticidad de éstas, ya sea modulando la expresión de genes activos o bien influenciando la expresión de éstos mediante la modulación del estado metilado y desmetilado del DNA. Es por eso que deseamos subrayar la importancia de mapear a alta resolución la localización de la 5hmC en distintas regiones del cerebro, tanto en condiciones basales como con algún estímulo, que puede ser mediante un protocolo de estimulación electroconvulsiva o bien mediante el aprendizaje y memoria de algún paradigma conductual como el laberinto acuático.

Dado que observamos que hay un aumento de IR a la 5hmC en el envejecimiento, proponemos analizar si éste es un aumento generalizado en todo el genoma o si se da en regiones específicas, es decir, regiones reguladoras como enhancers y promotores, en regiones intergénicas o en genes. En el caso de encontrarlo en genes es importante determinar si es en las regiones intrónicas o exónicas y si ésta está relacionada a genes ligados al envejecimiento. Así mismo es importante analizar si este aumento es posible evitarlo mediante una sobre-estimulación, por ejemplo, el entrenamiento prolongado o la exposición a un ambiente enriquecido y poder inferir si de esta manera se pueden revertir los déficits de memoria encontrados en la vejez.

Así mismo en este trabajo se sugiere un efecto del envejecimiento y la AD sobre los niveles de 5hmC contrario al observado en humanos, sin embargo como ya se mencionó en humanos se cuenta con una manipulación farmacológica, por lo que proponemos se analice el efecto de algunos fármacos utilizados para tratamiento de la AD en distintas marcas relacionadas con el control epigenético como la 5hmC, la 5mC y las acetilaciones a las histonas (Chouliaras, et al. 2013).

Finalmente, proponemos que por el aumento en 5hmC, el envejecimiento puede ser un modelo de estudio para la función de la 5hmC como una marca estable en el genoma y un posible regulador transcripcional específico del SNC.

Apéndice 1

Controles experimentales

Controles negativos inmunofluorescencias

Se muestran imágenes representativas de los controles negativos de las IF, en los cuales no se colocó anticuerpo primario.

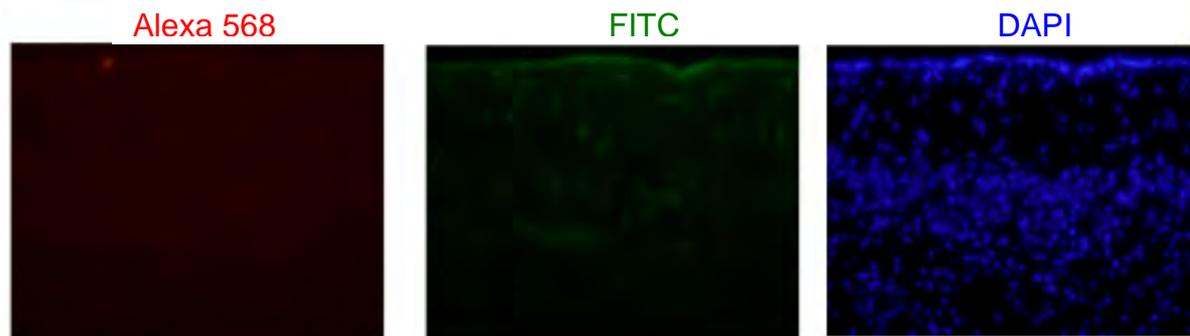


Fig 24. Controles negativos IF. Controles negativos de inmunofluorescencias realizadas únicamente con anticuerpos secundarios.

Localización celular de NeuN y GFAP

Con el fin de probar la especificidad del anticuerpo contra NeuN se realizó un doble marcaje NeuN y GFAP, un marcador de células gliales. Se puede observar que no existe colocalización entre estos dos marcadores y que nunca están presentes ambos en la misma célula.

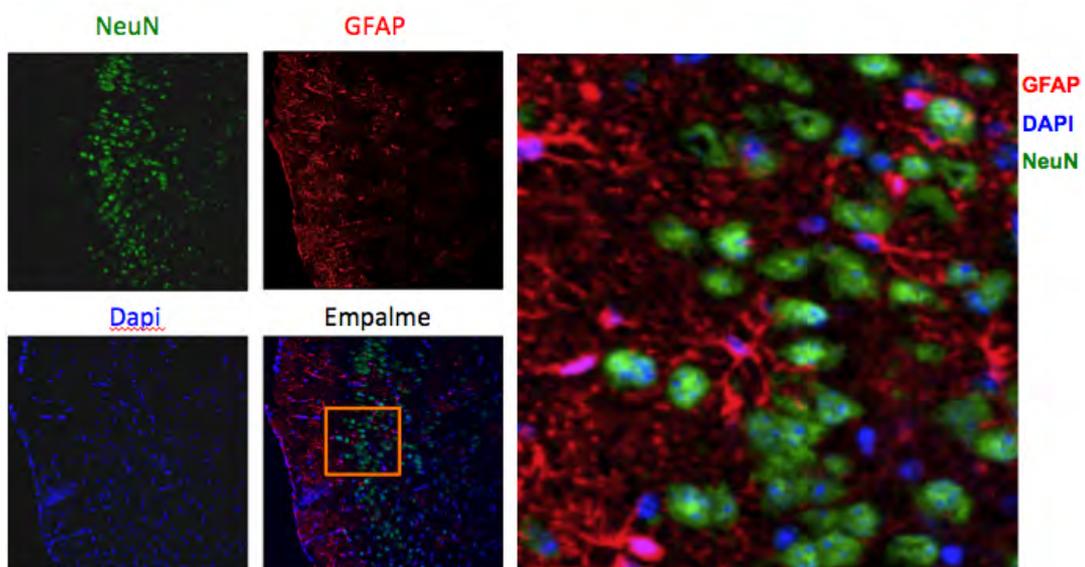


Fig 25. Especificidad del anticuerpo NeuN. Inmunofluorescencia doble contra GFAP y NeuN, se muestra una imagen representativa en la que claramente se puede ver que las células marcadas con NeuN, nunca aparecen marcadas con GFAP.

Apéndice 2.

Comunicación corta

-sometida para publicación.

Age dependent increment of hydroxymethylation in the brain cortex in the triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease.

Carla Cadena-del-Castillo^{a,b}, Christian Valdes-Quezada^a, Francisco Carmona^a, Clorinda Arias^c, Federico Bermúdez-Rattoni^b and Félix Recillas-Targa^{a*}

^aInstituto de Fisiología Celular, ¹Departamentos de Genética Molecular y ^bNeurociencia Cognitiva, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México. ^c Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.

Keywords: Alzheimer's disease; DNA methylation; 5-hydroxymethylcytosine; 3xTg-AD; chromatin.

* Corresponding authors: Félix Recillas-Targa
Instituto de Fisiología Celular
Departamento de Genética Molecular
Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-242
México D.F. 04510
México
Phone: (52 55) 56 22 56 74
FAX: (52 55) 56 22 56 30
Email: frecilla@ifc.unam.mx

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a complex disorder whose etiology is associated with environmental and genetic factors. Recently there have been several attempts to analyze the role of epigenetic alterations in the origin and progression of this neurodegenerative condition. To evaluate the potential participation of the methylation status of the genome that may contribute to AD progression, we have studied the levels and distribution of the 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in different brain regions at different ages. We analyzed and quantified the immunosignal of these two epigenetic marks in young versus old wild-type mice and in the triple-transgenic mouse model of AD (3xTg-AD). The results show a decline in global 5-methylcytosine mark over time in all studied brain regions concomitant with a notorious and widespread increase in 5-hydroxymethylcytosine mark in the aged transgenic mice in contrast to the age-matched controls. These differences in the methylation pattern of brain DNA in the 3xTg-AD that accumulates along age indicates abnormal formation of permissive chromatin structure associated with the increase in AD-related markers.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative condition and the most prevalent cause of dementia at elderly. The disease is characterized by synapse loss and neuronal degeneration causing a progressive decline in memory and other cognitive functions (Ballart et al. 2011). At histopathological level two hallmarks define AD, the abnormal deposition of amyloid- β ($A\beta$) protein and the presence of intraneuronal aggregates of neurofibrillary tangles composed by biochemically modified forms of tau protein. AD is an age-related disorder mostly affecting individuals above the age of 65. Genetic defects leading to the rare early-onset form of AD (EOAD) are present in less than 1% of the individuals, with mutations in the amyloid- β precursor protein (APP) and the presenilin genes *PSEN1* and *PSEN2* (Bird, 2005). In contrast, some studies in the most frequent late-onset - form of AD, that have no clear genetic association, support the participation of alternative events such as aberrant epigenetic patterns acquired progressively with age (Kaminsky et al., 2006; Wang et al., 2008; Mastroeni et al., 2010). Although some gene polymorphisms have been studied in association with sporadic late-onset AD risk, there is no definitive evidence of their role. Thus, the progressive and sporadic nature of the disease, its association with the aging process and the possible involvement of environmental factors, suggest a role of epigenetic modifications in the origins and/or progression of AD.

