



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**REGULACIÓN EPIGENÉTICA Y TRANSCRIPTÓMICA DEL INFARTO CEREBRAL  
ISQUÉMICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Alfredo Isaac Ponce Arias

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis B. Tovar-y-Romo  
Instituto de Fisiología Celular

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Julio Morán Andrade, Instituto de Fisiología Celular

Dra. Mayra Furlan Magaril, Instituto de Fisiología Celular

Dr. Martín Gustavo Pedraza Alva, Instituto de Biotecnología

Dr. Daniel Reyes Haro, Instituto de Neurobiología

Dra. Gohar Gevorgyan, Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Enero, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# Índice

<b>Resumen</b> .....	I
<b>Abstract</b> .....	III
<b>Agradecimientos</b> .....	V
<b>Abreviaturas</b> .....	VI
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. <i>Características generales de las modificaciones epigenéticas; la metilación del DNA</i> ..	1
1.2. <i>Regulación de la expresión genética mediada por la metilación del DNA</i> .....	2
1.3. <i>Fisiopatología de la isquemia cerebral</i> .....	5
<b>2. Antecedentes</b> .....	6
2.1. <i>La metilación del DNA en la isquemia cerebral</i> .....	6
2.1.1. <i>Evidencias clínicas</i> .....	6
2.1.2. <i>Evidencias experimentales</i> .....	9
2.2. <i>Antecedentes del laboratorio</i> .....	13
<b>3. Hipótesis y objetivo</b> .....	15
3.1. <i>Objetivos particulares</i> .....	15
<b>4. Material y métodos</b> .....	16
4.1. <i>Oclusión de la arteria cerebral media y administración de Aza</i> .....	16
4.2. <i>Evaluaciones motoras</i> .....	18
4.3. <i>Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)</i> .....	19
4.4. <i>Methylation-sensitive high-resolution melting analysis (MS-HRM)</i> .....	20
4.5. <i>Immunohistofluorescencia</i> .....	21
4.6. <i>Tinción de violeta de cresilo</i> .....	22
4.7. <i>Ensayo de actividad de histona desacetilasas (HDAC)</i> .....	23
<b>5. Resultados</b> .....	24
5.1. <i>Establecimiento del modelo de infarto y admistración de Aza</i> .....	24
5.2. <i>La inhibición de las DNMTs mejora la recuperación dendrítica después de 7 d al infarto</i> .....	25
5.3. <i>Cambios en la expresión y metilación de DNA después de 7 d al infarto</i> .....	27

5.4. Cambios motores y supervivencia después del infarto .....	33
<b>6. Discusión</b> .....	<b>36</b>
6.1. Cambios en la metilación de DNA posinfarto y su escala temporal .....	36
6.2. El papel de las HDACs en la fisiopatología del infarto cerebral .....	37
6.3. La metilación del DNA y la neurogénesis después del infarto.....	38
6.4. Control metabólico y proliferativo de BEX2 después del infarto .....	39
6.5. Control de la angiogénesis y ROBO4.....	40
6.6. GAP43 como indicador de recuperación neurológica .....	41
6.7. El papel de la metilación de DNA en la rehabilitación posinfarto.....	42
<b>7. Conclusiones y perspectivas</b> .....	<b>43</b>
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>45</b>

## Resumen

La regulación de la expresión genética es de primordial importancia en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y actualmente existen evidencias científicas que indican de qué manera la neurodegeneración crónica es modulada por factores epigenéticos como la metilación del DNA. Antecedentes del laboratorio sugieren que diversos genes como ROBO4 y BEX2 son diferencialmente expresados en respuesta a la privación de oxígeno y glucosa (OGD) en un modelo *in vitro* de isquemia/reperfusión. Con base en estos antecedentes el objetivo del estudio fue investigar algunos aspectos de la fisiopatología del infarto cerebral *in vivo* y el impacto de la metilación del DNA en la regulación genética, conducta motora y sobrevivencia.

Se realizaron estudios utilizando el modelo de infarto producido por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en ratones C57BL/6J machos de 12-14 semanas de edad. La metilación del DNA se inhibió farmacológicamente con la administración i.c.v. de 2'-desoxi-5-azacitidina (Aza) 30 min después del infarto. Los cerebros fueron extraídos 7 d después del infarto, los hemisferios separados y homogenizados para aislar RNA y DNA y analizar la expresión y metilación de ROBO4 y BEX2. ROBO4 es un gen implicado en la regulación de la migración y proliferación celular, así como la angiogénesis y el mantenimiento de la homeostasis vascular. BEX2 es un gen que codifica una proteína con funciones relacionadas a la sobrevivencia celular, autofagia y la inhibición de la apoptosis mitocondrial. Además, incluimos a GAP43, una proteína expresada en el cono axonal, como un marcador de regeneración neuronal después del infarto.

Por medio de RT-qPCR se encontraron cambios estadísticamente significativos en la expresión de ROBO4 ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 3.1235, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0368) y BEX2 ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 1.4607, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0088) así como una tendencia al alta en GAP43 en los ratones infartados tratados con Aza con respecto a vehículo. Por medio de MS-HRM (*Methylation-sensitive high-resolution melting analysis*) se determinó el perfil de metilación de los promotores de dichos genes. Se encontró un decremento cualitativo en la metilación de ROBO4, BEX2 y GAP43 por el tratamiento con Aza con respecto al vehículo.

Se observó un mejor desempeño a los 7 d posinfarto en las pruebas conductuales motoras del poste en el tratamiento MCAO + Aza con respecto a los ratones MCAO + vehículo ( $n = 12$ , *mean time difference* = 2.0417 s, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0467), así como en la prueba de la viga estrecha (MCAO + Aza con respecto a MCAO + vehículo,  $n = 12$ , *mean time difference* = 4.4924 s, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0182). De la misma manera, encontramos una diferencia estadísticamente significativa en probabilidad de supervivencia de los animales tratados con Aza con respecto a vehículo ( $p = 0.02$ ). Se evaluó la actividad de las HDACs (Histona desacetilasas), enzimas que promueven la remodelación de la cromatina en sinergia con la metilación del DNA al favorecer un estado represor de la transcripción. Después de 7 d al infarto se apreció una reducción estadísticamente significativa en MCAO + Aza, tanto en el hemisferio contralateral ( $n = 3$ , *mean activity difference* = 43.17%, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0460) como en el ipsilateral ( $n = 3$ , *mean activity difference* = 74.01%, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0003) con respecto a sus tratamientos vehículo. Nuestros resultados contribuyen a elucidar los cambios inducidos por la isquemia y reperfusión en términos de la transcripción y la metilación del DNA después de un accidente cerebrovascular. Entender los cambios regulatorios orquestados por los diferentes tipos celulares en el cerebro es esencial para saber los mecanismos de resolución de daño provocados por el infarto.

## Abstract

Gene expression regulation has a prime role in the development of neurodegenerative diseases and currently, there is scientific evidence showing how chronic neurodegeneration is modulated by epigenetic factors such as DNA methylation. Previous research from our laboratory suggests several genes such as ROBO4 and BEX2 are differentially expressed in response to oxygen glucose deprivation (OGD) in an *in vitro* model of ischemia/reperfusion. The aim of this study was to investigate some aspects of the pathophysiology of cerebral infarction *in vivo* and the impact of DNA methylation on genetic regulation, motor behavior and survival.

We performed a middle cerebral artery occlusion (MCAO) model of stroke in 12-14 week-old male C57BL/6J mice. DNA methylation was pharmacologically inhibited by i.c.v. of 2'-deoxy-5-azacytidine (Aza) 30 min after stroke. Brains were removed 7 d after infarction, hemispheres separated and homogenized to isolate RNA and DNA to analyze the expression and methylation of ROBO4 and BEX2. ROBO4 is a gene involved in the regulation of cell migration and proliferation, as well as angiogenesis and the maintenance of vascular homeostasis. BEX2 is a gene that encodes a protein whose function is related to cell survival, autophagy, and inhibition of mitochondrial apoptosis. Furthermore, we included GAP43, a protein expressed in the axonal growth cone, as a marker of neuronal regeneration after stroke.

By means of RT-qPCR, statistically significant changes were found in the expression of ROBO4 ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 3.1235, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0368) and BEX2 ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 1.4607, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0088) as well as a tendency of increased GAP43 in infarcted mice treated with Aza relative to vehicle. Also, we performed MS-HRM (Methylation-sensitive high-resolution melting analysis) to know the promoters' methylation profile of previously mentioned genes. A qualitative decrease in the methylation of ROBO4, BEX2 and GAP43 was found by Aza treatment with respect to vehicle.

Next, we assessed motor behavior in infarcted mice after 7 d of stroke. A better performance was observed at 7 d post-infarction in MCAO + Aza treatment compared to MCAO + vehicle mice in the pole test ( $n = 12$ , *mean time difference* = 2.0417 s, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0467), as well as in the narrow beam test (MCAO + Aza with respect to MCAO + vehicle,  $n = 12$ , *mean time difference* = 4.4924 s, *Tukey adjusted post-hoc p* = 0.0182). In the same way,

we found a statistically significant difference in the probability of survival of animals treated with Aza compared to vehicle ( $p = 0.02$ ). The activity of HDACs (Histone deacetylases) was evaluated, these enzymes promote chromatin remodeling in conjunction with DNA methylation by establishing a repressive state of transcription. After 7 days of infarction, a statistically significant reduction in MCAO + Aza was observed, both in the contralateral hemisphere ( $n = 3$ , *mean activity difference = 43.17%*, *Tukey adjusted post-hoc  $p = 0.0460$* ) and in the ipsilateral ( $n = 3$ , *mean activity difference = 74.01%*, *Tukey adjusted post-hoc  $p = 0.0003$* ) with respect to their vehicle treatments. Our results help elucidate ischemia-reperfusion-induced changes in terms of DNA transcription and methylation after stroke. Understanding the regulatory changes orchestrated by the different cell types in the brain is essential to understand the damage resolution mechanisms caused by infarction.



## **Agradecimientos**

Este proyecto fue realizado con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CB219542 y A1-S-13219) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (PAPIIT IN226617 e IN207020) y se contó con la beca de maestría del CONACYT (CVU 887101).

Agradezco las facilidades brindadas para la realización del trabajo experimental de la Q.F.B. Cristina Aranda Fraustro, de la Dra. Ruth Rincón Heredia de la Unidad de Imagenología, de los Mtros. Gerardo Coello Coutiño y Ana María Escalante Gonzalbo de la Unidad de Cómputo y de la Dra. Laura Ongay Larios de la Unidad de Biología Molecular del I.F.C.

## Abreviaturas

- 5me-C** : *5-methylcytosine*, 5-metilcitosina
- AHCY** : *S-adenosylhomocysteine hydrolase*, s-adenosilhomocisteína hidrolasa
- AKT** : *AKT serine/threonine kinase 1, Protein kinase B*, serina/treonina cinasa AKT 1, proteína cinasa B
- AMPA** :  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico
- ANXA2** : *Annexin 2*, annexina 2
- APC** : *Adenomatosis Polyposis Coli Tumor Suppressor, WNT Signaling Pathway Regulator*, supresor de tumores de Adenomatosis Poliposis Coli, regulador de la vía de WNT
- ATR** : *Atrazine*, atrazina
- Aza** : *2'-deoxy-5-azacytidine, decitabine*, 2'-desoxi-5-azacitidina, decitabina
- BBB** : *Blood-brain barrier*, barrera hematoencefálica
- BDNF** : *Brain-derived neurotrophic factor*, factor neurotrófico derivado de cerebro
- BEX2** : *Brain Expressed X-Linked 2*, expresado en el cerebro ligado al cromosoma X 2
- CASP3** : *Caspase 3, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase 3*, caspasa 3, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis 3
- CDHR5** : *Cadherin-related Family Member 5*, miembro 5 de la familia relacionada con la cadherina
- CGI** : *CpG island*, Isla CpG
- CHD3** : *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 3*, proteína de unión a helicasa de DNA con cromodominio 3
- CTNNBIP1** : *Catenin Beta Interacting Protein 1*, Proteína de interacción de beta catenina 1
- CSF** : *Cerebrospinal fluid*, líquido cefalorraquídeo
- CUBN** : *Intrinsic Factor-Cobalamin Receptor, Cubilin*, receptor intrínseco del factor cobalamina, cubilina
- DCI-SAH** : *Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage*, isquemia cerebral tardía por hemorragia subaracnoidea
- DNMT1/3A/3B** : *DNA Methyltransferase, Cytosine 5-methyltransferase*, DNA metiltransferasa, citosina 5-metiltransferasa
- DNMT3L** : *DNA Methyltransferase Like 3*, parecida a DNA metiltransferasa 3
- Egr-1** : *Early Growth Response 1*, respuesta a crecimiento temprano 1
- ETS** : *Transcription Factor ETS Proto-Oncogene*, factor de transcripción ETS Protooncogén
- EWAS** : *Epigenome-wide association study*, estudio de asociación de epigenoma completo
- GAP43** : *Growth Associated Protein 43*, proteína asociada al crecimiento 43
- GAPDH** : *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*, Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- GLuR2** : *AMPA-Selective Glutamate Receptor 2*, receptor de glutamato selectivo a AMPA 2
- H19** : *H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript*, transcrito H19 imprintado expresando maternalmente
- H3K4me3** : *Histone H3 trimethyl lysine 4*, histona H3 trimetil lisina 4
- H3K9ac** : *Histone H3 acetyl lysine 9*, histona H3 acetil lisina 9
- H3K19ac** : *Histone H3 acetyl lysine 19*, histona H3 acetil lisina 19
- H3K27ac** : *Histone H3 acetyl lysine 27*, histona H3 acetil lisina 27
- H3K122ac** : *Histone H3 acetyl lysine 122*, histona H3 acetil lisina 122
- H3K36me3** : *Histone H3 trimethyl lysine 36*, histona H3 trimetil lisina 36
- HDACI/II** : *Histone Deacetylase*, histona desacetilasa

**HIF1** : *Hypoxia Inducible Factor 1*, factor inducible por hipoxia 1

**HLA-DQB1**: *Major Histocompatibility Complex, class II, DQ beta 1*, complejo principal de histocompatibilidad de clase II, DQ beta 1

**HLA-DRB1** : *Major Histocompatibility Complex, class II, DR beta 1*, complejo principal de histocompatibilidad de clase II, DR beta 1

**IAP** : *Intracisternal A-particle retrotransposon*, Retrotransposon de partícula A intracisterna

**IL15RA** : *Interleukin 15 Receptor Subunit Alpha*, subunidad alfa del receptor de interleucina 15

**INSR** : *Insulin Receptor*, receptor de insulina

**LC3-II** : *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-phosphatidylethanolamine conjugate*, cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos 1A/B conjugada con fosfatidiletanolamina

**LINE1** : *Long Interspread Element 1*, elemento largo interespaciado 1

**LPC** : *L- $\alpha$ -lysophosphatidylcholine, Lysolecithin*, L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina, lisolecitina

**MAPK 1/p38** : *Mitogen-Activated Protein Kinase*, proteína cinasa activada por mitógeno

**MBD1/2/4** : *Methyl-CpG Binding Domain Protein*, proteína con dominio de unión a metil-CpG

**MeCP2** : *Methyl-CpG Binding Protein 2*, proteína de unión a metil-CpG 2

**MMP2** : *Matrix Metalloproteinase 2*, metaloproteinasas de matriz 2

**MT** : *Mouse transcript retrotransposon*, retrotrasposon transcrito de ratón

**MTA1/2** : *Metastasis Associated*, asociado a metastasis

**MTHFR** : *5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (NADPH)*, 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (NADPH)

**mTOR** : *Mechanistic Target Of Rapamycin*, blanco mecanístico de la rapamicina

**MTRNR2L8** : *Humanin-Like Protein 8, MT-RNR2 Like 8*, proteína parecida a la humanina 8, parecida a MT-RNR2

**MS-HRM** : *Methylation-sensitive high-resolution melting análisis*, análisis de fusión de alta resolución sensible a metilación

**NF- $\kappa$ B** : *Nuclear Factor Kappa B*, factor nuclear kappa B

**NHSS** : *NIH Stroke Scale*, escala de infarto del NIH

**NMDA** : *N-methyl-D-aspartate*, N-metil-D-aspartato

**nNOS** : *Neuronal NO Synthase, NOS1*, sintasa de NO neuronal, NOS1

**NR2B** : *Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2B*, subunidad 2B del receptor ionotrópico de glutamato de tipo NMDA

**NSCs** : *Neural Stem Cells*, células troncales neuronales

**NuRD** : *Nucleosome Remodeling Deacetylase Complex*, complejo de desacetilasas remodeladoras de nucleosoma

**OGD** : *Oxygen and glucose deprivation*, privación de oxígeno y glucosa

**OLIG2** : *Oligodendrocyte Transcription Factor 2*, factor de transcripción de oligodendrocitos 2

**ORR1** : *Origin-Region Repeat 1 retrotransposon*, retrotrasposon de la repetición 1 de la región origen

**PARP1** : *poly(ADP-ribose)polymerase 1*, poli polimerasa de ADP-ribosa 1

**PCNA** : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, antígeno nuclear de células en proliferación

**PDGFR** : *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PM20D1** : *Peptidase M20 Domain Containing 1*, peptidasa 1 que contiene el dominio M20

**PRC2** : *Polycomb repressive complex 2*, complejo represor polycomb 2

**p-S6K1** : *Ribosomal protein S6 kinase beta-1, phosphorylated*, cinasa de proteínas ribosomales S6 beta 1, fosforilada

**RIN3** : *Ras And Rab Interactor 3*, interactor de Ras y Rab 3  
**RbAp46/48** : *RB Binding Protein 7, Chromatin Remodeling Factor*, proteína de unión RB 7, factor remodelador de cromatina  
**ROBO4** : *Roundabout Guidance Receptor 4*, receptor guía de glorieta 4  
**ROS** : *Reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno  
**SAH** : *S-Adenosyl-L-homocysteine*, S-adenosil-L-homocisteína  
**SAM** : *S-Adenosylmethionine*, S-adenosilmetionina  
**SINE B1/B2** : *Short Interspersed Nuclear Element*, elemento nuclear corto interespaciado  
**SLC6A4** : *Solute Carrier Family 6 Member 4, SERT*, miembro 4 de la familia de acarreadores de solutos 6, SERT  
**SNPs** : *Single-Nucleotide Polymorphisms*, polimorfismos de un solo nucleótido  
**STAT3** : *Signal transducer and activator of transcription 3*, activador de la transcripción y transductor de señal 3  
**SSRIs** : *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina  
**TCN2** : *Transcobalamin 2*, transcobalamina 2  
**TEs** : *Transposable elements*, elementos transponibles  
**TET1/3** : *Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*, metilcitosina dioxigenasa de traslocación diez-once  
**TMRM** : *Tetramethylrhodamine, methyl ester*, éster metílico de tetrametilrodamina  
**TSA** : *Trichostatin A*, tricostatina A  
**TSP1** : *Thrombospondin 1*, trombospondina 1  
**TSS** : *Transcription start site*, sitio de inicio de la transcripción  
**UHRF1/2** : *Ubiquitin Like With PHD And Ring Finger Domains*, parecida a la ubiquitina con dominios dedo de anillo y PHD  
**VEGFA** : *Vascular Endothelial Growth Factor*, factor de crecimiento vascular endotelial  
**VL30** : *Viral-like 30 element retrotransposon*, retrotrasposon parecido a virus de 30 elementos  
**WNT** : *Wingless-Type MMTV Integration Site*, sitio de integración MMTV del tipo sin alas  
**ZBTB4/38** : *Zinc Finger And BTB Domain Containing*, contiene dominios dedo de zinc y BTB

## 1. Introducción

### 1.1. Características generales de las modificaciones epigenéticas; la metilación del DNA

El DNA es la biomolécula que contiene las unidades primarias de información de la célula, los genes, que son los que contienen la información necesaria para sintetizar todas las proteínas que las células expresan. Esta información es heredable y es la base de la identidad celular, por lo que la secuencia de DNA y su regulación son claves para entender el funcionamiento normal y patológico de los seres vivos.