The vast majority of AD studies in humans are assessed in post-mortem tissue making difficult to analyze the progression of certain molecular and cellular alterations along the disease. Therefore, taking benefit of the triple transgenic model of AD (3xTg-AD) we assessed the distribution of brain epigenetic modifications at an

early stage in which there is not clear evidence of amyloid- β and phospho-tau accumulation and a late stage when these two markers are robustly expressed.

Previous studies have shown that some epigenetic mechanisms such as histone modifications, non-coding RNAs but mainly DNA methylation may participate in AD (Guan et al., 2009; Schonrock and Götz 2012; Irier and Jin 2012). A progressive loss of DNA methylation occurs during aging and seems to be accentuated in AD as well as in other age-related diseases (revised by Iraola-Guzmán et al., 2011). One of the most striking examples of epigenetic modifications is the global hypomethylation found in monozygotic twins discordant for AD, in particular, in neurons of the temporal lobe (Mastroeni et al., 2009). Recently it was uncovered the enzymatic mechanisms of 5-methylcytosine (5mC) modification into 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) by the ten-eleven-translocation (TET) family of enzymes which is one of the intermediates in the active DNA demethylation pathway (Wu and Zhang 2011; Guo et al., 2011). Thus, the DNA content of 5hmC may account for a process leading a long-lasting aberrant gene expression. Consequently, due to these reported decrements in the pattern of DNA methylation in AD we tested the hypothesis that in the brain of the 3xTg-AD there is an increment in the global amount of 5hmC, representing demethylated DNA, in those regions affected for the AD markers.

Therefore, here we analyze the distribution of the 5mC and the 5hmC modifications in different brain regions of the 3xTg-AD and found a preferential neuronal enrichment of 5hmC. We also compared the distribution of these two modifications along age and found a decrease in 5mC global distribution, but most importantly, an increment with age of the 5hmC in the AD transgenic model.

Therefore a correlation is shown between an increase in the immunoreactivity to 5hmC when in aged wild-type and 3xTg-AD transgenic mice are compared.

2. Methods

2.1. Animals

Homozygous 3xTg-AD and wild-type male (strain 129/C57Bl6) mice were used (Oddo et al., 2003a,b). Animals of three ages were analyzed, 1, 3 and 17 month-old of both genotypes. The transgenic mice have been previously characterized (Oddo et al. 2003a,b). The APPB cDNA with the mutation KM670/671NL (Swedish mutation) and the Tau cDNA with the P301L mutation were co-microinjected into single-cell embryos of homozygous PS1 knock-in hybrid 129/C57BL/6 mice. The experiments were performed with the approval of the local animal care committee.

2.2. Genotyping

For DNA extraction HOT SHOT method was used. We perform the lysis of 1 mm of tail heated (95°C, 1 hr) in an alkaline reagent (NaOH 25 mM, 0.2 mM disodium EDTA), after it was neutralized with 1 M Tris-HCl at pH 7.5 buffer. The samples were centrifuged and the supernatant was used immediately for PCR amplification. The primers used for APP-Tau PCR were 5tauRev (5'-TCCAAAGTTCACCTGATAGT-3'), APPinternal (5'-GCTTGCACCAGTTCTGGATGG-3'), and Thy12.4 (5'-GAGGTATTCAGTCATGTGCT-3'). For PS1 amplification, we used PS1-K13 (5'-CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC-3') and PS1-K15 (5'-AGGCAGGAAGATCACGTGTTCCAAGTAC-3') primers and then we digested the PCR fragment with BstEII enzyme (New England Biolabs) for 1 hr at 60°C.

2.3. Immunofluorescence

The mice were sacrificed with the administration of a lethal dose of pentobarbital (>50 mg/kg i.p.) and perfused intracardially with saline solution (0.9%, w/v) at 37°C and cold fixation buffer (4% paraformaldehyde buffer at pH 7.4). The brains were extracted and postfixed overnight in the same fixative solution. Subsequently, sections were dehydrated and cryoprotected with a sucrose gradient in phosphate buffer 0.1 M (10%, 20%, and 30%). Afterwards, the tissue was treated overnight with a solution of 30% sucrose and TissueTek mounting medium (1:1) and fast frozen with liquid nitrogen. Coronal sections of the brain (bregma 0.94-1.64) (8 µm thickness) were cut with a cryostat at -20 °C and recovered on Superfrost plus slides (Electron Microscopy Sciences). Samples from the conditions used for comparisons were always processed on the same day, on the same slide. If the sections weren't used immediately they were stored at -70°C. The sections were processed at room temperature in a moist chamber for single or double immunohistochemical staining. The tissue sections were rinsed for 10 min with PBS-Triton X-100 (0.1 M PBS, 0.3% Triton X-100) and then treated 1 hr at 95°C with Citrate buffer (10 mM Sodium Citrate, 0.05% Tween20 pH 6) or a basic solution for 5mC (10 mM Tris, 1 mM disodium EDTA, 0.05% Tween20 pH 8.5). Once they reached again room temperature they were blocked for 1 hr with Glycine 100 mM and incubated overnight with primary antibodies directed against the following antigens: 5mC (Abdsortec; 1:50), 5hmC (Active Motif; 1:100), H3ac (Millipore; 1:100), NeuN (Millipore; 1:300), A β (6E10- Signet; 1:200), Tau (Ht7 thermoscientific; 1:100). The tissue sections were each rinsed three times for 5 min in PBS 1 M, and then incubated for 2 hrs with the appropriate secondary antibody (Goat Anti-Rabbit

IgG Alexa Fluor® 568 1:400 or Goat anti-mouse-FITC 1:400). Finally, sections were coverslipped with a fluorescence mounting medium (Dako) and examined with a confocal microscope Olympus FV1000. In order to have comparative images the laser intensity, confocal pinhole and sensitivity were kept constant between all the conditions in the same experiment. The images were analyzed in the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) with the “Interactive 3D Surface Plot” plug in and the function measure.

2.4 Statistical analysis

For differences in 5hmC between different mouse strains we conducted a Wilcoxon- Mann-Whitney rank sum test (test U). Statistical significance was set at $p \leq 0.05$ and all calculations were performed using R software version 3.0.1 [15].

3. Results

3.1. The 5-hydroxymethylcytosine is mainly found in neurons of different brain regions.

At the epigenetic level, AD is associated with an enhanced age-dependent loss of DNA methylation in the brain. Therefore, we first examined if this reduced DNA methylation correlates with changes in 5hmC levels in the 3xTg-AD model compared to wild-type. We initially validated the specificity of the antibody against 5hmC by DNA dot-blot using mouse embryonic stem cells genomic DNA as a positive control and plasmidic DNA as a negative control (Supplementary Fig. 1A). We also confirmed 5mC and 5hmC nuclear localization by immunostaining (Supplementary Fig. 1B). Then, we examined the 5hmC immunoreactivity in dentate gyrus and the CA1 region of the hippocampus and the amygdala, in slices from 3-

month-old wild-type animals (Fig. 1A). We observed for the three areas analyzed a uniform staining, that is not detectable in a proportion of cells (Fig. 1A). With the aim to analyze if the 5hmC signal was located preferentially in neurons we performed, in the cerebral cortex, a co-immunostaining with the neuronal nuclei marker NeuN (Fig. 1B). A substantial overlap was detected between 5hmC- and NeuN-positive neuronal cells in the cortex cell layer (Fig. 1B). In contrast, based on cell morphology and the lack of the NeuN marker no-apparent co-localization is found with glia cells. As an additional control, the same experiments were performed using antibodies against poly-acetylated and lysine 18 acetylated histone H3 (H3ac and H3K18ac), respectively, and found a homogeneous signal distribution in both, NeuN⁺ and NeuN⁻ cells (Supplementary Fig. 2). These results are in agreement with previous reports showing the co-localization of 5hmC with mature neuronal cells and its possible involvement in neuronal maturation and cognitive function (Szulwach et al., 2011).

3.2. Age-dependent increment of 5hmC label in the 3xTg-AD

Due to the overall diminishment of DNA methylation in AD and the virtues of a murine model that progressively mimics part of the disease development we asked whether there are differences in 5mC and 5hmC marks distribution when comparing wild-type and 3xTg-AD mice from 3 month and 17 month of age (Fig. 2). This comparative and quantitative analysis was assessed in the cortex region by immunohistochemistry using antibodies against 5mC and 5hmC, respectively. For the 5mC signal we see, as previously reported, a modest decrease in DNA methylation when we compare quantitatively the 5mC immuno-reactivity between 3- and 17-month-old wild-type mice (Fig. 2A). Similar results were obtained when the 5mC signal was analyzed, in identical experimental conditions, in the 3xTg-AD mice

(Fig. 2A). When wild-type mice were quantitatively surveyed for the 5hmC distribution a modest increase in the staining is seen in 17 months old mice (Fig. 2B). In contrast, when 5hmC was analyzed in elder mice (17 month) the quantitation of the staining revealed a notorious increase in 5hmC label signal (Fig. 2B and see graph). This is a life period where the plaques and tangles in the 3xTg-AD mice are clearly established and the AD in this mice model is in its most critical stage condition (Oddo et al. 2003a; see below). To further validate our observation we repeat the same experiments with mice of 1 month of age (Supplementary Fig. 3). No differences were seen in neither the wild-type nor the transgenic mice. That supports our results in the sense that the enhancement in 5hmC immunoreactivity occurs in an advanced life stage. To confirm these experimental differences, in particular, the gain of 5hmC in aged 3xTg-AD mice we performed an immunostaining using an antibody against the acetylated form of histone H3 (Fig. 3). We found no variations in the staining signals in any condition supporting that differences in the 5mC and 5hmC marks are specific.

Together, when young and old-mice are analyzed in the normal versus the transgenic context we found a modest decline in global 5mC fluorescent signal. In contrast, we observe an age-dependent increase in 5hmC fluorescent signal that reflects a diminishment in global levels of DNA hydroxymethylation. One possible interpretation of these results is the formation of a more permissive chromatin structure that facilitates, in the murine AD model, the abnormal activation of gene transcription.

3.3. Accumulation of amyloid- β and 5hmc in older 3xTg-AD

With the aim to correlate the AD phenotype in the 3xTg-AD murine model with the gain in 5hmC mark we looked for a co-localization between the accumulation of amyloid- β and the gain of the 5hmC fluorescent signals. We examined the 5hmC and amyloid- β immunoreactivity in dentate gyrus and the CA1 region of the hippocampus and the amygdala, in slices from 3- and 17-month-old 3xTg-AD animals (Fig. 4A). We observed for the three areas analyzed a uniform staining, that is not detectable in a proportion of cells (Fig. 4A). As described previously we found a progressive accumulation of A β in the brain cortex of the 3xTg-AD mice that is more notorious in elder animals (Fig. 4A). With the aim to analyze if the 5hmC signal was located preferentially in neurons with amyloid- β we performed, in the cerebral cortex, a co-immunostaining (Fig. 4B). The intraneuronal accumulation of A β does not seem to affect the 5hmC distribution and levels. Therefore, one possibility is that 5hmC distribution reveals a context for dysregulation of a broad group of genes, and for some sub-set of cells, these genes predispose the formation of plaque. More detailed analysis is required to prove causal relationship between 5hmC and plaques. This does not discard the effect of gaining 5hmC in the formation of an open chromatin structure that may bring the aberrant transcriptional activation of many genes.

4. Discussion

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder, that is also related with age and the great majority of studies have been performed in post-mortem brain samples. Recent studies revealed that epigenetic factors can also contribute to the disease development. Here we took advantage of one of the best characterized murine model for AD, the 3xTg-AD mice (Oddo et al., 2003a,b; Sanchez-Mut et al., 2013), and asked if during the life span of this mice there are changes in DNA

methylcytosine and DNA hydroxymethylcytosine in different brain tissues. We found that 5hmC is mainly restricted to neurons and, most importantly, its global accumulation is accentuated in elder 3xTg-AD transgenic brain in comparison to healthy mice.

In addition another finding of this study was to observe a slight increase in the 5hmC mark in the old wild-type mice. This increase was similar to the level observed in the young 3xTg-AD that might suggest that the AD transgenic model shows a premature aging phenotype. This is a possibility that requires further investigations.

These results open novel possibilities in terms of the role of the 5hmC gain in AD. Unexpectedly, our data contrast with the one observed in human post-mortem samples in which a decrease in the hippocampal levels of 5mC and 5hmC is found (Chouliaras et al., 2013). In this study no increase in 5hmC levels is seen, including a pair of monozygotic twins discordant for AD. One possible explanation can come from the stage of progression of the disease in humans, since in such stages there is already synaptic defects and neuronal loss that can influence the ratio between 5mC and 5hmC. In the 3xTg-AD mice we were able to analyze two different stages of the disease; at 3 month of age there is no evident accumulation of A β and phospho-tau, in contrast to the 17 months period of time where the accumulation is evident.

The gain of 5hmC in 17 month-old mice may stand for one of the factors associated to the disease. It turns out to be relevant to establish the period of time when such changes begin, in particular, in regulatory elements of genes that we can predict are related to the early stages of the disease. This can be relevant since if we can establish such correlation, the identification of the initial moments in which there is a gain in brain of 5hmC will symbolize an early marker for the disease. This is just one possibility in the context of a complex neurodegenerative disease. For example,

a recent work has shown the gain of DNA methylation in the regulatory region of the thromboxane A2 receptor (Tbxa2r), coagulation factor II receptor-like 2 (F2rl2), sorbin and SH3 domain containing 3 (Sorbs3) and spectrin beta 4 (Spsb4) genes in the brain frontal cortex of the 3xTg-AD mice (Sanchez-Mut et al. 2013). This indicates the necessity to analyze in more detail the regulatory regions of genes where the 5hmC augment, in particular in old 3xTg-AD mice and integrate this data with the hypermethylation of genes to reach more comprehensive view of the affected pathways, at the epigenetic level, in AD.

This last vision is further supported by the recent description of the methyl-CpG-binding protein MeCP2, linked to the Rett syndrome, to the 5hmC and its relationship with accessible chromatin regions that derive in the transcriptional activation of certain genes, repetitive elements and transposons activity (Mellén et al., 2012). Therefore, it is conceivable that the gain of 5hmC seen in elder 3xTg-AD mice induce abnormal epigenetic mechanisms regulating chromatin structure and expression of key genes affecting many brain functions that can be related directly or indirectly to the AD development.

In a genome-wide study an extensive and dynamic methylome-reconfiguration during brain development has been described (Lister et al., 2013). Among several findings the authors suggested that 5hmC is a mark characteristic of developmentally activated regions, that in fetal stages the 5hmC mark is poised at specific genomic regions to facilitate, in a regulated manner, the DNA demethylation of such region in later developmental stages. In addition, the precise location of 5mC and 5hmC marks is highly conserved between individuals and across human and mice genomes (Lister et al., 2013). This observation further agrees with a relevant functional role of the 5mC and 5hmC distribution along the brain cells.

We believe that the relevance of these findings has to do with a sort of equilibrium and specificity of the 5mC and 5hmC in brain cells but mainly their role in early developmental stages. This implies that perturbation of this equilibrium may cause, like in the AD, the imbalance in the expression of genes, in particular those who are involved in age-related and environmental cognitive decline.