Las modificaciones epigenéticas son todas las características heredables de una célula que no dependen de la secuencia del DNA (2–6) y que regulan la expresión genética, por lo que pueden ser afectadas por el ambiente en el desarrollo, mantenerse hasta la etapa adulta e incluso heredarse a la progenie por medio de la línea germinal (7). Por otro lado, la existencia de diversos linajes celulares con la misma información genética dentro de un mismo organismo puede explicarse en parte por los mecanismos epigenómicos que permiten variabilidad en la expresión genética. Estos mecanismos son establecidos *de novo en el* desarrollo y perduran hasta el estado adulto (8); involucran principalmente las marcas de histonas, RNAs pequeños, la estructura tridimensional de la cromatina y modificaciones a las bases nitrogenadas del DNA.

Una de las marcas epigenéticas más estudiadas es la 5-metilcitosina (5me-C) en el DNA, que es, como la gran parte de este tipo de modificaciones a nivel genómico, heredable a la siguiente generación (9). Los alelos mantienen su estado de metilación durante la gametogénesis e inclusive después de la fecundación. La metilación *de novo* se establece en el desarrollo y está mediada principalmente por las DNA metiltransferasas 3A-B (DNMT3A-B) (9). Este tipo de metilación dirige la expresión genética de una célula indiferenciada hacia una célula tejido específica, la metilación *de novo* ocurre en una doble cadena de DNA no metilada y es establecida en sitios CpG (dinucleótido citosina-guanina) de manera dinámica, desde la fecundación hasta la formación de células germinales primordiales. Los patrones de metilación entre el óvulo y el espermatozoide son diferentes, además de que contribuyen de manera diferencial al patrón de metilación del cigoto, el cual experimenta una desmetilación genómica total mediada por TET3 (*Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 3*), excepto en la mayoría de los sitios con impronta, que resisten la desmetilación (10).

Los patrones de metilación son reestablecidos *de novo* a partir del embrión de dos células y se mantienen de manera dinámica durante todo el desarrollo en la mayoría de los tejidos. Cuando las células germinales primordiales ya se han polarizado y migrado para formar lo que serán más adelante los gametos, éstas se desmetilan completamente de nuevo, incluyendo algunos sitios improntados (11–13), y se establecen ahora las marcas de metilación específicas de la línea germinal, que están mediadas por DNMT3L (*DNA Methyltransferase Like 3*), así como la metilación que refiere al silenciamiento de los elementos transponibles (TEs) (14).

La DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) es la isoforma que se expresa con mayor abundancia en los tejidos mitóticos en organismos adultos y es la enzima que cataliza la incorporación del grupo metilo a la citosina. Esta enzima es reclutada por el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y su unión a la cromatina está mediada por la proteína *ubiquitin-like plant homeodomain and RING finger domain 1* (UHRF1). La reacción es catalizada de manera semiconservativa después de la duplicación del DNA debido al reclutamiento de proteínas de unión a 5me-C que reclutan los complejos proteicos necesarios para la metilación, por lo que una doble cadena de DNA previamente metilada seguirá siendo completamente metilada a la siguiente generación (8). En el cerebro, tanto oligodendrocitos como astrocitos son las células que expresan la mayor parte de DNMT1 (15) y DNMT3A es la principal isoforma expresada en neuronas (16), aunque también se expresa en menor medida DNMT1 (17, 18). Se desconocen los mecanismos que regulan el uso de una isoforma u otra en células posmitóticas como las neuronas.

## 1.2. Regulación de la expresión genética mediada por la metilación del DNA

Distintas configuraciones moleculares de la cromatina influyen la expresión genética modificando la accesibilidad a las diferentes proteínas y RNAs que interactúan con el DNA. Los nucleosomas son la unidad básica estructural de la cromatina y están formados de un segmento de DNA rodeado de 8 proteínas histonas. La composición y modificaciones postraduccionales de las histonas tienen distintos efectos en la estructura nucleosomal, permitiendo o inhabilitando la interacción de proteínas y RNAs con la secuencia de DNA.

La regulación de la expresión genética mediada por la metilación del DNA está asociada a la metilación o desmetilación en las islas CpG (CGI), que se encuentran distribuidas en todo el genoma humano y normalmente en un estado de hipometilación (19). Las CGI son por definición, sitios mayores a 500 bp, alto contenido de CG a nivel global ( $\geq 55\%$ ) y también alto contenido de sitios CpG con relación al contenido esperado de CpG ( $\text{CpG}_{\text{observado}}/\text{CpG}_{\text{esperado}} \geq 0.65$ ) (20). Por lo menos el 50% de las CGI se encuentran cerca del sitio de inicio de la transcripción (TSS), algunas otras en promotores intragénicos y la mayoría de los promotores que contienen CGIs no poseen cajas TATA, lo que nos lleva a decir que son sitios transcripcionales “permissivos”, además de que estructuralmente son deficientes en nucleosomas (21).

La metilación del DNA regula la transcripción genética a través de diversos mecanismos que pueden modificar la estructura tridimensional de la cadena de DNA; específicamente los ángulos entre cada enlace fosfodiéster, la rotación del anillo de desoxiribosa, así como la amplitud de las hendiduras mayores y menores por lo que factores de transcripción como los de la familia ETS (*Transcription Factor ETS Proto-Oncogene*) tienen desde 12 hasta 160 veces menos afinidad por el DNA metilado (22). Otros factores de transcripción como Egr-1 (*Early Growth Response 1*) no tienen afinidad diferencial al DNA metilado, por lo que se han propuesto otros modelos para explicar cómo es que la proteína se une con mayor frecuencia a sus sitios de unión no metilados respecto a los que sí están metilados. Uno de estos modelos está basado en que proteínas de unión a DNA que contienen el dominio metil-CpG de unión a DNA como MBD1, MBD2, MBD4 y MeCP2 (*Methyl-CpG Binding Protein 2*), pueden bloquear los sitios de unión a Egr-1 metilados que se encuentran en sitios CpG fuera de las CGIs, aumentando la disponibilidad de Egr-1 para unirse a sus sitios de unión funcionales no metilados dentro de las CGIs, por lo que indirectamente la metilación del DNA estaría favoreciendo la transcripción de genes mediada por Egr-1 (23).

Por otro lado, algunas proteínas pueden unirse preferentemente a DNA metilado de manera secuencia-específica (24), principalmente las que contienen el dominio metil-CpG de unión a DNA, UHRF1 y UHRF2 (*Ubiquitin Like With PHD And Ring Finger Domains*) o algunos represores transcripcionales con dominio dedo de zinc (Kaiso, ZBTB4 [*Zinc Finger And BTB Domain Containing 4*] y ZBTB38) que, por ejemplo, su expresión se encuentra alterada en

enfermedades como cáncer. Además, Kaiso puede unirse tanto a sitios de unión secuencia-específicos como a sitios CpG para regular transcripcionalmente genes como el RNA no codificante H19 (*H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript*), que participa en procesos proliferativos (25).

Las proteínas que poseen el dominio metil-CpG de unión a DNA tienen una manera específica de reprimir la transcripción mediante el reclutamiento de NuRD, un complejo remodelador de cromatina que está compuesto por las histona-desacetilasas HDACI/II (*Histone deacetylase*), las proteínas de unión a histonas RbAp46/48 (*RB Binding Protein 7, Chromatin Remodeling Factor*), MTA1/2 (*Metastasis Associated*) y CHD3 (*Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 3*). Este complejo aumenta la densidad nucleosomal, así como elimina marcas de activación transcripcional como H3K9ac (*Histone H3 acetyl lysine 9*), H3K19ac (*Histone H3 acetyl lysine 19*), H3K27ac (*Histone H3 acetyl lysine 27*) y H3K122ac (*Histone H3 acetyl lysine 122*) y por lo tanto la facilidad con la que la RNA Pol II puede transcribir el DNA (26). Además, NuRD puede reclutar al complejo PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*), lo que aumenta la inhibición de la transcripción por medio de la metilación de H3K27 de manera locus específica (27).

La metilación del DNA también puede regularse dentro de los genes, por ejemplo, DNMT3B1 puede metilar *de novo* los cuerpos génicos que, a su vez, tienen marcas de transcripción activa como H3K36me3 (*Histone H3 trimethyl lysine 36*), RNA Pol II y mRNA. Este tipo de metilación ocurre preferencialmente en los exones y se asocia a la regulación del splicing y a la estabilidad nucleosomal del cuerpo del gen (28, 29). Asimismo, comparando tanto los niveles de metilación de DNA, modificaciones postraduccionales de histonas y sitios de transcripción activa en distintos tejidos se demostró que los cambios en los niveles de metilación intra e intergénicos establecen la transcripción tejido específica (30). En distintos modelos murinos de epilepsia adquirida se han encontrado cambios en la metilación exónica en genes diferencialmente expresados en el hipocampo con respecto a ratones control (31).

Dada la importancia de la regulación de la transcripción mediada por la actividad de las CGIs, son necesarios estudios detallados que permitan entender los cambios dinámicos entre la metilación y la transcripción y así ofrecer explicaciones más robustas para fenómenos



complejos como el cáncer (32, 33), evolución (34, 35) y procesos neurodegenerativos como la isquemia cerebral. Esta es una de las fisiopatologías neurodegenerativas que provocan más muertes y discapacidad en adultos en el mundo (36), por lo que es importante conocer a detalle los procesos celulares y moleculares que la subyacen, incluyendo la epigenética y en particular la metilación del DNA.

### 1.3. Fisiopatología de la isquemia cerebral

La isquemia cerebral es la interrupción del aporte sanguíneo al cerebro debido a una hipoperfusión del tejido o a un bloqueo del flujo en el caso del infarto cerebral isquémico, lo que provoca que no se cumpla la alta demanda energética del cerebro (37) y ocurran procesos de neurodegeneración que pueden provocar la muerte (38). Estos procesos son secuenciales y afectan diferencialmente a las distintas células del cerebro. Las primeras células en morir son las neuronas por necrosis debido a la falla energética súbita que hace que el potencial de membrana se pierda y en consecuencia los canales dependientes de voltaje alteren su funcionalidad (39). La despolarización neuronal provoca una liberación masiva de glutamato en las células, lo que activa los receptores de NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) y AMPA ( *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) principalmente, llevando a una entrada no controlada de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia la célula y a la posterior activación de calpaínas que son un factor esencial en la necrosis celular (40). Otra proteína que es activada por  $\text{Ca}^{2+}$  es la calmodulina, y ésta a su vez activa a la nNOS (*Neuronal NO Synthase, NOS1*) que produce NO que al reaccionar con el ion  $\text{O}_2^-$  produce ONOO $^-$ , un radical libre que oxida el esqueleto de desoxirribosa del DNA y en menor medida nitrila guanina (41). El daño masivo al DNA activa a la PARP1 (*poly(ADP-ribose)polymerase 1*), enzima dependiente de ATP que repara cortes de cadena sencilla de DNA. Su activación aumenta la falla energética al acabar con gran parte del ATP celular y se produce necrosis (39). En la zona que directamente se afecta por el bloqueo del flujo sanguíneo mueren todos los tipos celulares residentes del cerebro, (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, microglía, células endoteliales, pericitos, células troncales y células ependimales) lo que se le denomina pannecrosis (42), en contraposición a la muerte selectiva y mediada por otros mecanismos como la apoptosis y la inflamación.

La apoptosis ocurre principalmente en una zona periférica a donde ocurrió el bloqueo, llamada penumbra, en la que el tejido tiene una disminución del flujo sanguíneo menor en comparación con el área directamente adyacente a la vasculatura bloqueada. En esta zona de lesión los procesos neurodegenerativos dependen tanto de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la señalización dependiente de HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*) y los procesos inflamatorios subsecuentes. Por ejemplo, el ONOO<sup>-</sup> puede activar a p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) y a CASP3 (*Caspase 3*) y que la fuente de O<sup>2-</sup> es la NADPH oxidasa, que se incrementa sustancialmente después de un infarto (43).

Para entender con detalle el papel de la apoptosis en la isquemia cerebral es necesario estudiar a la par el papel de los astrocitos en la regulación del metabolismo y sobrevivencia neuronal. Después del bloqueo ocurre la reperfusión y otros procesos tanto de recuperación como de neurodegeneración pueden llevarse a cabo. Una molécula que puede efectuar un proceso de recuperación es VEGFA (*Vascular Endothelial Growth Factor*), que se sabe está implicado en la angiogénesis, neurogénesis y neuroprotección después de la isquemia cerebral (44). Además, se sobreexpresa en neuronas, astrocitos, microglía y células endoteliales en la zona de lesión y alrededor de ésta después del infarto en humanos (45).

## **2. Antecedentes**

### *2.1. La metilación del DNA en la isquemia cerebral*

#### *2.1.1. Evidencias clínicas*

En el caso particular de la isquemia cerebral, por medio de análisis de metilación de DNA a nivel genómico en pacientes con infarto cerebral, se ha reportado que en hombres blancos ancianos; existe hipometilación de sitios LINE1 (*Long Interspread Element 1*) y que éstos son un factor de riesgo para el infarto cerebral (46). Otro estudio estableció una relación entre la metilación del DNA, la obesidad y el infarto isquémico y se encontró a sitios CpG asociados a ambas condiciones en sangre periférica (47). Estos se encuentran en genes que regulan la actividad metabólica y la sobrevivencia celular como PM20D1 (*Peptidase M20 Domain*

*Containing 1*), una enzima que recientemente se elucidó su papel en el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (48) cuyo gen se encontró hipermetilado en los pacientes con infarto cerebral (47). En genes cuyos roles en la isquemia están caracterizados como la MMP2 (*Matrix Metalloproteinase 2*), también se han detectado cambios en la metilación de sus promotores. En un estudio poblacional se comprobó que la sobreexpresión de MMP2 en el infarto está correlacionada con su hipometilación en sangre periférica de pacientes con infarto lacunar en todos sus sitios CpG (49).

Dada la relevancia del ciclo SAM/SAH (*S-Adenosyl-L-homocysteine/S-Adenosylmethionine*) en la actividad de las DNMTs, se realizó un estudio clínico en pacientes con infarto cerebral isquémico que recibieron un suplemento de vitaminas B6, B12, B9 para la búsqueda de SNPs (*Single-Nucleotide Polymorphisms*) asociados a la interacción entre los niveles de estas vitaminas y el infarto. Se encontró a varios SNPs asociados a genes implicados en el metabolismo y absorción de B12 y como CUBN (*Intrinsic Factor-Cobalamin Receptor, Cubilin*) y TCN2 (*Transcobalamin 2*, 46). Además, estos pacientes presentaban antes del estudio altos niveles de homocisteína, un conocido factor de riesgo de infarto que es acumulado cuando el ciclo SAM/SAH se encuentra comprometido (51).

Concordantemente, en otro estudio se encontró que los niveles altos de vitamina B12 están asociados a una mejor recuperación funcional (52). Por medio de metaanálisis de todos los estudios publicados con relación al infarto cerebral y la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se demostró que la mutación C667T en la enzima es un factor de riesgo para desarrollar un infarto isquémico (53). Esta mutación disminuye la eficiencia catalítica de la enzima y al ser un paso limitante en la conversión de metionina a homocisteína se cree que pueda afectar los niveles de metilación del DNA (54). De la misma manera, una CGI del promotor de AHCY (*S-adenosylhomocysteine hydrolase*), que permite que el factor limitante en la actividad de las DNMTs (SAH) no se acumule, está hipermetilado en el plasma de pacientes chinos con infarto cerebral isquémico mayores a 60 años (55).

El uso de marcadores basados en la metilación de DNA permite determinar la “edad biológica” de un individuo. Este parámetro es un predictor de la recuperación funcional después del infarto isquémico igual de efectivo que la escala de infarto del NIH (NHSS) y tabaquismo, dos de los

mejores predictores de recuperación funcional que se conocen, además de que la edad biológica es mejor predictor que la edad cronológica (56). El mismo grupo de trabajo determinó también que pacientes con infartos cerebrales tienen edades biológicas más avanzadas con respecto a sus pares cronológicos sanos (57).

Uno de los factores causales para el desarrollo de la isquemia cerebral es la estenosis por aterosclerosis y por lo tanto se han estudiado reguladores de las vías de síntesis y homeostasis de lípidos. miR-233, un microRNA que originalmente fue descrito como regulador de la diferenciación de macrófagos y células dendríticas, se ha estudiado en pacientes con infarto cerebral por arterosclerosis y se sabe que su promotor se desmetila después del infarto y su expresión aumenta en sangre periférica (58). miR-233 está implicado en la regulación negativa de la síntesis de colesterol (59) y además se sabe que puede regular la expresión de GLuR2 (*AMPA-Selective Glutamate Receptor 2*) y NR2B (*Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2B*, (60)), por lo que la excitabilidad neuronal también puede moldearse después del infarto.

Recientemente, por medio de estudios de asociación de epigenoma completo (EWAS) en pacientes isquemia cerebral tardía por hemorragia subaracnoidea (DCI-SAH) de población coreana, se mostró que un intrón de INSR (*Insulin Receptor*) y un exón de CDHR5 (*Cadherin-related Family Member 5*) son genes de riesgo asociados a DCI-SAH y que éstos se encuentran hipermetilados y subexpresados en pacientes con DCI-SAH con respecto a pacientes controles con hemorragia sin isquemia tardía (61). Otro estudio con pacientes chinos con infarto cerebral isquémico, demostró que HLA-DRB1 (*Major Histocompatibility Complex, class II, DR beta 1,*) y HLA-DQB1 (*Major Histocompatibility Complex, class II, DQ beta 1,*) están hipermetilados y subexpresados en sangre periférica con respecto a controles sanos (62), mostrando la relevancia de la respuesta inmune e infiltración leucocitaria posterior al infarto y la polarización de macrófagos en respuesta a eventos vasculares patológicos.

A la par, se ha demostrado por medio de EWAS, que sitios CpG de genes involucrados en angiogénesis como HIF1 y MAPK1 y en respuesta inmune como IL15RA (*Interleukin 15 Receptor Subunit Alpha*) se encuentran hipermetilados en sangre periférica y además tienen SNPs asociados a infarto cerebral en pacientes europeos (63); lo que abona a la teoría acerca

de la contribución genética y epigenética del infarto. Esta teoría postula que existen factores de riesgo tanto genéticos, ambientales y epigenéticos que no solo favorecen o disminuyen la probabilidad de sufrir un infarto isquémico, si no que también modifican el potencial de recuperación que tiene el cerebro.

Asimismo, algunos estudios han encontrado genes candidato relacionados con la función cerebral como MTRNR2L8 (*Humanin-Like Protein 8*), que se demostró por medio de EWAS que está hipometilado en su promotor proximal en sangre periférica de pacientes chinos con infarto isquémico con respecto a controles sanos (64). Este gen podría ser una isoforma de la humanina, que codifica un micropéptido con múltiples funciones antiapoptóticas uniéndose a Bax y Bim, inhibiendo la liberación de SMAC/DIABLO y del citocromo C (65). MTRNR2L8 está sobreexpresado en situaciones de alto estrés como mecanismo homeostático en el cerebro, ya que se encontró una alta expresión en la corteza prefrontal de este gen en pacientes con depresión mayor y suicidas con respecto a pacientes sin desórdenes psiquiátricos (66). De la misma manera, se ha reportado por medio de EWAS, que RIN3 (*Ras And Rab Interactor 3*), un gen que regula el tráfico vesicular, esta hipometilado en sangre periférica de pacientes chinos con infarto isquémico con respecto a controles sanos (67). Estudios previos reportaron que RIN3 está sobrerregulado en la enfermedad de Alzheimer y que regula la transcitosis vascular (68), por lo que una sobreexpresión en el infarto de este gen podría se una causa de muerte neuronal y vascular.

En su conjunto, los datos clínicos muestran que existen cambios en la metilación del DNA después del infarto cerebral y que la maquinaria responsable de la metilación y su regulación también modifican su actividad y expresión, sin embargo aún con esta información no es posible establecer un panorama epigenómico concluyente de todos los cambios en la metilación y su relación con la expresión genética que expliquen los procesos neurodegenerativos en el infarto y reperfusión así como los de reparación y neurogénesis.

### 2.1.2. Evidencias experimentales

Para estudiar cómo se regulan epigenómicamente los procesos neurodegenerativos hay que tener en cuenta que el cerebro posee distintos linajes celulares que tienen una alta

especialización en la función cerebral. Existen distintos modelos experimentales para el infarto cerebral en animales de laboratorio. Por ejemplo, la isquémica provocada por oclusión transitoria de la arteria cerebral media aumenta la cantidad de DNA metilado en el cerebro (69). La actividad de DNMT1 se evaluó por medio de inhibición farmacológica con Aza (*2'-deoxy-5-azacytidine, decitabine*) en modelos murinos de infarto, donde se observa una disminución en el tamaño de la lesión con respecto a un animal control. Además, en el mismo modelo; la viabilidad celular y el tamaño de la lesión son menores en un ratón heterocigoto para esta enzima ( $Dnmt^{+S/+}$  en un fondo 129/SV). A la misma conclusión se llega si se utiliza un modelo con la enzima parcialmente suprimida exclusivamente en neuronas ( $Camk2a\text{-cre:Dnmt}^{1lox/+}$ ) y una tendencia hacia una mejor evaluación neurológica (70). Estudiando el efecto de la reperfusión sanguínea, en un modelo de infarto cerebral en jerbo, se ha demostrado que los niveles de expresión de DNMT1 disminuyen significativamente después de la hipoxia en neuronas piramidales hipocámpales de la CA1 a partir de 96 horas después de infarto (71).

El conjunto de estudios experimentales nos muestra aspectos más detallados de lo que ocurre en el cerebro después de isquemia u OGD (privación de oxígeno y glucosa) y su relación con la metilación del DNA. Podemos sugerir que estos fenómenos patológicos modifican de manera genómica la metilación del DNA, tanto en genes como en regiones no génicas, y éstas pueden explicar varios procesos que se sabe que ocurren por la isquemia/OGD y reperfusión/recuperación como la producción de ROS, angiogénesis, activación de la vía de HIF1, transcripción de TEs, etc. Como la metilación del DNA es tejido específica, aún es necesario saber cómo cambia en cada tipo celular del cerebro, comparando la expresión genética del cerebro podremos ofrecer hipótesis de cómo esto sucede.

En los modelos *in vitro*, la isquemia se puede disectar en sus dos principales componentes fisiológicos: la privación de oxígeno (hipoxia) y/o la de glucosa. Los cultivos neuronales de hipocampo de ratón presentan cambios en la metilación que pueden permanecer hasta 96 horas después de un evento hipóxico (72). Estos correlacionan con la sobreexpresión de algunos genes de la vía WNT (*Wingless-Type MMTV Integration Site*) como APC (*Adenomatosis Polyposis Coli Tumor Suppressor*) y CTNNBIP1 (*Catenin Beta Interacting Protein 1*), que son reguladores negativos de  $\beta$ -catenina y que además tenían sus promotores

hipometilados después de hipoxia. En el mismo modelo, se reportó que la inhibición de la metilación en el DNA contrarresta la vulnerabilidad neuronal dada por la exposición a nicotina (73).

Asimismo, existe evidencia de que en procesos como la regeneración axonal y la plasticidad neuronal podrían ser promovidos por la desmetilación activa después de un ataque isquémico por medio de la expresión de factores de crecimiento (74). En genes que específicamente se expresan al alza debido a la hipoxia como eritropoyetina, se sabe que la cantidad de citosinas metiladas en las regiones reguladoras (promotor proximal y 5' UTR) disminuye con relación a la hipoxia y que ésta es tejido dependiente (75), lo que permite la unión de HIF1 y que su transcripción sea inducida por hipoxia (76). Respecto a los TEs y su regulación por metilación, se ha reportado que diversos retrotransposones (IAP [*Intracisternal A-particle retrotransposon*], LINE1, MT [*Mouse transcript retrotransposon*], ORR1 [*Origin-Region Repeat 1 retrotransposon*], SINE B1/B2 [*Short Interspersed Nuclear Element*] y VL30 [*Viral-like 30 element retrotransposon*]) aumentan su expresión después de la isquemia cerebral en ratones. En particular, IAP se expresó hasta 20 veces más con respecto a los ratones control y además su 5' LTR se encontraba hipometilado (77).

El estrés oxidativo es un componente importante de la isquemia cerebral (78–80) y también está regulado por la metilación de DNA. Por ejemplo, al afectar el proceso de desmetilación de DNA por medio de la inhibición de TET1 ya sea por medio de siRNA o *knockout*, el daño provocado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a neuronas cerebelares aumenta con respecto al vehículo. Congruentemente, el daño es reducido con la administración de Aza (81). Además, la producción de ROS aumenta 2 h después del infarto cerebral provocado por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) en rata. En congruencia con la producción de ROS, se reportó que las mitocondrias disminuyen su potencial de membrana, medido por la fluorescencia de TMRM (*Tetramethylrhodamine, methyl ester*) y que existe un aumento en la expresión de ciclofilina D después de MCAO (82).

En otro estudio, se comprobó que la actividad y expresión de TET3 aumenta a lo largo del tiempo después de MCAO en ratones midiendo los diferentes metabolitos de la oxidación de 5me-C y el mRNA de TET3, y que la administración de un siRNA intracerebral contra TET3

aumenta el tamaño de infarto, disminuye la expresión de genes involucrados en la regulación de muerte celular (XPA, Proteína complementaria del grupo A de Xeroderma Pigmentosa), el sistema antioxidante (SOD2, superóxido dismutasa 2) y la reparación de DNA (POLB, DNA polimerasa beta), entre otros (83).

Las células endoteliales son otro tipo celular importante en la regulación de los procesos neurodegenerativos en la isquemia cerebral; dada su capacidad de regular el flujo sanguíneo y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica. Se sabe que después del infarto ocurre un proceso de angiogénesis (84), y una de las proteínas que regula de manera negativa este fenómeno es TSP1 (*Thrombospondin 1*). TSP1 es una glucoproteína que se une tanto a proteínas de adhesión celular como a factores tróficos secretados para inhibir la angiogénesis por diversos mecanismos, entre los cuales destacan el secuestro de FGF2 (Factor de crecimiento fibroblástico 2, (85)). Está reportado que después de 4 h de OGD, el promotor de TSP1 se hipermetila y su expresión disminuye y congruentemente, después de 8 h de recuperación, el promotor se hipometila y su expresión aumenta (86).

De manera contrastante con respecto a la evidencia en neuronas; en cultivos de astrocitos murinos se ha evidenciado una hipermetilación global en el DNA bajo condiciones de baja glucosa y oxígeno (87), y además una expresión al alza de DNMT1, DNMT3 y MBD2. Otra marca epigenética importante, la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3), que normalmente se asocia a cromatina con transcripción activa, se regula al alza en astrocitos de animales sometidos a un modelo de infarto cerebral tanto a nivel genómico como en la expresión de las enzimas responsables de la reacción de metilación de histonas, como la H3K4 metiltransferasa (88).

También se ha demostrado que los niveles de expresión de algunos miRNAs (miR-21, miR-29b, miR-30b, miR-107, miR-137 y miR-210) aumentan después de OGD en cultivos de astrocitos corticales de rata. En particular miR-29b aumentó su expresión de manera significativa a partir de 8 h de recuperación (89). Este miRNA está implicado en la regulación de DNMT3A, ya que está reportado que se une a su 3'UTR y su expresión es inversamente correlacionada a la de miR-29b (90).



## 2.2. Antecedentes de laboratorio

El perfil de metilación del DNA se determinó bajo distintas condiciones experimentales que mimetizan los daños causados por isquemia y reperfusión en cultivos de astrocitos humanos. Analizamos la relación entre la expresión genética por medio del análisis de mRNA-seq y la metilación de DNA por medio de inmunoprecipitación y secuenciación de DNA metilado (MeDIP seq, tesis de licenciatura) en cultivos celulares sometidos a 4 h de OGD con y sin 8 h de recuperación. Encontramos que la recuperación constituye un estado distinto a la normoxia tanto a nivel transcripcional como epigenético. Diversas vías de señalización se regulan de forma diferencial en OGD durante 4 h, principalmente vías de muerte, de producción de ROS y del sistema antioxidante, vías de control del ciclo celular y reparación de DNA, transportadores metabólicos y enzimas reguladoras de distintas señalizaciones por lo que pudimos describir detalladamente cuáles genes se transcriben y cuáles se dejan de transcribir.

En el caso de la recuperación durante 8 h, observamos alteraciones en la regulación de vías de muerte y de sobrevivencia, además de mecanismos moleculares de adaptabilidad después del insulto, y una compleja regulación de los genes involucrados en el ciclo celular, como en OGD. En la figura 1 se pueden observar algunos de los genes cuya metilación y expresión fueron sub o sobrerreguladas por OGD y recuperación en las distintas condiciones experimentales.

Los mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA pueden modificar radicalmente la expresión genética y por lo tanto el potencial neuroprotector o neurodegenerativo de estas células. Se sabe que en otros procesos neurodegenerativos la metilación del DNA es un factor clave en la regulación de la sobrevivencia y muerte celular tanto a nivel de genes como en regiones reguladoras. Además, la metilación del DNA cambia en los astrocitos, neuronas y células endoteliales después de OGD; por lo que el objetivo de este trabajo es establecer en un modelo de infarto cerebral en ratones para determinar los cambios en los niveles de metilación del DNA y los de expresión genética, así como su manipulación farmacológica para develar la importancia de la metilación del DNA en los procesos consecuentes al infarto. Tomando como base mi trabajo de tesis de licenciatura, este trabajo plantea expandir y validar los resultados en un modelo *in vivo*, dado que los resultados obtenidos de un tipo celular

específico no reflejan el complejo microambiente cerebral con distintos tipos celulares interactuando entre sí en respuesta a un evento como la isquemia/reperfusión.

Basados en los resultados experimentales preliminares del laboratorio, se seleccionaron 2 genes (ROBO4 y BEX2) que encontramos diferencialmente regulados en células astrocíticas en respuesta a OGD durante 4 h y recuperación durante 8 h. ROBO4 es un gen que codifica un receptor transmembranral de la vía de señalización celular del complejo SLIT/ROBO que regula la migración y proliferación celular, así como la angiogénesis y el mantenimiento de la homeostasis vascular (1). BEX2 es un gen que codifica una proteína con funciones relacionadas a la sobrevivencia celular, autofagia y la inhibición de la apoptosis mitocondrial (91).

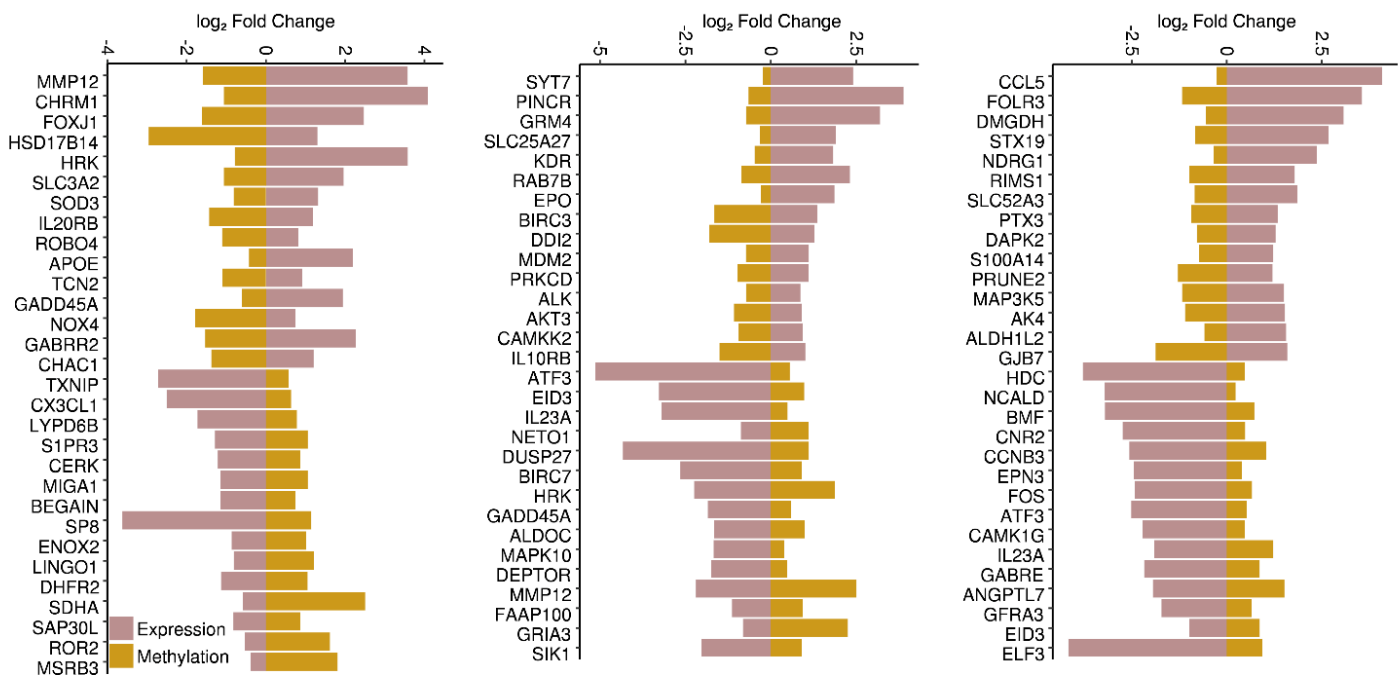


Figura 1. Regulación diferencial de la expresión genética y metilación de DNA en astrocitos sometidos a OGD y recuperación. Se muestra el  $\log_2$  fold change de algunos de los genes diferencialmente expresados representativos y en los que está basado este estudio en los que se correlaciona inversamente la expresión de mRNA y la metilación de su promotor. De izquierda a derecha: OGD vs normoxia, recuperación vs OGD y recuperación vs normoxia.