Disclosure statement

All authors report no actual or potential conflicts of interest

Acknowledgements

We thank the technical assistance of Georgina Guerrero Avendaño, Fernando Suaste Olmos and Gabriel Orozco Hoyuela. This work was supported by the DGAPA, UNAM (IN209403 and IN203811), and CONACYT (42653-Q and 128464) to FR-T and DGAPA, UNAM (IN209413) and CONACyT (155242) to FB-R. Ph.D. fellowship from CONACyT and Dirección General de Estudios de Posgrado-Universidad Nacional Autónoma de México (DGEP) (Cadena-del-Castilla C, Valdes-Quezada C and Carmona F). Additional support was provided by the PhD Graduate Program, “Doctorado en Ciencias Biomédicas”, to the Instituto de Fisiología Celular and the Universidad Nacional Autónoma de México.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version at

References

- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., Jones, E., 2011. Alzheimer's disease. *Lancet* 377, 1019-1031.
- Bird, T.D., 2005. Genetic factors in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 862-864.
- Chouliaras, L., Mastroeni, D., Delvaux, E., Grover, A., Kenis, G., Hof, P.R., Steinbusch, H.W., Coleman, P.D., Rutten, B.P., van den Hove, D.L. 2013. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging*, 34, 2091-2099.
- Lister, R., Mukamel, E.A., Nery, J.R., Urich, M., Puddifoot, C.A., Johnson, N.D. et al. 2013. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*, 341, 1237905.
- Gotz, J., Ittner, L.M. 2008, Animal models of Alzheimer's disease and fronto-temporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9, 532-544.
- Guan, J.-S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.-H., Joseph, N., Gao, J. et al. 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*, 459, 55-60.
- Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.-L., Song, H. 2011, Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145, 423-434.
- Irier, H.A., Jin, P. 2012, Dynamics of DNA methylation in aging and Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol* 31, S42-8.
- Kaminsky, Z., Wang, S.-C., Petronis, P. 2006, Complex disease, gender and epigenetics. *Ann Med* 38, 530-544.
- Mastroeni, D., McKee, A., Grover, A., Rogers, J., Coleman, P.D. 2009. Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease. *PLoS One*, 4, e6617.
- Mellén, M., Ayala, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., Heintz, N. 2012. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* 151, 1417-1430.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M. 2003a. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39, 409-421.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., Lamerla, F.M. (2003b) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 24, 1063-1070.

Sanchez-Mut, J.V., Aso, E., Panyotis, N., Lott, I., Dierssn, M., Rabano, A., Urduinguio, R.G., Fernandez, A.F., Astudillo, A., Marton-Subero, J.L., Balint, B., Fraga, M.F.m Gomez, A., Gurnot, C., Roux, J.C., Avila, J., Hensch, T.K., Ferrer, I., Esteller, M. 2013. DNA methylation map a mouse and human brain identifies target genes in Alzheimer's disease. *Brain* 136, 3018-3027.

Schonrock, N., Götz, J. 2012. Decoding the non-coding RNAs in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*, 69, 3543-3559.

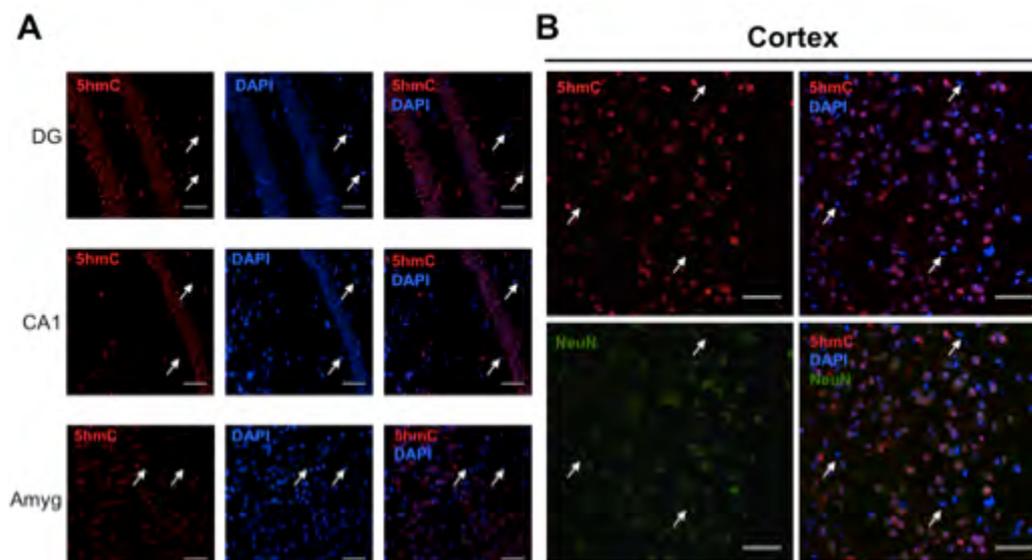
Szulwach, K.E., Li, X., Li.Y., Song, C.-X., Wu, H., Dai, Q., Irier, H., et al. 2011. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosc* 21, 5500-5510.

Valdes-Quezada, C., Arriaga-Canon, C., Fonseca-Guzmán, Y., Guerrero, G., Recillas-Targa, F. 2013. CTCF demarcates chicken embryonic α -globin gene autonomous silencing and contributes to adult stage-specific gene expression. *Epigenetics*, 8, 827-838.

Wang, S.-C., Oelze, B., Schumacher, A. 2008. Age-specific drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One*, 3, e2698.

Wu, H., Zhang, Y. 2011. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev*, 25, 2436-2452.

Figures



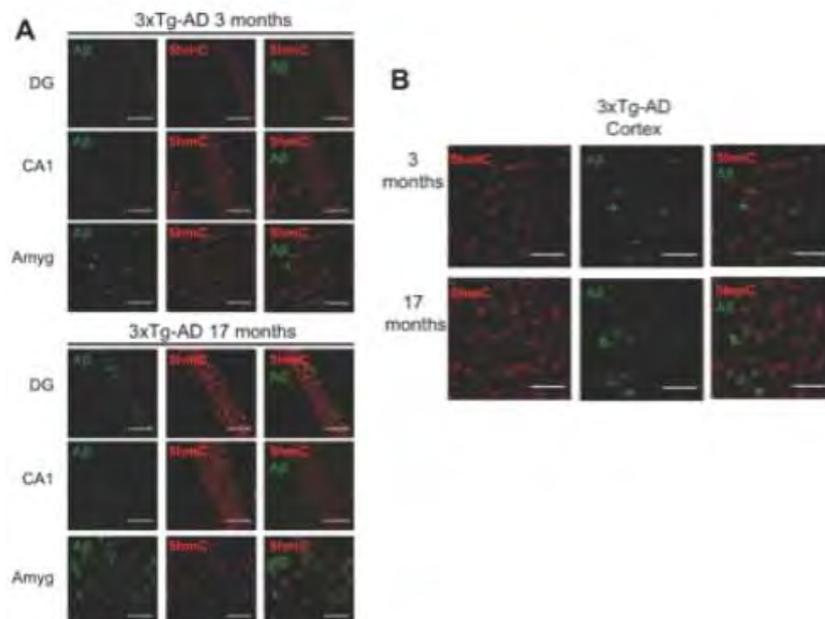
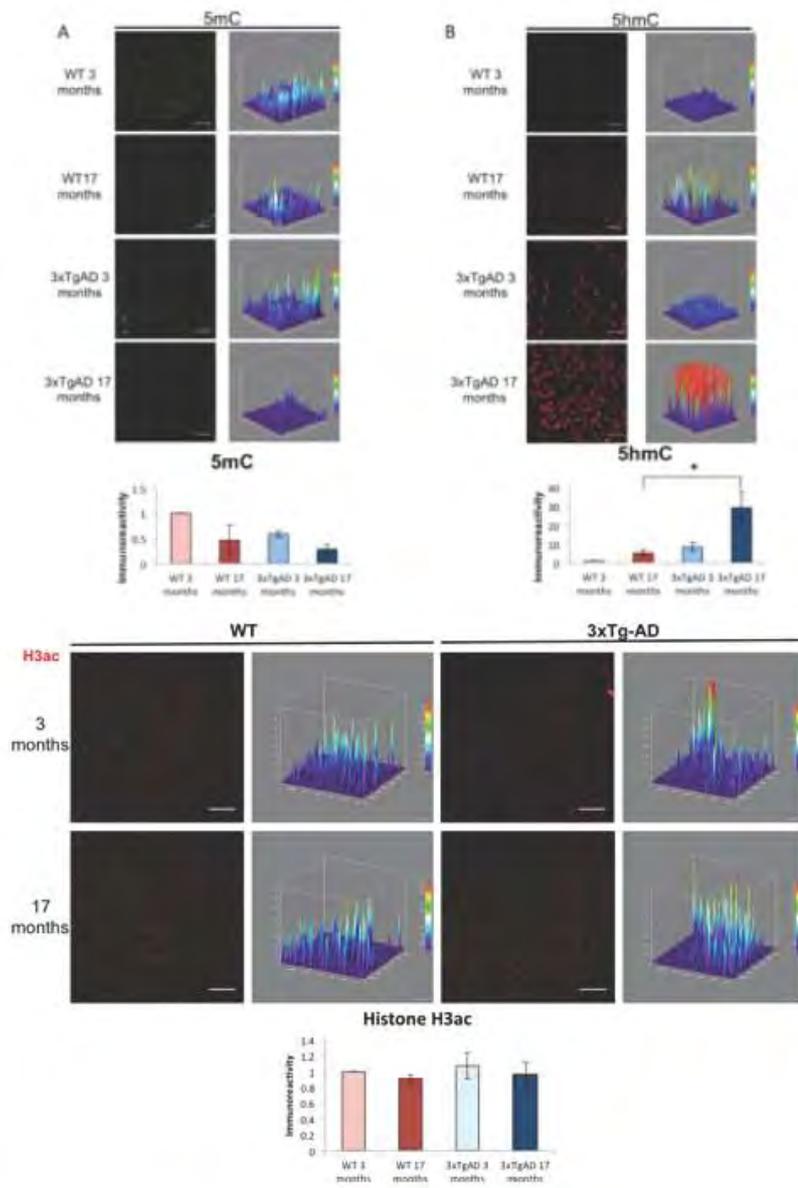