### 3. Hipótesis y objetivo

La metilación del DNA es tejido específica y se conocen diversas vías de señalización que promueven la recuperación que pueden estar hipo o hiper metiladas después de un evento isquémico. Sin embargo, el conjunto de la literatura sugiere que la inhibición de la metilación de DNA disminuirá el daño causado por la isquemia cerebral y favorecerá la recuperación del tejido. Posiblemente debido a un aumento directo en la expresión de genes involucrados en la sobrevivencia celular que normalmente se encontrarían subexpresados en etapas agudas al infarto.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es determinar los cambios en los perfiles de expresión y metilación de que ocurren en el cerebro de ratón, mediados por la inhibición de la metilación de DNA en respuesta a un modelo de infarto isquémico, así como los cambios en la conducta motora, sobrevivencia y recuperación.

#### 3.1. *Objetivos particulares*

- Determinar los cambios en los niveles de expresión y metilación de DNA en genes que están involucrados en la regulación de la sobrevivencia celular (BEX2), neurogénesis (GAP43) y angiogénesis (ROBO4) en cerebro de ratón en respuesta a un modelo de infarto cerebral isquémico *in vivo* en condiciones fisiológicas y con la metilación del DNA inhibida farmacológicamente con *2'-deoxy-5-azacytidine (Aza)*.
- Determinar el efecto en la conducta motora de ratones en en cerebro de ratón en respuesta a un modelo de infarto cerebral isquémico *in vivo* en condiciones fisiológicas y con la metilación del DNA inhibida farmacológicamente.
- Determinar las alteraciones en los árboles dendríticos en CA1 de cerebros de ratón afectados por el modelo de infarto cerebral al inhibir la metilación del DNA farmacológicamente.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Oclusión de la arteria cerebral media y administración de Aza

Se utilizaron ratones C57BL6/J macho de 3 meses de edad con fotoperiodo normal, dieta de laboratorio estándar y acceso a agua *ad lib*. Toda la experimentación fue llevada a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-IFCLTR93-16) del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Lo ratones fueron sedados con una inyección subdérmica de xilacina 2  $\mu$ l/g (20 mg/ml) y 5 min después anestesiados con isoflurano 5%/95% O<sub>2</sub> durante 1 min. Para el mantenimiento de la anestesia, la proporción y volumen administrada de los gases se modificó en función de los requerimientos del animal a una dosis de 1-1.5% de isoflurano. Una vez el animal anestesiado, se posicionó en decúbito ventral y se posicionó en el soporte del marco esterotáxico con lápices de sujeción. Se realizó una incisión longitudinal sobre la línea media dorsal de la cabeza y se realizó una disección para exponer el cráneo y ubicar las coordenadas estereotáxicas del área irrigada por la arteria cerebral media izquierda (MCA, +5.0 ML, -1.0 AP, 0.0 DV) y el ventrículo lateral derecho (-1.2 ML, -0.5 AP, -2.0 DV). En las coordenadas de la MCA se colocó una sonda láser (Probe 407, Perimed) montada en una base plástica para monitorear el flujo sanguíneo por medio de *laser Doppler flowmetry* (LDF) en un instrumento Periflux 5000 (Perimed).

La oclusión de la arteria cerebral media se realizó con el método de Longa (92) modificado. Detalladamente, con el animal en decúbito dorsal se realizó una insición sobre la línea media ventral del cuello para localizar el músculo esternohioide, el esternocleidomastoideo y el digástrico para exponer la arteria carótida común (CCA), la cual fue disectada de vasos sanguíneos y otros tejidos circundantes hasta exponer la bifurcación entre la arteria carótida externa (ECA) e interna (ICA). Se disectaron ambas arterias y se ligó la ECA con una sutura de seda 5-0 en la bifurcación con la ICA y también en la bifurcación de la ECA con la arteria lingual (LA) y la rama auricular (AB). Posteriormente se disectó el nervio vago y el nervio

hipogloso de todos los vasos circundantes y se colocó una pinza vascular en la ICA y la arteria occipital (OA). Al registrar un decremento en el flujo sanguíneo de entre 25-50% y se colocó otra pinza en la CCA y se registró si había algún decremento en el flujo sanguíneo no mayor al 0-5%.

Posteriormente, se liberó la ligadura entre la bifurcación entre la ECA y la ICA y se realizó una insición hacia al lumen de la ECA con una aguja 27G a 15° de la arteria para después introducir un filamento de nylon 7-0 con una punta de silicón de 0.21-0.23 mm de ancho según el peso del animal. Una vez introducido el filamento se ligó nuevamente la sutura entre la ECA y la ICA y se retiró la pinza que ocluía la ICA y se cortó el extremo de la ECA que sujetaba la ligadura que se encuentra en la bifurcación de la LA y la AB. Finalmente, se dirigió el filamento hacia el lumen de la ICA para después dirigirlo a la bifurcación de la MCA y la arteria cerebral anterior (ACA) en donde ocurre la oclusión total del flujo sanguíneo. Una vez registrado un decremento del flujo del 75-90% con respecto al basal, se retiró la pinza que ocluía la CCA y se mantiene la oclusión durante 60 min.

Durante la oclusión se disminuyó la anestesia a de 1.5 a 1.0% de isoflurano. Una vez transcurridos los 60 min, se ocluyó nuevamente la CCA con una pinza y se retiró el filamento lentamente hasta sacarlo completamente. Consecuentemente, se cerró la ligadura que se encontraba en la bifurcación entre la ECA y la ICA. Se limpió el tejido circundante con NaCl 0.9% y se cierra la insición con sutura de seda 3-0.

Una vez comprobada la reperusión del animal posterior a los 60 min de oclusión se retiró la sonda láser y la base plástica del cráneo para administrar i.c.v. Aza (A3656, Sigma Aldrich) <20 min después del infarto. Se realizó una craneotomía con un taladro dental Dremel 7700 en las coordenadas estereotáxicas del ventrículo lateral derecho (contralateral al infarto). Por medio de un capilar de 50 µm de diametro se administró 3µl de Aza 10 µg/µl en PBS a una velocidad de ~0.4 µl/min por medio de una jeringa a presión. Una vez finalizada la administración se permitió durante 10 min la difusión de la solución en el tejido y se cerró la insición con una sutura de seda 3-0. Una vez finalizada la cirugía se mantuvo al animal durante 10 min en 100% O<sub>2</sub> y posteriormente se le administra 10 µl/g de tramadol 20 mg/ml subcutáneamente. Durante toda la cirugía y durante los posteriores 3 días se mantuvo al

animal en una cama acondicionada a ~37 °C. La cirugía sham incluyó todos los procedimientos anteriores excepto la introducción del filamento de nylon a la MCA. La cirugía fue ciega hasta el momento de insertar el filamento y la administración de vehículo o Aza fue ciega hasta la extracción de cerebro del animal. Se utilizaron un total de 122 animales, de los cuáles se utilizaron 96 para los ensayos de conducta motora (12 por condición), 12 para las pruebas de RT-qPCR y MS-HRM (3 por condición), 24 para los ensayos de actividad de HDCAs (3 por condición) y 8 animales para la inmunohistofluorescencia y la tinción de violera de cresilo (1 por condición). Los animales que sobrevivieron a los tiempos correspondientes fueron utilizados tanto para los ensayos conductuales y moleculares presentados, excepto para la curva de sobrevivencia, que fue calculada por medio de un análisis de Kaplan-Meier con los paquetes *survival* y *survminer* en R 4.1.1 con todos los animales utilizados.

#### 4.2. Evaluaciones motoras

Se evaluó la conducta motora de los animales para determinar el déficit neurológico en condiciones de MCAO + vehículo, MCAO + Aza, cirugía sham + vehículo y cirugía sham + Aza antes, 24 h y 7 d después de la cirugía. La prueba de la esquina permite evaluar asimetrías sensorimotoras y de postura (93) y fue realizado en una esquina de 30° formada de dos bloques de acrílico negro de 20 x 15 cm en el que el animal fue posicionado para dirigirse hacia la esquina y girar hacia la izquierda o la derecha. El ensayo se repitió 20 veces y se contaron las veces en las que se dio vuelta a cada dirección para calcular un índice de lateralidad que indica el sesgo hacia la izquierda o derecha causado por la lesión cerebral, con la siguiente fórmula:  $\text{índice de lateralidad} = (\text{giros ipsilaterales}_{\text{izquierda}} - \text{giros contralaterales}_{\text{derecha}}) / \text{giros totales}_{20}$ . De la misma manera, la prueba del poste que evalúa desórdenes motores en el estriado (94) y fue realizado con un poste de madera de 60 cm sobre una base dentro de la caja individual del animal, posicionando al animal en la punta del poste y permitiendo que el animal bajara y regresara hacia su caja.

Se cuantificó el tiempo que el animal tarda en bajar por el poste y en caso de no ser capaz de hacerlo o caer se consideró una duración de 12 s, que es el tiempo máximo que un animal fue capaz de realizar el ensayo. Finalmente, se realizó la prueba de la viga estrecha modificada de Southwell y colaboradores (95) para evaluar el balance y la función motora en general. Se

colocó al animal en una base elevada 60 cm para que cruzase un puente de 90 x 0.5 x 0.5 cm hacia una caja oscura de 15 x 15 x 15 cm con material de nido de su caja y se determinó el tiempo en cruzar los 90 cm. En caso de que el animal fuera incapaz de caminar o caer se consideró una duración de 38 s, que es el tiempo máximo en el que un animal fue capaz de realizar el ensayo. Todos los ensayos de conducta motora se realizaron de manera ciega y 1 h antes de la cirugía para establecer un nivel basal y en el caso de la prueba del poste y la prueba de la viga estrecha se presenta la media de 4 intentos consecutivos. Las gráficas fueron creadas con el paquete *ggplot2* y la significancia estadística fue evaluada con una ANOVA de dos vías y una prueba post-hoc de Tukey HSD en R 4.1.1.

#### 4.3 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

Se extrajo RNA de cerebros de ratón C57BL/6J en condiciones de MCAO + vehiculo, MCAO + Aza, cirugía sham + vehiculo y cirugía sham + Aza 24 h y 7 d después de la cirugía por medio del reactivo TRIzol (Invitrogen) con las especificaciones del fabricante en rebanadas coronales de 1 mm separadas por hemisferios contralateral e ipsilateral al infarto. El RNA total fue cuantificado por medio de absorbancia UV a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) y su pureza evaluada con el cociente de absorbancia 260/280 nm  $\sim$ 2.0 y 260/230 nm  $\geq$ 2.0, la integridad del RNA fue estimada por medio de un gel de agarosa al 2% observando las bandas correspondientes al 28S y 18 rRNA. Para determinar el nivel de expresión de mRNA de genes sobreexpresados o subexpresados en respuesta a infarto y conocer los cambios de expresión en un tratamiento con Aza se amplificaron los RNA mensajeros de ROBO4 (*Roundabout Guidance Receptor 4*), GAP43 (*Growth Associated Protein 43*), BEX2 (*Brain Expressed X-Linked 2*) y GAPDH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) como control interno. El RNA fue convertido a cDNA por medio del kit Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR Kit (Thermo Fisher) con las especificaciones del fabricante; 50 ng de RNA total fueron utilizados para cada reacción con 100 nM de los primers de la tabla 1. El PCR se realizó con los siguientes parámetros de corrida: síntesis de cDNA 50 °C por 30 min, inactivación de la transcriptasa reversa 95 °C por 15 min, desnaturalización a 95 °C por 15 s, alineamiento a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 30 s por 40 ciclos en un Rotor-Gene 6000 (Corbett).

Tabla 1. Primers usados para la amplificación de mRNA por medio RT-qPCR de genes de interés. Las secuencias de DNA se muestran en sentido 5'-3'.

Gene	Forward	Reverse	Product (bp)
GAP43	ATGAGAAGAACCAAACAGGTTGAAA	CCACGGAAGCTAGCCTGAAT	119
BEX2	ACCGGCCTCCCGAACA	TCTCGGTTTCCAGTCAATCTGT	189
ROBO4	AGAAGCAGGAATTGCACCAAG	GGGAACCAGAGTTTGGACC	136
GAPDH	CTAGGACTGGATAAGCAGGGC	ATCCGTTACACCGACCTTC	194

El cambio en los niveles de expresión fue determinado por medio de la comparación de los Ct de cada reacción con la fórmula:

$fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{experimental condition}} - \Delta Ct_{\text{control condition}} = (Ct_{\text{target gene experimental condition}} - Ct_{\text{housekeeping gene experimental condition}}) - (Ct_{\text{target gene control condition}} - Ct_{\text{housekeeping gene control condition}})$ . Las gráficas fueron creadas con el paquete *ggplot2* y la significancia estadística de los *fold change* fue evaluada con una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey HSD en R 4.1.1.

#### 4.4 Methylation-sensitive high-resolution melting analysis (MS-HRM)

Se extrajo DNA de cerebros de ratón C57BL/6J en condiciones de MCAO + vehiculo, MCAO + Aza, cirugía sham + vehiculo y cirugía sham + Aza 24 h y 7 d después de la cirugía por medio de la interfase entre la fase acuosa y orgánica en la extracción de las muestras de RNA con el reactivo TRIzol (Invitrogen) con las especificaciones del fabricante en rebanadas coronales de 1 mm separadas por hemisferios contralateral e ipsilateral al infarto. Para el ensayo de MS-HRM se siguió el protocolo de Wojdacz y colaboradores (96) con modificaciones:

El DNA total fue cuantificado por medio de absorbancia UV a 260 nm en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) y su pureza evaluada con el cociente de absorbancia 260/280 nm ~1.8 y 260/230 nm ≥2.0, la integridad del DNA fue estimada por medio de un gel de agarosa al 1% observando no degradación del DNA y corrimiento nulo o poco del mismo. Posteriormente 750 ng de DNA fueron convertidos con bisulfito con el kit EpiJET™ Bisulfite Conversion Kit (Thermo Scientific) y recuantificados por medio absorbancia UV. Finalmente, 20 ng de DNA convertido fueron usados para el MS-HRM por medio del kit Luminaris Color HRM



qPCR Master Mix (Thermo Scientific) con las especificaciones del fabricante con los primers de 3 genes de la tabla 2.

Para determinar los niveles de metilación de promotores proximales con sitios CpG amplificados se utilizó para cada gen de interés una curva estándar de amplificación de 0, 5, 25, 50, 75 y 100% DNA metilado por medio de diluciones entre DNA 100% metilado de Universal Methylated Mouse DNA Standard (Zymo Research) y DNA 0% metilado de células mononucleares de sangre de ratón (97). El PCR se realizó con los siguientes parámetros de corrida: desnaturalización inicial 95 °C por 10 min, desnaturalización 95 °C por 10 s, alineamiento a 60 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 30 s por 50 ciclos, formación de heterodúplex 95 °C por 30 s y 50 °C por 30 s y la curva de *high-resolution melting* de 65-95 °C a 0.1 °C/s en un Rotor-Gene 6000 (Corbett). Las gráficas fueron creadas con el paquete *ggplot2* en R 4.1.1.

Tabla II. Primers usados para la amplificación de promotores proximales con sitios CpG por medio MS-HRM de genes de interés. Las secuencias de DNA se muestran en sentido 5'-3'.

Gene	Forward	Reverse	Product (bp)
GAP43	CAGACAACGGGCAGACAACG	GCAACAAATGGCTTCGCGT	116
BEX2	CGATCTCTAGCAGCCCCGT	GCACCGCGGCTTTGTG	226
ROBO4	CGAAATAGAAACAGACAGGAGGTG	TCGACTGTGAACCATTGCTACA	185

#### 4.5. Immunohistofluorescencia

Se evaluó la morfología típica de los axones en CA1 del hipocampo de ratón para conocer los cambios que se producen en respuesta a las distintas condiciones experimentales por inmunohistofluorescencia. Brevemente, se perfundió transcárdialmente a los ratones anestesiados con 10 µl/g de pentobarbital sódico (63 mg/ml, Pisa) con una bomba de perfusión con 50 ml de PBS en hielo y posteriormente con 50 ml de formaldehído (FA) 3.7%. Se extrajeron los cerebros y se realizó una post-fijación de estos en FA 3.7% durante 24 h. Posteriormente, se incubaron en sacarosa 30% durante 48 h y se cortaron en un crióstato Leica CM1850 en rebanaas coronales de 60 µm. Las rebanadas fueron posteriormente permeabilizadas en PBS y 0.5% Tritón X-100 durante 15 min y después bloqueadas con PBS y 10% suero normal de cabra (NGS) durante 1 h. Subsecuentemente, se incubó con α-TUJ

(sc-80005, Santa Cruz) y buffer de bloqueo a una dilución 1:1000 durante 5 d a 4 °C en un agitador DLAB SK-0180-S y ulteriormente incubados con Alexafluor 488 donkey  $\alpha$ -mouse (A21202, Invitrogen) y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 1  $\mu$ g/ml durante 48 h en las mismas condiciones.

Las rebanadas fueron montadas en portaobjetos Superfrost plus (Fisher Brand) con Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences) y visualizadas en un microscopio confocal Zeiss LSM800 con objetivos equipado con láseres de 405 y 488 nm con un objetivo Plan-Apochromat 20x/0.8 M27. Se presentan reconstrucciones en Z de ~50 rebanadas ópticas de 0.48  $\mu$ m. Las imágenes fueron retocadas estéticamente en Fiji 1.53, con los parámetros *remove background -50 px ball radius* y *enhance contrast -0.3% px*.