Figure Legends

Fig. 1. The 5hmC is preferentially localized in neurons than in non-neuronal cells in different brain areas. (A) Immunofluorescence of 5hmC in the dentate gyrus (DG), CA1 and amygdala (Amyg), the 5hmC is absent in some cell nuclei, which correspond to non neuronal enriched regions. (B) Immunofluorescence of 5hmC in the cerebral cortex, the 5hmC is present in all the neurons (NeuN+) while in non neuronal cells (NeuN-) the 5hmC is not always present. DG: Dentate Gyrus, Amy: Amygdala. The scale bar represents 50 μm (n=3).

Fig. 2. Change in 5mC and 5hmC level in cerebral cortex from in the 3xTg-AD mice and in ageing. (A) The 5mC decreases in the brain cortex of old mice (17 months) and in the 3xTg-AD condition. The corresponding quantitation of the immunoreactivity is shown in the graph. (B) In the brain cortex the 5hmC increase in the 3xTg-AD mice and in the old (17 months) mice. The corresponding quantitation of the immunoreactivity is shown in the graph and * $p < 0.05$. The scale bar represents 50 μm (n=3).

Fig. 3. H3 acetylation levels are constant during AD-like pathology and ageing in the mouse brain cortex. Immunofluorescence of the 5hmC in the mouse brain cortex, the immunoreactivity is similar in all conditions. The scale bar represents 50 μm (n=3).

Fig. 4. Amyloid- β and 5hmC accumulation in the murine 3xTgAD model. (A) Immunofluorescence of 5hmC in the dentate gyrus (DG), CA1 and amygdale (Amyg), at 3 and 17 month of age. (B) Comparative immunofluorescence of 5hmC in the cerebral cortex. Amyloid- β and 5hmC accumulation in the murine 3xTg-AD model are shown. The A β intracelullar accumulation in the brain cortex does not affect the levels of 5hmC immunoreactivity. The scale bar represents 50 μ m.

Supplementary Figures

Age dependent increment of hydroxymethylation in the brain cortex in the triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease.

Carla Cadena-del-Castillo^{a,b}, Christian Valdes-Quezada^a, Francisco Carmona^a, Clorinda Arias^c, Federico Bermúdez-Rattoni^b and Félix Recillas-Targa^{a*}

^aInstituto de Fisiología Celular, ¹Departamentos de Genética Molecular y ^bNeurociencia Cognitiva, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México. ^c Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.

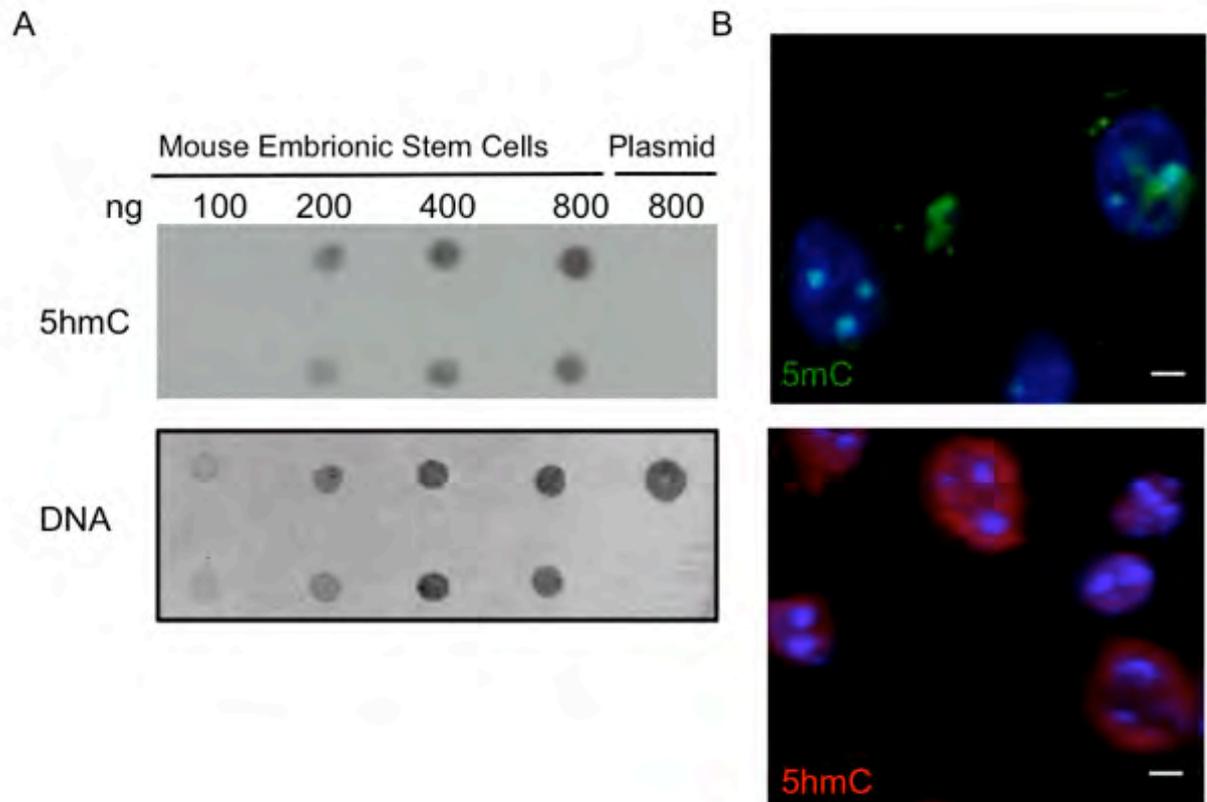


Fig. 1. Dot-blot assay and immunostaining for validation of the 5hmC antibody. (A) The mice were sacrificed by cervical dislocation. Brain cortex was dissected and washed with ice-cold PBS 1M. The tissue was homogenized by freezing it in a mortar with liquid nitrogen. The homogenate was treated in lysis buffer with 50 μ g of RNase and 50 μ g of Proteinase K at 65°C overnight. Then DNA was purified by a standard Phenol-Chloroform procedure. Purified DNA was hybridized onto a DNA hybridization membrane (HybondN+ GE) and then crosslinked using UV light (Valdes-Quezada et al., 2013). The membrane was preincubated with 5% non-fat milk for 1 hr and subsequently incubated overnight with anti-5hmC (ActiveMotif 1:30000) at 4°C. Afterwards, the membrane was rinsed three times with PBS-t (PBS 1 M, Tween20

0.5%) and incubated with a secondary antibody (HRP goat anti-rabbit 1:20000) 2 hrs. Finally the membrane was rinsed three times with PBS-t. Blots were developed with Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corp.). (B) Immunofluorescence of the 5mC and 5hmC in the mouse brain cortex, the immunoreactivity is similar in all conditions. The scale bar represents 50 μ m (n=3).