#### 4.6. Tinción de violeta de cresilo

Se evaluó la anatomía cortical y estriatal y la sobrevivencia celular en la corteza motora y el caudado putamenico para conocer los cambios que se producen en respuesta a las distintas condiciones experimentales por la tinción de violeta de cresilo. en respuesta a las distintas condiciones experimentales por inmunohistofluorescencia. Brevemente, se perfundió transcardialmente a los ratones anestesiados con 10  $\mu$ l/g de pentobarbital sódico (63 mg/ml, Pisa) con una bomba de perfusión con 50 ml de PBS en hielo y posteriormente con 50 ml de formaldehído (FA) 3.7%. Se extrajeron los cerebros y se realizó una post-fijación de estos en FA 3.7% durante 24 h. Posteriormente, se incubaron en sacarosa 30% durante 48 h y se cortaron en un crióstato Leica CM1850 en rebanadas coronales de 60  $\mu$ m.

Las rebanadas fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, fijadas con un gradiente de etanol (0-100%) y rehidratadas con el mismo para después incubarlas en 0.1% Violeta de cresilo a 60 °C durante 20 min, enguajadas con H<sub>2</sub>O, diferenciadas con 70% etanol y deshidratadas con un gradiente de etanol (0-100%). Finalmente, las rebanadas fueron clarificadas con xileno y montadas con un cubreobjetos con Permount Mounting Medium (Fisher Chemical). Las rebanadas teñidas fueron visualizadas en un Axio Zoom.V16 en un objetivo Plan-NEOFLUAR Z 1.0x/0.25 FWD 56mm y magnificación 20x para las imágenes de rebanada completa y 125x para las imágenes de corteza y estriado. Las imágenes fueron

retocadas estéticamente en Fiji 1.53, con los parámetros *remove background -500 px ball radius -separate colors y enhance contrast -0.3% px*.

#### 4.7. Ensayo de actividad de histona desacetilasas (HDAC)

La actividad de las histonas desacetilasas se midió en las rebanadas coronales del cerebro de ratón, en distintas condiciones experimentales. Se colectaron rebanadas coronales de 1 mm separadas por hemisferios contralateral e ipsilateral al infarto en 24 h y 7 d después de la cirugía en 1 ml de buffer no desnaturizante (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM EDTA, Roche Protease Inhibitor Cocktail) y se disgregó el tejido con un sonicador ultrasónico (Branson sonifier 250, *output 2, duty cycle 20*, 12 s) en hielo. Se utilizó el kit In Situ HDAC Activity Fluorometric Assay Kit (Sigma-Aldrich) con 98 µl de suspensión celular cerebral que fueron incubados con 2 µl de sustrato HDAC durante 1 h a 37 °C y el resto de las especificaciones del fabricante. La fluorescencia del sustrato acetilado fue medida en un espectrofotómetro (Ex/Em = 368/442 nm) y normalizada al promedio de 3 experimentos independientes de la fluorescencia de la condición sham + vehículo contralateral a las 24 h o 7 d según corresponda, por lo que los resultados presentados indican la actividad de HDACs relativa a sham + vehículo contralateral. Las gráficas fueron creadas con el paquete *ggplot2* y la significancia estadística fue evaluada con una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc de Tukey HSD en R 4.1.1.

## 5. Resultados

### 5.1. Establecimiento del modelo de infarto y administración de Aza

Ratones C57BL/6 machos fueron sometidos a MCAO durante 60 min y tratados con Aza o vehículo. Aza es un inhibidor farmacológico de la actividad de las DNMTs, al ser un análogo de la citidina, se une a las DNMTs e inhibe la reacción de transferencia del donador del grupo metilo (SAM) tanto en la metilación de DNA de mantenimiento como la *de novo*. El tratamiento con Aza nos permitió conocer el impacto de la metilación de DNA en respuesta al infarto, que fue evaluado en el tamaño de la lesión, la expresión genética, la sobrevivencia y la conducta motora de los animales.

Primero, evaluamos la muerte celular por medio de tinción de violeta de cresilo, que tiñe los cuerpos de Nissl neuronales alrededor del núcleo. Las células al estar sometidas a un proceso de neurodegeneración presentan una marca menos intensa de cuerpos de Nissl y como podemos observar en la figura 2, que la oclusión vascular produce una neurodegeneración principalmente en el estriado ipsilateral a la oclusión, además de dañar discretamente la corteza somatosensorial primaria, que son las zonas que normalmente sufren muerte al bloquearse la arteria cerebral media. No se presentaron diferencias en la muerte celular con el tratamiento con Aza sin infarto y tampoco en el tamaño y localización del infarto con el tratamiento con Aza con respecto a vehículo.

Además del área donde ocurre la oclusión, el núcleo del infarto, el tejido circundante también es dañado, y este es el que tiene un potencial mayor de recuperación (98–100). Bajo este contexto, analizamos el daño provocado por el infarto en el área CA1 del hipocampo, que puede dañarse por MCAO (101). En la figura 3 podemos observar la pérdida de los procesos neuronales 24 h después de MCAO en neuronas piramidales de CA1 ipsilateral, tanto en el tratamiento con Aza como en el vehículo, aunque no se observan diferencias claras entre el daño causado por Aza con respecto al vehículo.

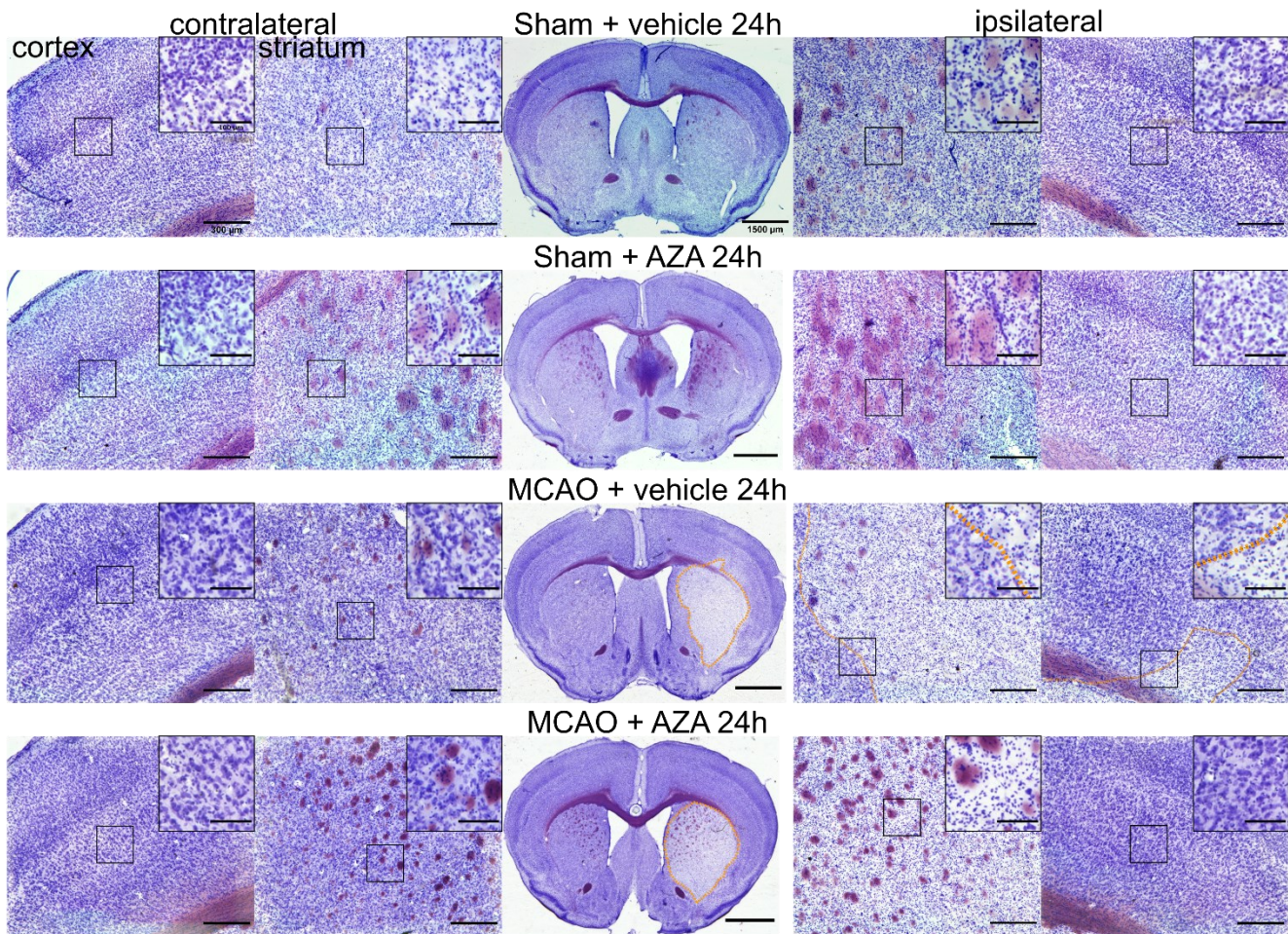
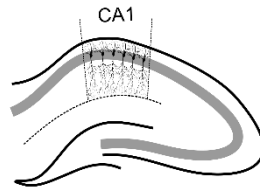


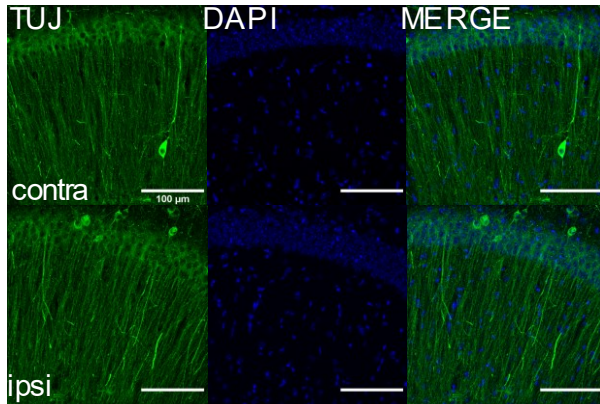
Figura 2. Evaluación del daño al tejido cerebral debido al infarto a las 24 h posteriores a la isquemia cerebral. Micrografías representativas de rebanadas coronales de 60  $\mu\text{m}$  de ratones que fueron sometidos a MCAO y administrados i.c.v. con Aza o vehículo y teñidos con violeta de cresilo para evaluar la muerte celular. Se aprecia la delimitación del infarto en línea naranja principalmente en el estriado y una pequeña parte de la corteza somatosensorial primaria, en donde las células presentan núcleos apoptóticos y necróticos. La imagen central muestra una rebanada donde se presenta el infarto, las imágenes a la izquierda y derecha muestran magnificaciones de la corteza y estriado contra e ipsilaterales, respectivamente, así como una magnificación digital de cada imagen donde se aprecian células individuales.

### 5.2. La inhibición de las DNMTs mejora la recuperación dendrítica después de 7 d al infarto

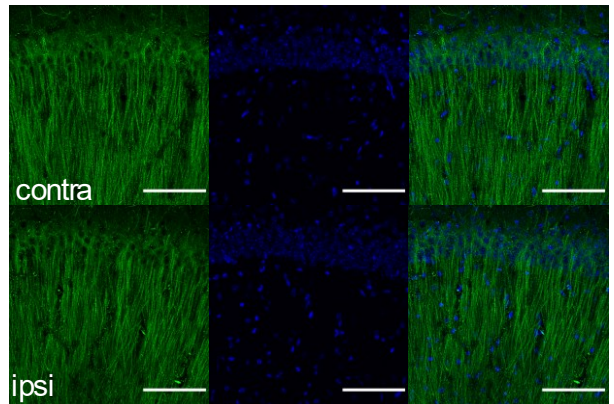
Dado que a las 24 h no se observó ningún cambio en el tratamiento con Aza en los tamaños de infarto, decidimos probar a los 7 d de reperfusión para comprobar si manipulaciones en la metilación del DNA podrían afectar la recuperación. En la figura 4 se observa la tinción de violeta de cresilo después de 7 d al infarto. Se aprecia una recuperación del tejido dañado tanto



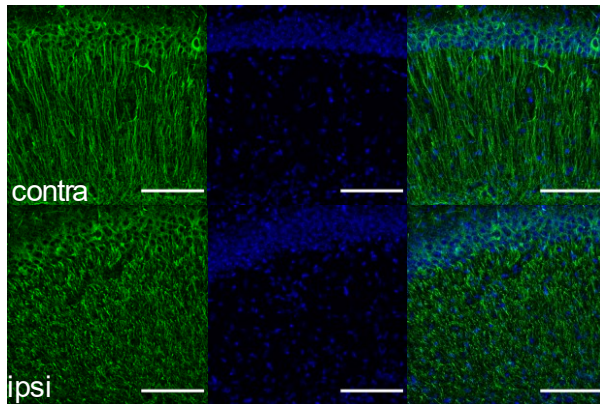
Sham + vehicle 24h



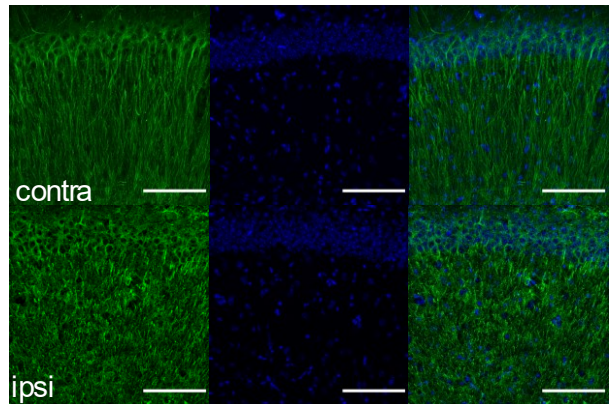
Sham + AZA 24h



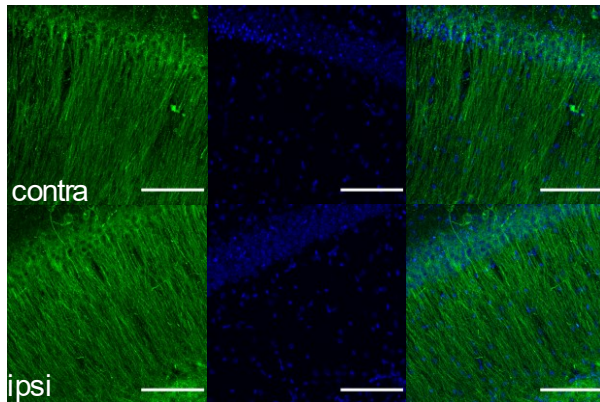
MCAO + vehicle 24h



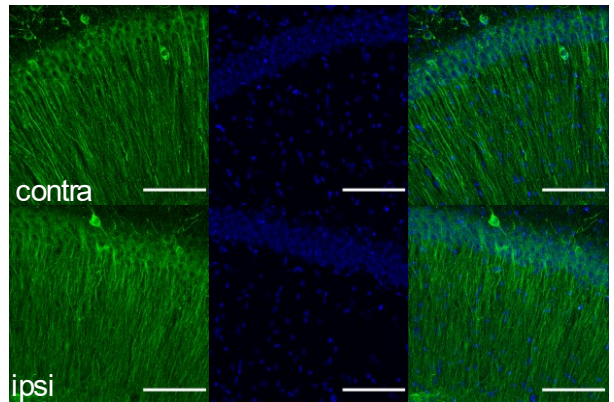
MCAO + AZA 24h



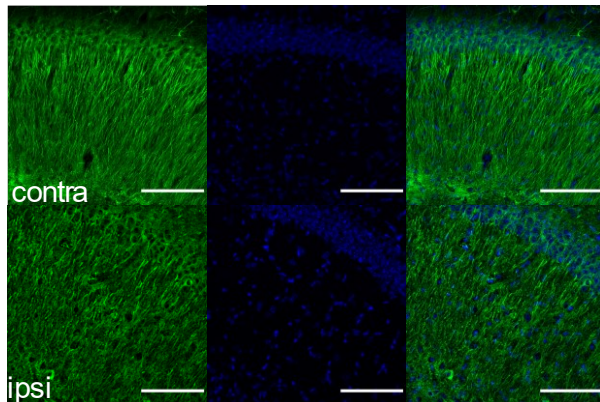
Sham + vehicle 7d



Sham + AZA 7d



MCAO + vehicle 7d



MCAO + AZA 7d

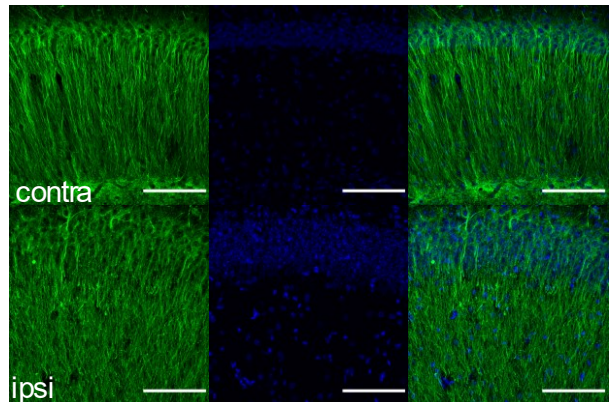


Figura 3. El tratamiento con Aza mejora la recuperación neuronal después de 7 d de infarto. Evaluación de la integridad dendrítica por medio de inmunofluorescencia contra TUJ1. Micrografías representativas de rebanas coronales de 60  $\mu\text{m}$  de ratones que fueron sometidos a MCAO y administrados i.c.v. con Aza o vehículo. Se aprecia la capa de células piramidales de CA1 del hipocampo y su árbol dendrítico apical. Se observa la pérdida de procesos neuronales después de 24 h al infarto, tanto en el tratamiento con Aza como en el vehículo en el hemisferio ipsilateral a la lesión. Se aprecia una mejoría en la recuperación de los procesos después de 7 d con el tratamiento de Aza con respecto a vehículo.

en el tratamiento con Aza como con vehículo y no se distinguen diferencias entre los tratamientos. También analizamos el impacto en los procesos dendríticos en CA1 a los 7 d del infarto. En la figura 3 notamos que una mayor recuperación de los procesos neuronales en el tratamiento con Aza con respecto a vehículo después de MCAO en el hipocampo ipsilateral a la lesión.

### 5.3. Cambios en la expresión y metilación de DNA después de 7 d al infarto

Por medio de RT-qPCR se determinó el nivel de expresión genética de ROBO4 y BEX2, y además analizamos a GAP43, que es un marcador de crecimiento y regeneración axonal después del daño neuronal (102) para evidenciar cambios en la regeneración axonal después del daño neuronal mediados por Aza. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al alza en el hemisferio ipsilateral en la condición MCAO + Aza con respecto a MCAO + vehículo, tanto en los mensajeros de ROBO4 ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 3.1235, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0368) y BEX2 ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 1.4607, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0088) como se muestra en la figura 5, lo que sugiere que la Aza podría estar favoreciendo la desmetilación de los promotores de estos genes y favorecer la recuperación del tejido. Además, se observa un aumento significativo en la expresión de ROBO4 en la condición MCAO + Aza con respecto a vehículo + Aza ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 3.2014, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0327) en el mismo hemisferio ipsilateral.

Aunque se aprecia una clara tendencia al alza en la condición MCAO + Aza con respecto a MCAO + vehículo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el mensajero de GAP43 ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 0.6908, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.9843) ni en ninguna comparación de condiciones ni hemisferios (figura 5).

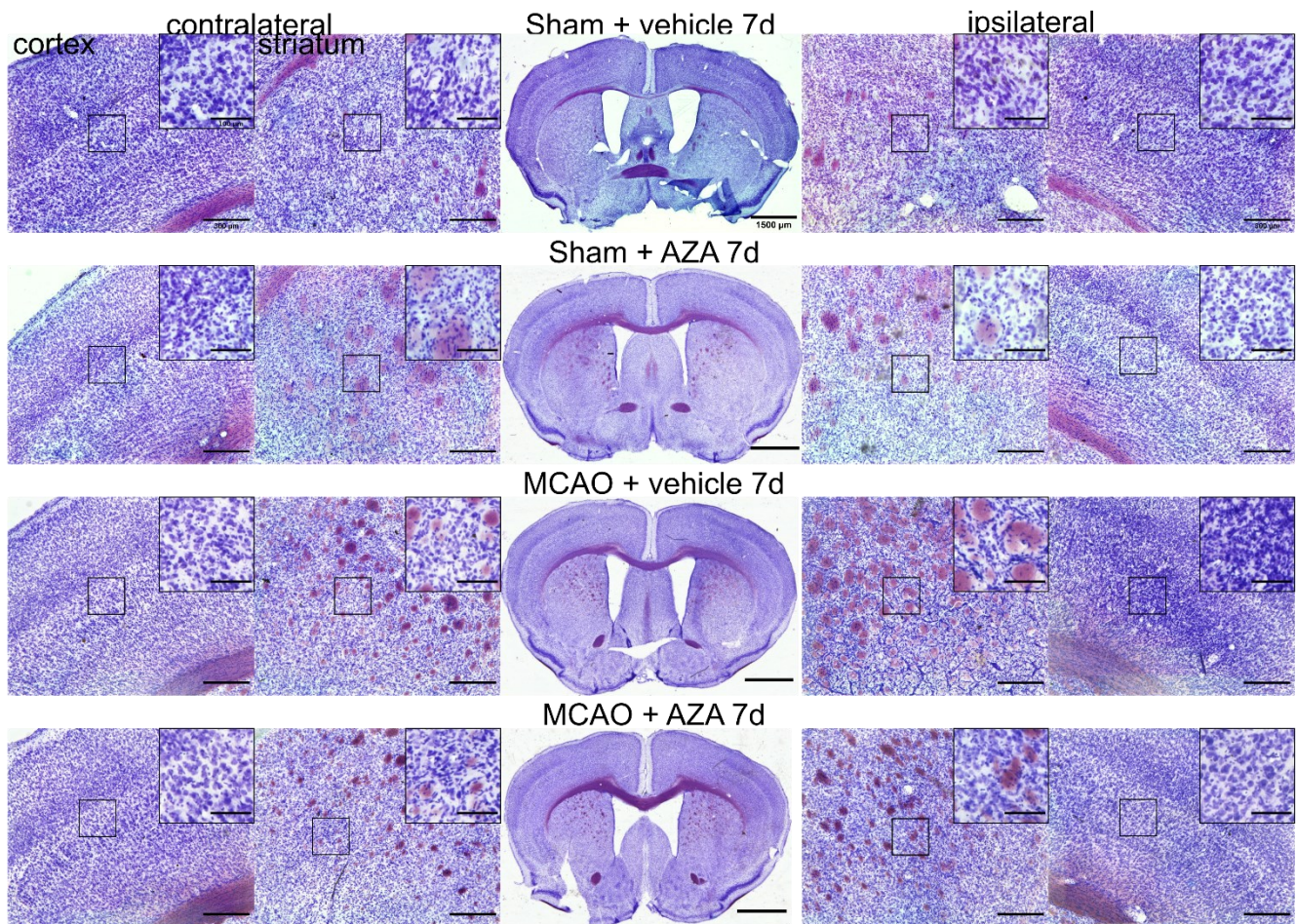
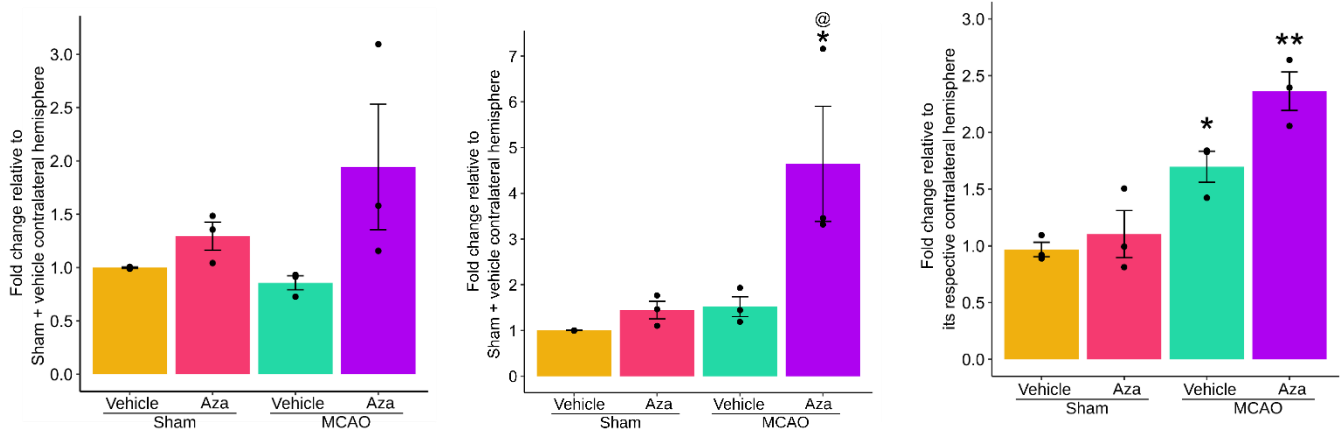


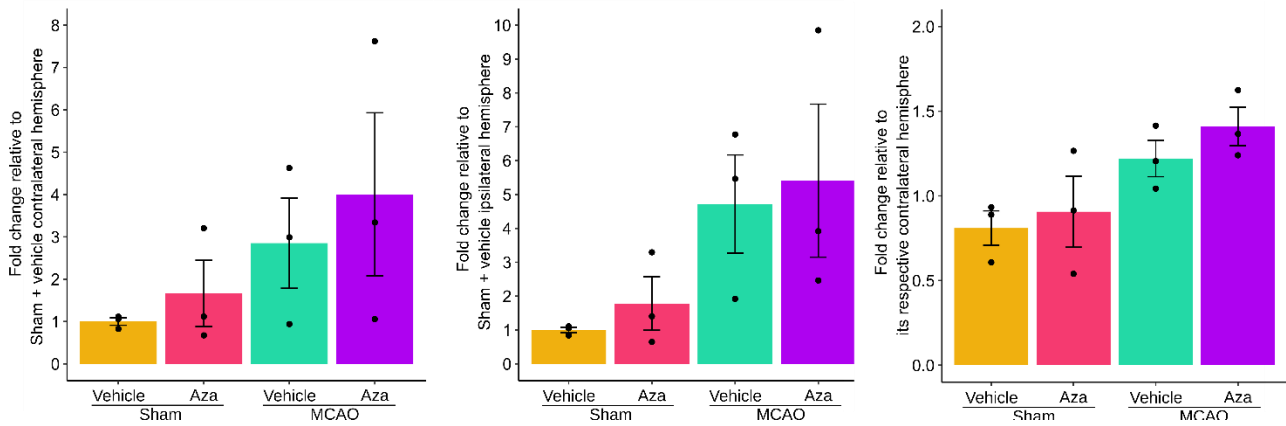
Figura 4. Evaluación del daño al tejido cerebral debido al infarto a los 7 h posteriores a la isquemia cerebral. Micrografías representativas de rebanas coronales de 60 µm de ratones que fueron sometidos a MCAO y administrados i.c.v. con Aza o vehículo y teñidos con violeta de cresilo para evaluar la viabilidad celular. Se aprecia la recuperación del tejido tanto en el tratamiento con Aza y el vehículo. La imagen central muestra una rebanada donde se presenta el infarto, las imágenes a la izquierda y derecha muestran magnificaciones de la corteza y estriado contra e ipsilaterales, respectivamente, así como una magnificación digital de cada imagen donde se aprecian células individuales.



## ROBO4



## GAP43



## BEX2

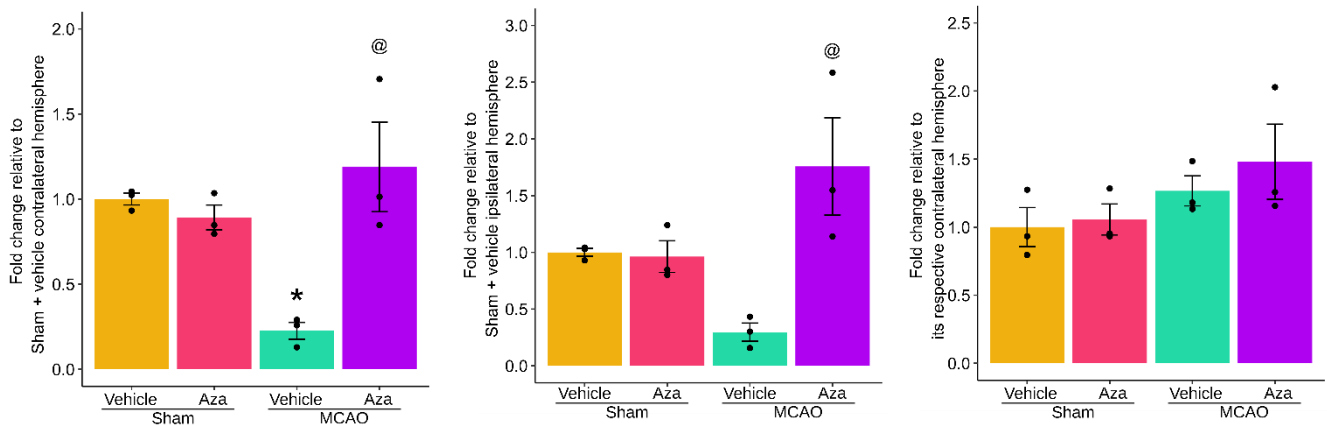


Figura 5. Cambios en la expresión genética debidos al infarto 7 d posteriores a la isquemia cerebral. De arriba hacia abajo, RT-qPCR de ROBO4, GAP43 y BEX2 mostrando los cambios en el hemisferio contralateral (panel izquierdo), ipsilateral (panel central) y en el ipsilateral con respecto al contralateral (panel derecho). Se muestran 3 experimentos independientes y sus medias  $\pm$  SEM. @ =  $p < 0.05$  con respecto a vehículo, \* =  $p < 0.05$  con respecto a sham, \*\* =  $p < 0.005$  con respecto a sham.

Asimismo, en la figura 5 se muestran diferencias estadísticamente significativas al alza en el hemisferio ipsilateral en la condición MCAO + Aza con respecto al hemisferio contralateral en la condición sham + Aza en el mensajero de ROBO4 ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 1.2599, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0018), lo que sugiere que la regulación de la angiogénesis se favorece en el hemisferio afectado. Contrariamente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el hemisferio ipsilateral con respecto al contralateral en el mensajero de BEX2 en la condición MCAO + Aza con respecto a vehículo + Aza ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 0.4242, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.3723), ni en ninguna otra condición en la comparación de hemisferios. Esto sugiere un efecto global en el cerebro del tratamiento con Aza, ya que está reportado que el hemisferio contralateral también sufre modificaciones en la expresión genética después del infarto (103, 104).

La metilación de una zona del promotor proximal con sitios CpG de dichos genes también se analizó en las distintas condiciones para correlacionar la expresión con su respectiva metilación de DNA por medio de MS-HRM. Al tratar las muestras previamente con bisulfito, los productos de PCR originados de alelos metilados tendrán secuencias distintas por su contenido en GC a las de los alelos no metilados. Los productos tendrán diferentes secuencias y por lo tanto diferentes perfiles de fusión, que se pueden comparar con estándares en los que se conozca su estado de metilación. En la figura 6 se observan dichos perfiles de fusión contrastados con estándares 100-0% metilados para los genes ROBO4, BEX2 y GAP43.

Tomando en cuenta los niveles de metilación basal en los tratamientos Sham (figura 6), se observaron cambios evidentes en los perfiles de metilación en los distintos genes en los diferentes tratamientos, particularmente en MCAO + Aza que tiene una disminución mayor en la metilación con respecto a los demás tratamientos, lo que parcialmente corresponde con los resultados obtenidos por RT-qPCR, ya que aunque no se encontraron diferencias significativas en la expresión de GAP43, sí se observa una disminución en la metilación de su promotor (figura 6) que correlaciona con una tendencia a la sobreexpresión en MCAO + vehículo y MCAO + Aza. Asimismo, la disminución en la expresión de BEX2 en MCAO + vehículo (figura 5) se refleja en una metilación cualitativamente más alta con respecto a las demás condiciones (figura 6), lo que nos indica que estos cambios en los mensajeros podrían deberse a la desmetilación de sus promotores por la Aza.

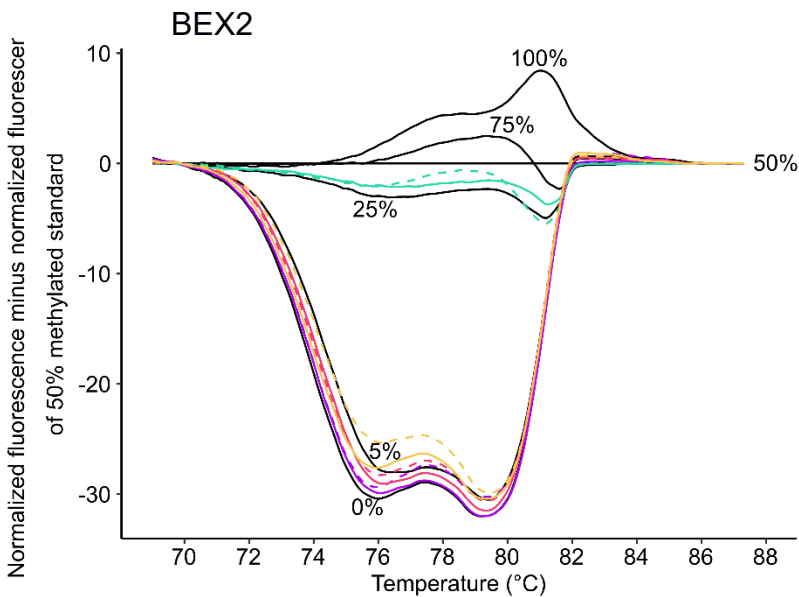
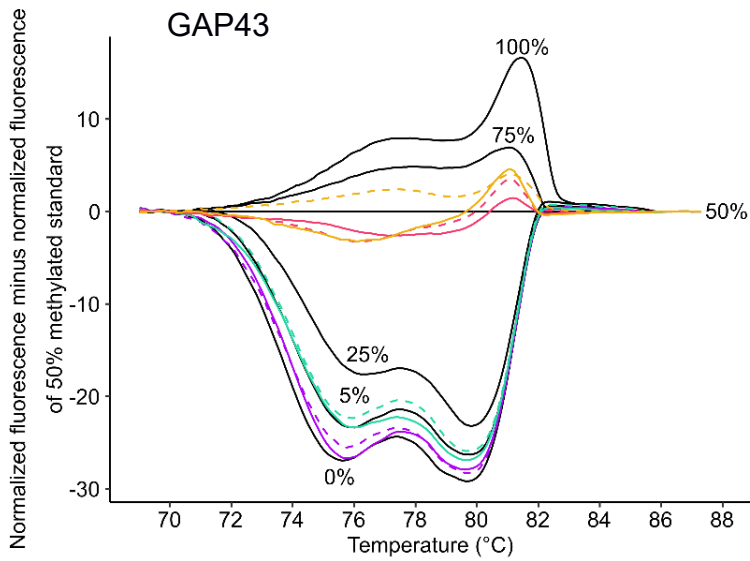
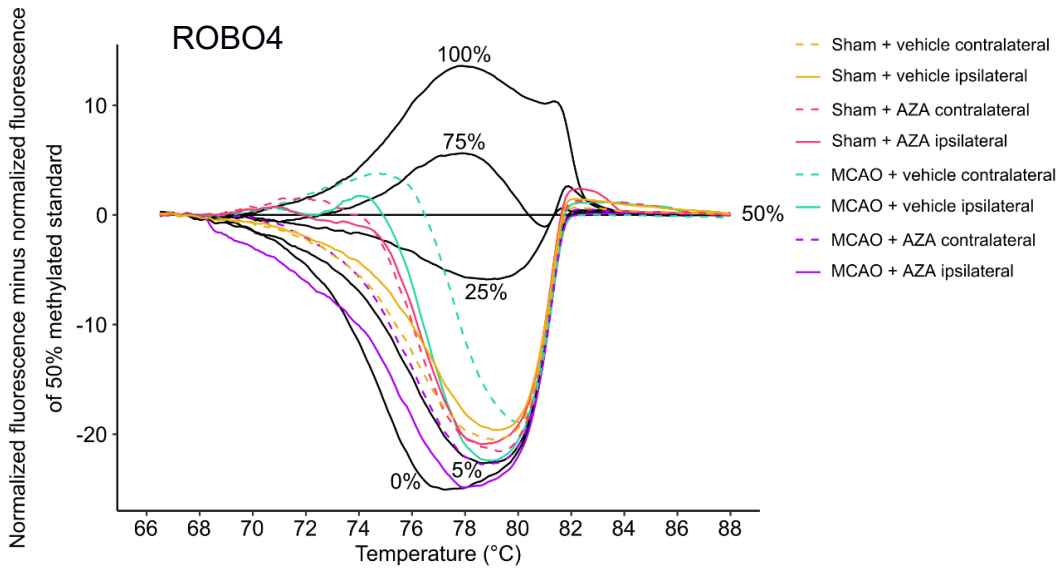