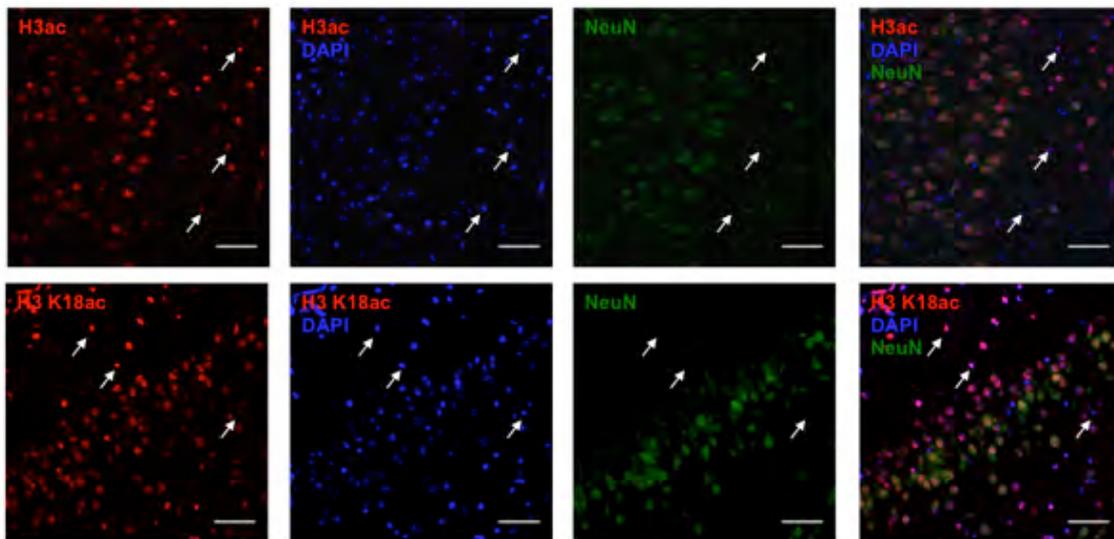


Fig. 2. H3 acetylation levels are constant in the great majority of cells in mouse brain cortex. The scale bar represents 50 μ m (n=3).

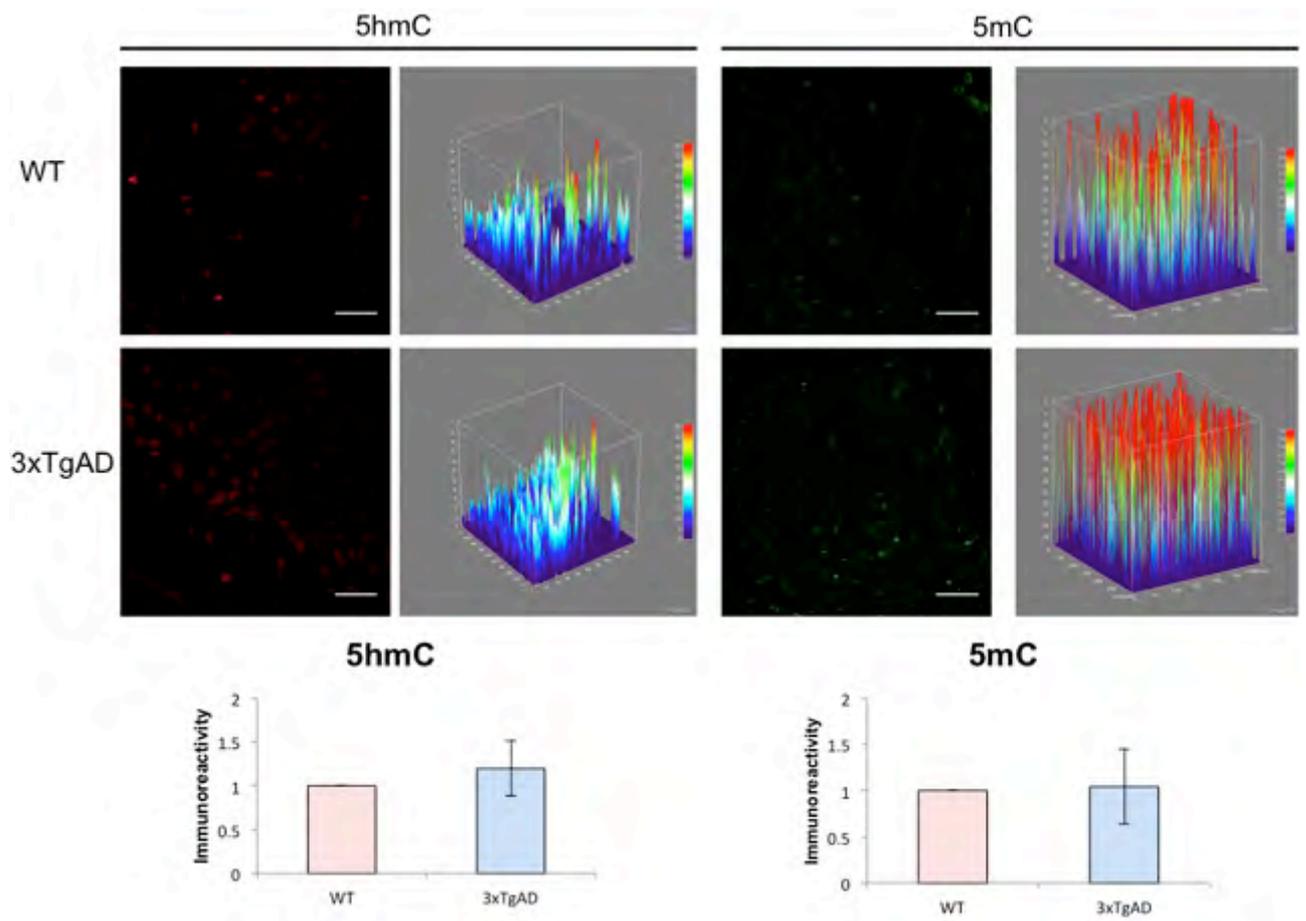


Fig. 3. Comparative quantitation of the 5mC and 5hmC immuno-reactivity with mice of 1 month of age. The corresponding quantitations of the immuno-reactivity are shown in the graphs. The scale bar represents 50 μ m (n=3).

References

- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., Jones, E., 2011. Alzheimer's disease. *Lancet* 377, 1019-1031.
- Bird, T.D., 2005. Genetic factors in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 862-864.
- Chouliaras, L., Mastroeni, D., Delvaux, E., Grover, A., Kenis, G., Hof, P.R., Steinbusch, H.W., Coleman, P.D., Rutten, B.P., van den Hove, D.L. 2013. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging*, 34, 2091-2099.
- Lister, R., Mukamel, E.A., Nery, J.R., Urich, M., Puddifoot, C.A., Johnson, N.D. et al. 2013. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science*, 341, 1237905.
- Gotz, J., Ittner, L.M. 2008, Animal models of Alzheimer's disease and fronto-temporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9, 532-544.
- Guan, J.-S., Haggarty, S.J., Giacometti, E., Dannenberg, J.-H., Joseph, N., Gao, J. et al. 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*, 459, 55-60.
- Guo, J.U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G.-L., Song, H. 2011, Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145, 423-434.
- Irier, H.A., Jin, P. 2012, Dynamics of DNA methylation in aging and Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol* 31, S42-8.
- Kaminsky, Z., Wang, S.-C., Petronis, P. 2006, Complex disease, gender and epigenetics. *Ann Med* 38, 530-544.
- Mastroeni, D., McKee, A., Grover, A., Rogers, J., Coleman, P.D. 2009. Epigenetic differences in cortical neurons from a pair of monozygotic twins discordant for Alzheimer's disease. *PLoS One*, 4, e6617.
- Mellén, M., Ayala, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., Heintz, N. 2012. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* 151, 1417-1430.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M. 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39, 409-421.
- Sanchez-Mut, J.V., Aso, E., Panyotis, N., Lott, I., Dierssn, M., Rabano, A., Urdinguio, R.G., Fernandez, A.F., Astudillo, A., Marton-Subero, J.L., Balint, B., Fraga, M.F.m Gomez, A., Gurnot, C., Roux, J.C., Avila, J., Hensch, T.K., Ferrer, I., Esteller, M.

2013.. DNA methylation map a mouse and human brain identifies target genes in Alzheimer's disease. *Brain* 136, 3018-3027.

Schonrock, N., Götz, J. 2012. Decoding the non-coding RNAs in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*, 69, 3543-3559.

Szulwach, K.E., Li, X., Li.Y., Song, C.-X., Wu, H., Dai, Q., Irier, H., et al. 2011. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosc* 21, 5500-5510.

Valdes-Quezada, C., Arriaga-Canon, C., Fonseca-Guzmán, Y., Guerrero, G., Recillas-Targa, F. 2013. CTCF demarcates chicken embryonic α -globin gene autonomous silencing and contributes to adult stage-specific gene expression. *Epigenetics*, 8, 827-838.

Wang, S.-C., Oelze, B., Schumacher, A. 2008. Age-specific drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One*, 3, e2698.

Wu, H., Zhang, Y. 2011. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev*, 25, 2436-2452.

Figure Legends

Fig. 1. The 5hmC is preferentially localized in neurons than in non-neuronal cells in different brain areas. (A) Immunofluorescence of 5hmC in the dentate gyrus (DG), CA1 and amygdala (Amyg), the 5hmC is absent in some cell nuclei, which correspond to non neuronal enriched regions. (B) Immunofluorescence of 5hmC in the cerebral cortex, the 5hmC is present in all the neurons (NeuN+) while in non neuronal cells (NeuN-) the 5hmC is not always present. DG: Dentate Gyrus, Amy: Amygdala. The scale bar represents 50 μm (n=3).

Fig. 2. Change in 5mC and 5hmC level in cerebral cortex from in the 3xTg-AD mice and in ageing. (A) The 5mC decreases in the brain cortex of old mice (17 months) and in the 3xTg-AD condition. (B) In the brain cortex the 5hmC increase in the 3xTg-AD mice and in the old (17 months) mice. The scale bar represents 50 μm (n=3).

Fig. 3. H3 acetylation levels are constant during AD-like pathology and ageing in the mouse brain cortex. Immunofluorescence of the 5hmC in the mouse brain cortex, the immunoreactivity is similar in all conditions. The scale bar represents 50 μm (n=3).

Fig. 4. Amyloid- β and 5hmC accumulation in the murine 3xTgAD model. Amyloid- β and 5hmC accumulation in the murine 3xTg-AD model. The A β intracellular accumulation in the brain cortex does not correlate with the 5hmC immunoreactivity. The scale bar represents 50 μm .

Bibliografía

- Alagiakrishnan, et al. 2012. Genetics and epigenetics of Alzheimer's disease. *Postgrad Med J.* 88: 522-529
- Berchtold, et al. 2008. Gene expression changes in the course of normal brain aging are sexually dimorphic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105: 15605-15610.
- Calahorra y Ruiz-Rubio 2011. *Caenorhabditiselegans* as an experimental tool for the study of complex neurological diseases: Parkinson's disease, Alzheimer's disease and autism spectrum disorder. *Inv Neurosci* 11: 73-83
- Cao, et al. 2010. Age-Related Gene Expression in Normal and Neurodegenerative Human Brain Tissues. *PLoS One* 5: e13098
- Carter, et al. 2010. The Development of New Therapeutics for Alzheimer's Disease. *Clin Pharmacol Ther.* 88: 475-486
- Chen, et al. 2009. The epigenetic effects of amyloid- β 1–40 on global DNA and neprilysin genes in murine cerebral endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 378: 57-61.
- Chouliaras, et al. 2011. Caloric restriction attenuates age-related changes of DNA methyltransferase 3a in mouse hippocampus. *Brain Behav Immun* 25: 616-623.
- Chouliaras, et al. 2012. Prevention of age-related changes in hippocampal levels of 5-methylcytosine by caloric restriction. *Neurobiol Aging.* 33: 1672-1681.
- Chouliaras, et al. 2012(b). Age-related increase in levels of 5-hydroxymethylcytosine in mouse hippocampus is prevented by caloric restriction. *Curr Alzheimer Res* 9: 536-544.
- Chouliaras, et al. 2013. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 34: 2091-9
- Chowdhury, et al. 2006. Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron,* 52: 445-459.
- Cirrito, et al. 2005. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* 48: 913-922.
- Corrigan, et al. 2012. Characterisation of the effect of knockout of the amyloid precursor protein on outcome following mild traumatic brain injury. *Brain Res* 1451: 87-99.
- Cortellino, et al. 2011. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* 146: 67-79
- Dahl, et al. 2011. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clin Chim Acta* 412: 831-836.
- Day Sweatt. 2010. Cognitive neuroepigenetics: A role for epigenetic mechanisms in learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 96: 2-12
- Denis, et al. 2011. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep* 12: 647-656.
- Duyckaerts, et al. 2008. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol Commun* 115: 5-38
- Dyrvig, et al. 2012. Epigenetic regulation of Arc and c-Fos in the hippocampus after acute electroconvulsive stimulation in the rat. *Brain Res Bull* 88: 507-513
- Felsenfeld y Groudine 2003. Controlling the double helix. *Nature* 421: 448-453
- Förstl y Kurz 1999. Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry ClinNeurosci* 249: 288-290.

- Fraga, et al. 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102: 10604-10609.
- Fritz. yPapavasiliou. 2010. Cytidinedeaminases: AIDing DNA demethylation? *Genes Dev* 24: 2107-2114.
- Fuso, et al. 2011. DNA methylase and demethylase activities are modulated by one-carbon metabolism in Alzheimer's disease models. *J Nutr Biochem* 22: 242-251.
- Fuso, et al. 2008 a. B-vitamin deprivation induces hyperhomocysteinemia and brain S-adenosylhomocysteine, depletes brain S-adenosylmethionine, and enhances PS1 and BACE expression and amyloid-beta deposition in mice. *Mol Cell Neurosci* 37: 731-746.
- Fuso, et al. 2011 b. Changes in Presenilin 1 gene methylation pattern in diet-induced B vitamin deficiency. *Neurobiol Aging* 32: 187-199.
- Fuso. et al. 2005. S-adenosylmethionine/homocysteine cycle alterations modify DNA methylation status with consequent deregulation of PS1 and BACE and beta-amyloid production. *Mol Cell Neurosci* 28: 195-204.
- GoedertySpillantini. 2006. A Century of Alzheimer's Disease. *Science* 314: 777-781
- Graff, et al. 2012. An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature* 483: 222-226.
- Green, et al. 2008. Nicotinamide Restores Cognition in Alzheimer's Disease Transgenic Mice via a Mechanism Involving Sirtuin Inhibition and Selective Reduction of Thr231-Phosphotau. *J. Neurosci* 28: 11500-11510.
- Guan, et al. 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459: 55-60.
- Guo, et al. 2011. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nature Neurosci* 14: 1345-1351.
- Guo, et al. 1999. Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice. *Nature Medicine* 5: 101-6.
- Guo. et al. 2011. Hydroxylation of 5-Methylcytosine by TET1 Promotes Active DNA Demethylation in the Adult Brain. *Cell* 145: 423-434.
- Gupta, et al. 2010. Histone Methylation Regulates Memory Formation. *J. Neurosci* 30: 3589-3599.
- Götz, et al. 2006. Do axonal defects in tau and amyloid precursor protein transgenic animals model axonopathy in Alzheimer's disease? *J. Neurochem* 98: 993-1006.
- Haass, ySelkoe. 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:101-112.
- Hardy. 1997. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 20: 154-159.
- Heyn, et al. 2012. Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109: 10522-10527.
- Ho, et al. 2011. Is high homocysteine level a risk factor for cognitive decline in elderly? A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *Am J Geriatr Psychiatry* 19: 607-617.
- Jin, et al. 2011. Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. *Nucleic Acids Res* 39: 5015-5024.
- Jiang, et al. 2008. ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron* 58681-693