Figura 6. El tratamiento con Aza disminuye la metilación de promotores génicos a los 7 d después del infarto. Cambios en la metilación de DNA debidos al infarto 7 d posteriores a la isquemia cerebral, de arriba hacia abajo, curva de *melting* derivativa del análisis de MS-HRM mostrando los cambios en los distintos tratamientos con respecto a estándares 0-100% metilados. Se muestra la fluorescencia normalizada del producto del promotor proximal con sitios CpG amplificado menos la fluorescencia normalizada del estándar 50% metilado.

analizar la actividad de las HDACs en respuesta al infarto y a la administración de Aza. En la figura 7 se observa la actividad de estas enzimas por medio de un ensayo fluorométrico. Después de 24 h al infarto no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones con respecto a los animales sham + vehículo, tanto en los hemisferios contralateral y ipsilateral a la lesión (figura 7). Esto es entendible, ya que estas modificaciones implican cambios transcripcionales y traduccionales que posiblemente en esta ventana de tiempo tal vez no sea posible observar. Después de 7 d al infarto se aprecia una reducción estadísticamente significativa en MCAO + Aza, tanto en el hemisferio contralateral ( $n = 3$ , *mean activity difference* = 43.17%, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0460) como en el ipsilateral ( $n = 3$ , *mean activity difference* = 74.01%, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0003) con respecto a sus tratamientos vehículo, lo que sugiere que el tratamiento con Aza, al disminuir los sitios metilados en el genoma, disminuye a su vez los sitios de actividad represora de las HDACs, son necesarios más ensayos para verificar que dichos sitios de desmetilación sean concurrentes con la actividad de las histona acetilasas (HACs) que promueven la transcripción genética en los genes que se sobre o sub expresan en respuesta al infarto y al tratamiento con Aza.

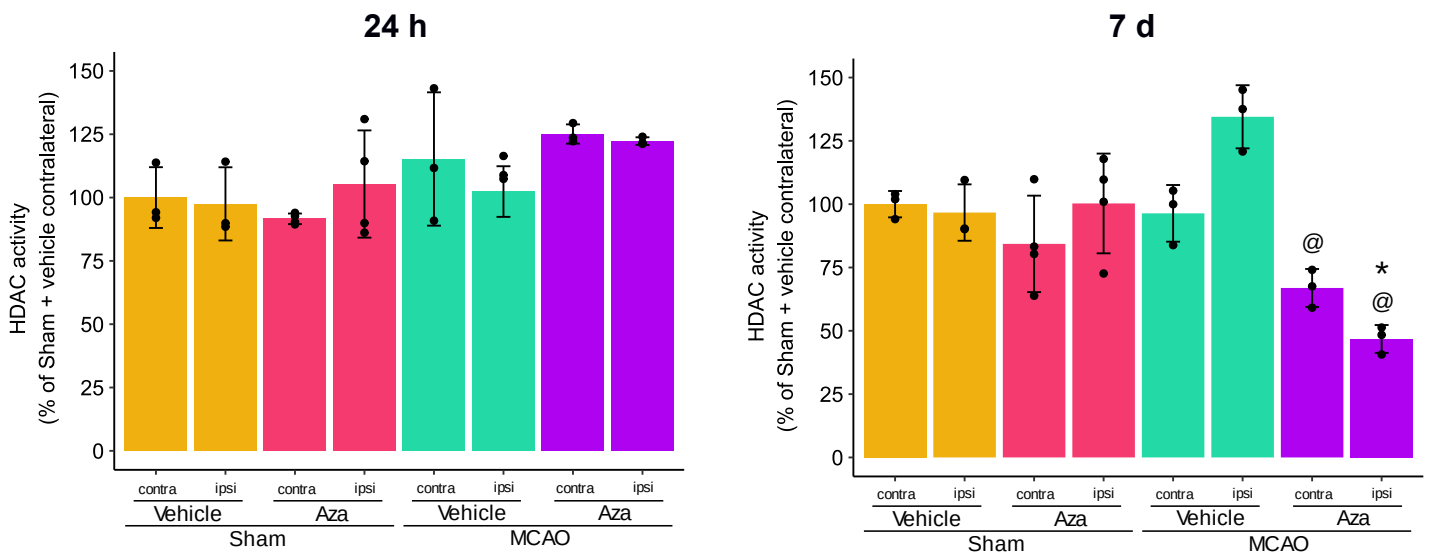


Figura 7. La actividad de histona desacetilasas (HDAC) disminuye en el tratamiento con Aza después del infarto. Cambios en la actividad de HDACs a las 24 h (izquierda) y 7 d (derecha) en los diferentes tratamientos. Se muestra la fluorescencia del sustrato acetilado como medida de la actividad de las enzimas normalizada al tratamiento sham + vehículo tanto a las 24 h como a los 7 d después de la cirugía. Se muestran 3 experimentos independientes y sus medias  $\pm$  SEM. @ =  $p < 0.05$  con respecto a vehículo, @@@ =  $p < 0.0005$  con respecto a vehículo, \* =  $p < 0.05$  con respecto a sham.

#### 5.4. Cambios motores y supervivencia después del infarto

Para comprobar el efecto en la supervivencia de los animales modelamos la probabilidad de supervivencia de los animales en las diferentes condiciones por medio de un análisis de Kaplan-Meier que se muestra en la figura 8. En congruencia con reportes previos, se encontró una menor probabilidad de supervivencia a los 7 d posinfarto, sin embargo, existe una diferencia estadísticamente significativa en la supervivencia de los animales administrados con Aza (figura 8). Lo que sugiere un efecto neuroprotector de la desmetilación del DNA.

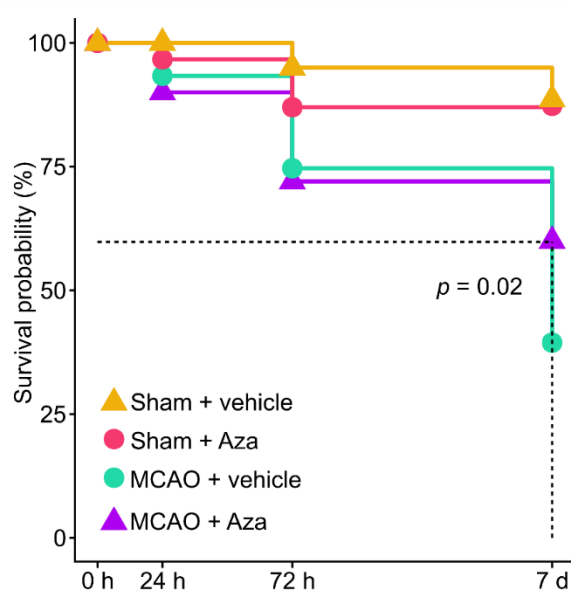


Figura 8. El tratamiento con Aza aumenta la supervivencia después del infarto. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier para los diferentes tratamientos antes, 24 h, 72 h y 7 d después de la cirugía. Se muestra la probabilidad de supervivencia de 12 animales en cada punto temporal y el valor de  $p$  de una prueba *log-rank*.

El déficit neurológico de los animales sometidos a los distintos tratamientos se determinó por medio de 3 pruebas que evalúan la capacidad motora. En la figura 9 podemos observar dichas pruebas y específicamente, en la prueba del poste hay una mejora desde las 72 h posinfarto con el tratamiento de Aza, y esta mejora continua hasta los 7 d (figura 9A), encontrándose una mejoría estadísticamente significativa en el tratamiento MCAO + Aza con respecto a MCAO + vehículo ( $n = 12$ , *mean time difference* = 2.0417 s, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0467), que incluso recupera su nivel con respecto a los ratones sham + Aza ( $n = 12$ , *mean time difference* = 0.5208 s, *adjusted Tukey post-hoc p* = 1.0000), lo que no sucede en el tratamiento MCAO + vehículo, en donde aún hay diferencias con la condición sham + vehículo (figura 9A,  $n = 12$ , *mean time difference* = 2.6042 s, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0013).

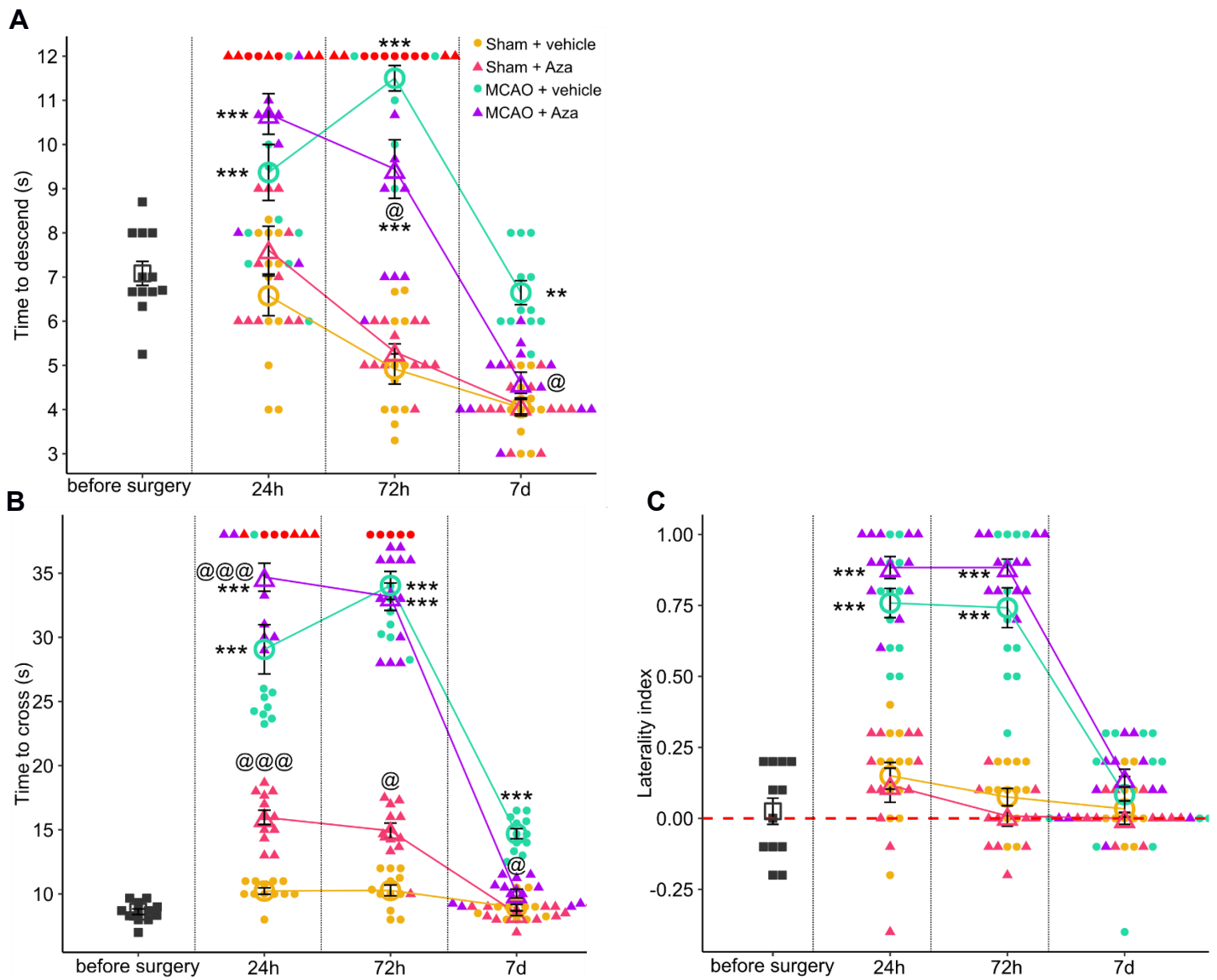


Figura 9. El tratamiento con Aza mejora la conducta motora en respuesta al infarto cerebral. Ensayos conductuales que muestran el déficit motor de los animales antes, 24 h, 72 h y 7 d después de la cirugía. A) Prueba del poste, se muestra el tiempo que tardó el animal en bajar de la punta del poste hacia su caja. B) Prueba de la viga estrecha, se muestra el tiempo que tardó el animal en cruzar el puente estrecho elevado hacia una caja oscura. C) Prueba de la esquina, se muestra el índice de lateralidad (0 = igual número de giros a la izquierda y a la derecha, 1 = todos los giros hacia la izquierda). Los símbolos en rojo representan animales que no pudieron realizar la prueba, por caída o imposibilidad motora, se les asigna el tiempo máximo que un animal de cualquier grupo tardó en realizar la prueba exitosamente, 12 s en caso de la prueba del poste y 38 s en caso de la prueba de la prueba de la viga estrecha. Se muestran las medias de 4 intentos consecutivos de 12 animales y las medias por tratamiento  $\pm$  SEM en el caso de la prueba de la viga estrecha y la prueba del poste. En el caso de la prueba de la esquina se muestra el índice de lateralidad obtenido de 20 intentos consecutivos de la prueba de 12 animales y las medias por tratamiento  $\pm$  SEM. @ =  $p < 0.05$  con respecto a vehículo, @@@ =  $p < 0.0005$  con respecto a vehículo, \*\* =  $p < 0.005$  con respecto a sham, \*\*\* =  $p < 0.0005$  con respecto a sham.

En la prueba de la viga estrecha (figura 9B) se encontró un aumento en el déficit motor en el tratamiento de MCAO + Aza con respecto a MCAO + vehículo a las 24 h ( $n = 12$ , *mean time difference* = 5.6243 s, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0004), que se iguala a las 72 h y se revierte a los 7 d ( $n = 12$ , *mean time difference* = 4.4924 s, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0182), encontrándose una mejoría estadísticamente significativa en el tratamiento MCAO + Aza que incluso recupera su nivel con respecto a los ratones sham + Aza ( $n = 12$ , *mean time difference* = 1.7042 s, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.9946), que de manera discrepante no sucede en el tratamiento MCAO + vehículo, en donde aún hay diferencias con la condición sham + vehículo (figura 9B,  $n = 12$ , *mean time difference* = 5.7563 s, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0002). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prueba de la esquina a los 7 d posinfarto en ninguno de los tratamientos (figura 9B), esto puede deberse a una falta de sensibilidad de la prueba o a errores en la aplicación de esta. En general, los datos de conducta motora sugieren que el tratamiento con Aza disminuye el déficit neurológico motor después de 7 d al infarto.

## 6. Discusión

### 6.1. Cambios en la metilación de DNA posinfarto y su escala temporal

La contribución de la metilación del DNA en los procesos fisiopatológicos relacionados al infarto/reperfusión se analizó en un modelo murino, inhibiendo la actividad de las DNMTs en el cerebro, con la administración de Aza i.c.v. Nuestros hallazgos sugieren que, por lo menos a partir de etapas posagudas al infarto ( $\geq 7$  d), el tratamiento con Aza mejora la recuperación de los procesos neuronales hipocampales (figura 3) y la expresión de genes relacionados con la angiogénesis y neurogénesis (figura 5). Esto se refleja en menores déficits motores medidos en las pruebas conductuales (figura 9) y en una menor mortalidad de los animales (figura 8).

La cuantificación de la metilación global en el cerebro es compleja, ya que existen múltiples linajes celulares que responden de manera específica a un estímulo, y estos a su vez se corregulan unos a otros, pero de manera general se ha cuantificado la metilación cerebral en modelos de infarto a lo largo del tiempo y se ha encontrado, por ejemplo, que por medio de inmunohistofluorescencia, la señal de 5-meC aumenta considerablemente desde 7 d después del infarto y se mantiene por lo menos hasta las 12 semanas tanto en el hemisferio ipsilateral como en el contralateral (105).

Dada la gran variabilidad en la implementación experimental en los modelos de infarto cerebral y los numerosos mecanismos moleculares coocurriendo después del infarto, es difícil estimar el tiempo de recuperación espontánea posinfarto. Sin embargo, numerosos estudios han mostrado que, por lo menos en modelos murinos de infarto cerebral con reperfusión, 7 d después de la inducción de la lesión, se pueden comenzar a medir los primeros mecanismos de recuperación. En animales sometidos a MCAO se reportó que, después de 7 d de reperfusión, se pierden las diferencias estadísticamente significativas respecto al control en la prueba de coordinación motora *rotarod* (106), y en otro estudio se observó que la recuperación puede comenzar desde los 3 d después del infarto (107).

En un modelo de MCAO permanente, se ha visto que los ratones comienzan a mejorar a los 7 d después del infarto en una prueba de fallas de patas, en donde se mide la precisión en el



posicionamiento correcto de las patas al caminar sobre una reja, así como en una prueba de habilidad motora fina de alcance de pellet a través de ranuras (108). Asimismo, en un modelo de infarto por fototrombosis, se comprobó el inicio de la recuperación a los 7 d después del infarto en la misma prueba de fallas de patas (109). De la misma manera, por medio de imagenología de alta resolución en 2D, observó que el flujo sanguíneo cerebral se recupera a los 7 d en un modelo de fototrombosis (110).