- Julien, et al. 2009. Sirtuin 1 reduction parallels the accumulation of tau in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 68: 48-58.
- Juopperi, et al. 2011. Modeling neurological diseases using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Future Neurol* 6: 363-373.
- Kaikkonen, et al. 2011. Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res* 90: 430-440
- Kamenetz, et al. 2003. APP Processing and Synaptic Function. *Neuron* 37: 925-937.
- Kandel, et al. 2000. "Learning and memory" en Principles of Neural Science. 4th ed McGraw Hill NY.
- Ketelaar, et al. 2012. What monozygotic twins discordant for phenotype illustrate about mechanisms influencing genetic forms of neurodegeneration. *Clin Gen* 81: 325-333
- Khare, et al. 2012. 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nat Struct Mol Biol* 19: 1037-43.
- Kilgore, , et al. 2010. Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* 35: 870-880.
- Kriaucionis y Heintz. 2009. The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. *Science* 324: 929-930
- Korzus, et al. 2004. CBP Histone Acetyltransferase Activity Is a Critical Component of Memory Consolidation. *Neuron* 42: 961-972.
- Kwok, et al. 2011. A randomized placebo controlled trial of homocysteine lowering to reduce cognitive decline in older demented people. *Clin Nut* 30: 297-302.
- Lamprecht y LeDoux. 2004. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 45-54
- Leach, et al. 2012. Gadd45b knockout mice exhibit selective deficits in hippocampus-dependent long-term memory. *Learn Mem* 19: 319-324.
- Li, et al. 2007. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* 128: 707-719.
- Li y Liu. 2011. Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *J Nucleic Acids* 870726
- Lister, et al. 2013. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341: 6146
- Lu, T. et al. 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429: 883-891.
- Ma, et al. 2009. Neuronal Activity-Induced Gadd45b Promotes Epigenetic DNA Demethylation and Adult Neurogenesis. *Science* 323: 1074-1077.
- Margueron y Reinberg 2010. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet* 11: 285-296
- Mastroeni, et al. 2010. Epigenetic changes in Alzheimer's disease: Decrements in DNA methylation. *Neurobiol Aging* 31: 2025-2037.
- Mastroeni, et al. 2009. Epigenetic Differences in Cortical Neurons from a Pair of Monozygotic Twins Discordant for Alzheimer's Disease. *PLoS One* 4: e6617
- McKhann, et al. 1984. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology* 34: 939.
- Mellén, et al. 2012. MeCP2 Binds to 5hmC Enriched within Active Genes and Accessible Chromatin in the Nervous System. *Cell* 151: 1417-1430.

- Monsey, , et al. 2011. Epigenetic Alterations Are Critical for Fear Memory Consolidation and Synaptic Plasticity in the Lateral Amygdala. *PLoS One* 6: 19958
- Oddo, et al. 2003 a. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24: 1063-1070.
- Oddo, et al. 2003 b. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39: 409-421.
- Oddo, et al. 2008. Blocking Abeta42 accumulation delays the onset and progression of tau pathology via the C terminus of heat shock protein70-interacting protein: a mechanistic link between Abeta and tau pathology. *J. Neurosci* 28: 12163-12175.
- Ogawa, . , et al. 2003. Ectopic localization of phosphorylated histone H3 in Alzheimer's disease: a mitotic catastrophe? *Acta Neuropathol* 105: 524-528.
- OMS- 2007 ¿Qué son los trastornos neurológicos?. Recuperado el 20 de abril de 2013, de <http://www.who.int/features/qa/55/es/>
- Partida 2006, Proyecciones de la población de México 2005-2050, Consejo Nacional de Población, México D. F.
- Palop, et al. 2011. Quantifying biomarkers of cognitive dysfunction and neuronal network hyperexcitability in mouse models of Alzheimer's disease: depletion of calcium-dependent proteins and inhibitory hippocampal remodeling. *Methods Mol Biol* 670: 245-262.
- Peleg, et al. 2010. Altered Histone Acetylation Is Associated with Age-Dependent Memory Impairment in Mice. *Science* 328: 753-756.
- Penner, et al. 2011. Age-related changes in Arc transcription and DNA methylation within the hippocampus. *Neurobiol Aging* 32: 2198-2210.
- Puzzo, et al. 2008. Picomolar Amyloid- β Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus. *J. Neurosci* 28: 14537-14545.
- Querfurth y LaFerla 2010. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 362. 329-344.
- Ricobaraza, et al. 2011. Long-term phenylbutyrate administration prevents memory deficits in Tg2576 mice by decreasing Abeta. *Front Biosci* 3: 1375-1384.
- Roosendaal, et al. 2010. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J. Neurosci* 30: 5037-5046.
- Rosi, et al. 2005. Neuroinflammation alters the hippocampal pattern of behaviorally induced Arc expression. *J. Neurosci* 25: 723-731.
- Roth, et al. Epigenetic regulation of genes in learning and memory. *Essays Biochem* 48: 263-274
- Ruzov, et al. 2011. Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Res* 21: 1332-1342
- Santiard-Baron 1999. Identification of β -Amyloid-Responsive Genes by RNA Differential Display: Early Induction of a DNA Damage-Inducible Gene, gadd45. *Exp Neurol* 158: 206-213
- Sarma y Reinberg 2005. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 139-149.
- Schiepers, et al. 2011. DNA methylation and cognitive functioning in healthy older adults. *Br J Nut* 107: 744-8.
- Selkoe, 2002. Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science* 298: 789-791.

- Sérandour, et al. 2012. Dynamic hydroxymethylation of deoxyribonucleic acid marks differentiation-associated enhancers. *Nucleic Acids Res* 40: 8255-8265.
- Sethi, y Lukiw, Walter J, 2009. Micro-RNA abundance and stability in human brain: Specific alterations in Alzheimer's disease temporal lobe neocortex. *Neurosci Lett* 459: 100-104.
- Shen, et al. 2013. Genome-wide Analysis Reveals TET- and TDG-Dependent 5-Methylcytosine Oxidation Dynamics. *Cell* 153: 692-706
- Song, et al. 2013. Genome-wide Profiling of 5-Formylcytosine Reveals Its Roles in Epigenetic Priming. *Cell* 153: 678-691
- Sparks2008. The early and ongoing experience with the cholesterol-fed rabbit as a model of Alzheimer's disease: the old, the new and the pilot. *J Alzheimers Dis* 15: 641-656.
- Spruijt, et al. 2013. Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)Methylcytosine and Its Oxidized Derivatives. *Cell* 152: 1146-59
- Steves, et al. 2012. Ageing, genes, environment and epigenetics: what twin studies tell us now, and in the future. *Age Ageing* 41: 581-586.
- Stillingy Fischer 2011. The role of histone acetylation in age-associated memory impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Learn Mem* 96: 19-26
- Sultan, et al. 2012. Genetic deletion of Gadd45b, a regulator of active DNA demethylation, enhances long-term memory and synaptic plasticity. *J. Neurosci* 32: 17059-17066.
- Sun, et al. 2013. High-resolution enzymatic mapping of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mouse embryonic stem cells. *Cell reports* 3: 567-576.
- Szulwach, et al. 2011. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci* 14. 1607-1616
- Tahiliani, et al. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324: 930-935.
- Taner. 2011. Gene expression endophenotypes: a novel approach for gene discovery in Alzheimer's disease. *MolNeurodegener* 6: 31
- Tohgi, et al. 1999. Reduction with age in methylcytosine in the promoter region -224 approximately -101 of the amyloid precursor protein gene in autopsy human cortex. *Brain research. Mole Brain Res* 70: 288-292.
- Tran, et al. 2011. Distinct Temporal and Anatomical Distributions of Amyloid- β and Tau Abnormalities following Controlled Cortical Impact in Transgenic Mice. *PloS One*, 6: e25475.
- Vecsey, et al. 2007. Histone Deacetylase Inhibitors Enhance Memory and Synaptic Plasticity via CREB: CBP-Dependent Transcriptional Activation. *J. Neurosci* 27: 6128-6140.
- Visel, et al. 2009. Genomic views of distant-acting enhancers. *Nature* 461: 199-205.
- Walsh, et al. 2002. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416: 535-539.
- West, et al. 1995. Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J Mol Neurosci* 6: 141-146.
- Wood, . 2011. Introduction to the special issue of Neurobiology of Learning and Memory: On epigenetics and memory. *Neurobiol Learn Mem* 96: 1
- Wu, et al. 2011. Arc/Arg3.1 regulates an endosomal pathway essential for activity-dependent β -amyloid generation. *Cell* 147: 615-628.
- Wu y Sun 2009. Reversing DNA methylation: new insights from neuronal activity-induced Gadd45b in adult neurogenesis. *Sci Signal* 2: 17

Wuy Zhang. 2010. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 607-620.

Zamorano Ng-Teajan 2011. "Visualización temporal de la expresión de ARC durante el aprendizaje del condicionamiento de aversión al sabor por medio de hibridación In Situ". Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. UNAM

Zhang, et al. 2011. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* 4: 3