## 6.2. El papel de las HDACs en la fisiopatología del infarto cerebral

Una vez metilado el DNA, las HDACs eliminan las marcas de acetilación de las histonas para reprimir la transcripción. Nuestros resultados sugieren que, al inhibir la metilación, las HDACs disminuyen su actividad y este proceso podría estar involucrado en la expresión de genes que promuevan la neuroregeneración como BEX2 y la angiogénesis como ROBO4. El uso de inhibidores de HDACs está ampliamente discutido como posible terapéutica contra el daño isquémico (111). La administración de TSA (*Trichostatin A*), un inhibidor de la mayoría de las HDACs, disminuye el déficit neurológico después del infarto y ratones knockout de HDAC2 específicos de neuronas corticales (HDAC2<sup>flox/flox</sup>Emx1-CRE<sup>+/-</sup>) también disminuye el daño neuronal medido por medio de pruebas conductuales (112).

Sin embargo, al usar un inhibidor farmacológico específico de HDAC1, en un modelo murino de infarto por administración de endotelina 1, se reportó un incremento en la producción de ROS, citocinas inflamatorias, apoptosis neuronal, daño al DNA y déficit neurológico (113). Por lo que no es posible concluir aún que la inhibición de la actividad de las HDACs ya sea directamente con inhibidores o indirectamente con la disminución en la metilación del DNA, tenga un papel importante en la búsqueda de terapéuticas a la isquemia cerebral. Probablemente los resultados contradictorios se deban a la contribución célula específica de las HDACs y a cada tipo distinto de HDAC, que puedan ser benéficas para las neuronas, pero perjudiciales para los otros tipos celulares en el cerebro y además a los tiempos de intervención, que se sabe son muy importantes a la hora de diseñar estrategias para disminuir el daño.

### 6.3. La metilación del DNA y la neurogénesis después del infarto

Fuera del desarrollo, la metilación del DNA ocurre tanto en la replicación de DNA y *de novo* bajo célula y contexto específicos, por lo que la actividad de Aza en el cerebro tiene efectos diferentes en distintas células. En células que proliferan (astrocitos, células endoteliales, células troncales neuronales [NSCs], microglía, etc.) Aza desmetila activamente el genoma en cada ciclo de replicación. En las neuronas maduras, Aza impide la metilación dinámica *de novo* que puede ocurrir en respuesta a un estímulo (114) y es necesaria para la actividad neuronal normal (115).

Esta metilación dinámica no solo depende de las DNMTs, sino también de las TETs. Está reportado que, en un modelo murino de daño neuronal periférico, TET3 es necesaria para la regeneración axonal ya que desmetila activamente potenciadores distales de genes relacionados con este proceso. Además, la inhibición de su expresión por medio de siRNAs disminuye el potencial regenerativo neuronal e incrementa el daño neurológico en el nervio ciático (116).

A pesar de que las neuronas no expresan DNMT1, dado que son células posmitóticas, sí tienen expresión de DNMT3A/B, por lo que pueden modificar la metilación de sus genes *de novo* bajo contextos específicos. La sobreexpresión de DNMT3A2 incrementa la consolidación de la memoria y modifica la expresión de genes relacionados con la plasticidad neuronal (117) y un *knockout* de la misma enzima provoca déficits en el aprendizaje y memoria (118).

Recientemente, se demostró que durante el proceso de diferenciación de las células progenitoras neuronales (NPCs) hacia neuronas maduras, existen procesos tanto de desmetilación como de metilación *de novo* a nivel genómico, y que ratones *knockout* Nestin::Cre-ERT2/Dnmt3a<sup>(fl/fl)</sup>/Dnmt3b<sup>(fl/fl)</sup> presentan el mismo número de neuronas diferenciadas pero con procesos más pequeños, menor número y tamaño de espinas dendríticas, y con memoria y aprendizaje comprometidos con respecto a WT (119). Consecuentemente, la metilación de DNA podría tener un papel preponderante en la neurogénesis después del infarto. Sin embargo, no se conocen los efectos de la interacción entre Aza, la metilación *de novo* y la neurogénesis después del infarto.

Contrastantemente, la neurogénesis en el infarto puede tener efectos tanto positivos o negativos en la recuperación neurológica. Existe un déficit en el aprendizaje y memoria dependiente del hipocampo en etapas crónicas (>35 d) después del infarto, y que existe una correlación con la neurogénesis hipocampal con el déficit neurológico (120). Estas nuevas neuronas presentan una morfología aberrante que no pueden integrarse al circuito de la vía perforante de la corteza entorrinal. En el mismo estudio se reportó que incrementando la tasa neurogénica por medio de ejercicios motores o de manera farmacológica, el daño neurológico después de MCAO aumenta con respecto a ratones sin ningún tipo de manipulación posinfarto. Contrariamente, inhibiendo la neurogénesis de manera genética (Nestin::Cre-ERT2/NSE-DTA) o farmacológica, existe un menor déficit en memoria y aprendizaje después del infarto (120).

Por lo que se puede especular, que después de un infarto existe un proceso neurogénico, dependiente de metilación *de novo*, que no necesariamente ayuda a la recuperación de la función cerebral, por lo que inhibiendo parcialmente a DNMT3A/B con Aza, se podría estabilizar este proceso ya sea disminuyéndolo o modificando los genes responsables de la maduración neuronal aberrante.

La expresión de OLIG2 (*Oligodendrocyte Transcription Factor 2*) se incrementó en el área periinfarto a los 7 d después del infarto, y se mantiene hasta por lo menos a los 28 d al infarto junto con un aumento de APC (110), lo que sugiere que la oligodendrogenesis como mecanismo de recuperación de la función neuronal existe desde los 7 d posinfarto. Recientemente, se demostró que TET1 es necesaria para la remielinización del tejido cerebral después de una lesión en el cuerpo caloso por L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina (LPC) y que su ablación genética causa un déficit neurológico tanto en las conductas motoras como en el aprendizaje y memoria (121).

#### 6.4. Control metabólico y proliferatorio de BEX2 después del infarto

Desde hace algunos años, se ha estudiado el papel de la vía de mTOR (*Mechanistic Target Of Rapamycin*) en el metabolismo y sobrevivencia neuronal después del infarto. La administración i.c.v. de rapamicina aumenta el tamaño de infarto. Concordantemente,

aumentar los niveles de p-S6K1 (*Ribosomal protein S6 kinase beta-1, phosphorylated*), uno de los primeros blancos efectores de la vía, disminuye el tamaño de infarto y la muerte en cultivos primarios de neuronas de rata sometidas a OGD (122). Otro estudio reciente demostró que una dosis i.v. de un inhibidor de tercera generación de mTOR después de MCAO, incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) y disminuye la fosforilación de Akt (*AKT serine/threonine kinase 1, Protein kinase B*), una cinasa involucrada en muchas de las vías de supervivencia neuronal (123).

BEX2, otro blanco efector de mTOR y regulador del ciclo celular, se encontró significativamente regulado a la baja en el tratamiento MCAO + vehículo y con una tendencia al alza en el tratamiento MCAO + Aza después de 7 d del infarto. La expresión de este gen resulta en la sobrerregulación de la vía STAT3/NF- $\kappa$ B-BEX2-VEGF (*Signal transducer and activator of transcription 3/Nuclear Factor Kappa B*) y además, está sobrerregulado en tejidos de glioma y favorece en éstos la migración y proliferación celular regulando a  $\beta$ -catenina (124, 125). Consecuentemente, BEX2 regula la autofagia mediada por mTOR, ya que en células SH-SY5Y, la inhibición de BEX2 por medio de siRNAs disminuye la expresión de LC3-II (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-phosphatidylethanolamine conjugate*) y se promueve la muerte neuronal medida por atrazina (ATR) (91). Por lo que se podría sugerir que la sobreexpresión de BEX2 causada por Aza tendría un efecto neuroprotector después del infarto.

#### 6.5. Control de la angiogénesis y ROBO4

Aunque el proceso angiogénico es vital para la recuperación de la función cerebral después del infarto (126), también se ha demostrado que factores tróficos proangiogénicos como VEGFA pueden provocar una angiogénesis patológica e incluso ser perjudiciales en la prognosis en pacientes con infarto cerebral. En modelos murinos de MCAO se demostró que las administraciones i.v. de VEGFA tienen un incremento en la densidad de macrófagos y fagocitos, además de un daño a la matrix extracelular del tejido cerebral, lo cual podría indicar un proceso de alteración de la permeabilidad de la BBB (127–129); por lo que la regulación precisa de la angiogénesis es un proceso que debe estudiarse para comprender cuáles son los mecanismos que favorecen o comprometen la recuperación neuronal.

Subrayando la importancia del control temporal de la angiogénesis, se ha demostrado que el pico de expresión de TSP1 ocurre a las 24 h después del infarto, y que a los 7 d regresa a su nivel basal (130), por lo que la angiogénesis y neurogénesis regulada negativamente por esta proteína, podría verse facilitada a partir de los 7 d posinfarto. Por otra parte, se ha reportado que el mRNA de PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*), un receptor que promueve la división y migración celular, aumenta a los 7 d posinfarto en un modelo de fototrombosis (110). Estas evidencias sugieren que los procesos angiogénicos deberían estar inhibidos antes de los 7 d y promovidos a partir de los 7 d posinfarto.

ROBO4 puede estabilizar la vía angiogénica mediada por VEGFA, inhibiendo la neovascularización y ayudando a la homeostasis vascular tanto en el desarrollo como en procesos patológicos (1). Además, la anexina 2 (ANXA2), una proteína que regula la permeabilidad endotelial, es un ligando de ROBO4 que activa una vía de señalización que estabiliza las uniones estrechas de las células endoteliales (131). En consecuencia, nuestros resultados que muestran una aparente sobreexpresión del mRNA de ROBO4 y la desmetilación de su promotor debida al tratamiento con Aza después de 7 d de infarto podrían sugerir un efecto en la homeostasis de la angiogénesis, facilitando la recuperación funcional y limitando los efectos tóxicos de la vía de VEGFA.

#### 6.6. *GAP43 como indicador de recuperación neurológica*

En lo que respecta a GAP43, está ampliamente reportado su papel en la regeneración axonal tanto en el desarrollo como después de daño neuronal. Específicamente, se sabe que esta proteína permite a las neuronas sobrevivientes a recuperar sus procesos y reintegrarse a los circuitos funcionales en el cerebro tanto en el infarto como en otras enfermedades neurodegenerativas y en daño traumático cerebral y periférico (102). Asimismo, se ha demostrado que su sobreexpresión después del infarto ocurre desde etapas agudas y subagudas al infarto tanto en modelos experimentales murinos (132) como en el CSF (*Cerebrospinal fluid*) de pacientes con isquemia cerebral (133). Además se sabe que se sobreexpresa con la administración de Aza (134).

Paralelamente, GAP43 se expresa de manera dinámica en CA1 después de procesos de plasticidad neuronal como el aprendizaje visual, memoria, y reconocimiento espacial (135–137). Posiblemente la sobreexpresión de GAP43 a los 7 d posinfarto esté vinculada con el aumento discreto de procesos neuronales en CA1 en el tratamiento MCAO + Aza con respecto a vehículo (figura 3) igualmente a los 7 d posinfarto.

### 6.7. El papel de la metilación de DNA en la rehabilitación posinfarto

La hipermetilación del promotor de SLC6A4 (*Solute Carrier Family 6 Member 4*), gen que codifica el receptor de serotonina (SERT), está asociada con un peor pronóstico después de infarto en pacientes coreanos con respecto a pacientes con infarto con niveles menores de metilación en SLC6A4 (138). Sin embargo, el tratamiento con SSRIs (*Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*), que tendrían un efecto similar que la hipermetilación, al disminuir la actividad de SERT, no mejora la rehabilitación en pacientes con infarto (139, 140).

Recientemente, se reportó que el tratamiento con Aza y una rehabilitación motora con entrenamiento de tarea específica mejora el déficit neurológico, aumenta la expresión de BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) y la plasticidad neuronal en un modelo de fototrombosis (105). Sin embargo, este efecto no se observó con la sola administración de Aza, excepto una mejora en el *score* neurológico, que mide de manera general la habilidad motora y sensorial. Cabe destacar que en ese trabajo se administró Aza hasta después de 4 semanas después del infarto, además de que los infartos presentados son considerablemente más grandes que los realizados en este trabajo por lo que la recuperación sería de cualquier manera más difícil, en consecuencia, no es posible extraer hipótesis acerca de el efecto de la Aza a tiempos agudos y subagudos (0-7 d) posinfarto.

## 7. Conclusiones y perspectivas

Antecedentes del laboratorio sugieren que diversos genes como ROBO4 y BEX2 son diferencialmente expresados en respuesta a OGD en un modelo *in vitro* de isquemia/reperfusión. Con base en estos datos, analizamos la expresión y metilación de DNA de ROBO4, BEX2 y GAP43 como indicador de neuroregeneración, conducta motora y sobrevivencia en un modelo murino *in vivo* de isquemia cerebral con reperfusión.

Nuestros resultados sugieren que la inhibición de la metilación tiene un efecto positivo en la recuperación de los animales a los 7 d posinfarto. Analizando la expresión de mRNA de ROBO4, BEX2 y GAP43 encontramos cambios estadísticamente significativos en la expresión de ROBO4 ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 3.1235, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0368) y BEX2 ( $n = 3$ , *mean fold change difference* = 1.4607, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0088) así como una tendencia al alta en GAP43 en los ratones infartados tratados con Aza con respecto a vehículo. Además, estos datos concuerdan con los cambios cualitativos en los perfiles de *melting* de los promotores de dichos genes y con el decremento de la actividad de HDACs ( $n = 3$ , *mean activity difference* = 74.01%, *adjusted Tukey post-hoc p* = 0.0003) en el hemisferio ipsilateral de los ratones infartados con Aza. Estos resultados preliminares apuntan a que la desmetilación de DNA mediada por Aza aumenta directa o indirectamente la expresión génica y en consecuencia la recuperación funcional.

Aunque no observamos diferencias en los tamaños de infarto en el tratamiento con Aza, encontramos un discreto crecimiento en los procesos neuronales de CA1 que podría estar relacionado con la tendencia al aumento en la expresión de GAP43 en los ratones infartados tratados con Aza a los 7 d después del infarto con respecto al tratamiento con vehículo. De igual manera, registramos una mejora en las pruebas motoras de los ratones infartados tratados con Aza a los 7 d después de infarto con respecto a vehículo y una mayor probabilidad de sobrevivencia.

Podemos hacer notar que nuestros resultados sugieren que la metilación del DNA es un proceso preponderante en la recuperación cerebral después del infarto isquémico. Es relevante analizar un mayor número de genes y de estructuras cerebrales de manera individual que nos den un panorama más preciso de qué es lo que sucede al inhibir la metilación con Aza sobre vías de señalización específicas, aunque estos resultados preliminares apuntan a que después del infarto ocurre una desregulación general de la metilación que está dirigida a primero a la muerte y después a la recuperación en menor medida, por lo que desmetilando los promotores de ciertos genes, permitiendo su expresión, que normalmente no ocurriría en etapas agudas o subagudas después del infarto, favorecería la recuperación y retrasaría los procesos de neurodegeneración que se sabe ocurren tanto en las primeras etapas como en etapas crónicas al infarto.

Adicionales estudios permitirán conocer con más detalle las isoformas específicas de los genes que se transcriben, ya que distintas funciones y contextos celulares podrían estar reguladas por isoformas determinadas de un gen que, a su vez, estarían integradas en varias vías de señalización que concurren en varios tipos celulares en el mismo microambiente, regulando unos a otros la recuperación o muerte neuronal.

Además, son necesarios ensayos en cerebros humanos que hayan sufrido un infarto para corroborar los datos presentados en este trabajo ya que *in vivo* existen multitud de procesos no tomados en cuenta aquí como la permeabilidad de la BBB, la inflamación periférica y de la microglía y la respuesta neuronal hacia los astrocitos después del infarto. Estudiar y entender los mecanismos celulares y moleculares que subyacen este fenómeno es muy importante si se quieren explorar nuevas alternativas terapéuticas ya que actualmente no existe ningún tratamiento eficaz que pueda salvar el tejido neuronal de la muerte y de la discapacidad funcional.



## 8. Bibliografía

1. C. Dai, Q. Gong, Y. Cheng, G. Su, Regulatory mechanisms of Robo4 and their effects on angiogenesis. *Biosci. Rep.* **39**, BSR20190513 (2019).
2. A. Bird, DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6–21 (2002).
3. D. E. Handy, R. Castro, J. Loscalzo, Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation* **123**, 2145–2156 (2011).
4. K. Helin, D. Dhanak, Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature* **502**, 480–488 (2013).
5. A. Portela, M. Esteller, Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1057–1068 (2010).
6. A. P. Wolffe, M. A. Matzke, Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science* **286**, 481–486 (1999).
7. L. Prokopuk, P. S. Western, J. M. Stringer, Transgenerational epigenetic inheritance: adaptation through the germline epigenome? *Epigenomics* **7**, 829–846 (2015).
8. J. A. Law, S. E. Jacobsen, Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 204–220 (2010).
9. V. K. Rakyan, *et al.*, Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine AxinFu allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 2538–2543 (2003).
10. L. Wang, *et al.*, Programming and Inheritance of Parental DNA Methylomes in Mammals. *Cell* **157**, 979–991 (2014).
11. P. Hajkova, *et al.*, Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech. Dev.* **117**, 15–23 (2002).
12. J. Lee, *et al.*, Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Dev. Camb. Engl.* **129**, 1807–1817 (2002).
13. J.-Y. Li, D. J. Lees-Murdock, G.-L. Xu, C. P. Walsh, Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics* **84**, 952–960 (2004).
14. H. Kobayashi, *et al.*, Contribution of Intragenic DNA Methylation in Mouse Gametic DNA Methylomes to Establish Oocyte-Specific Heritable Marks. *PLoS Genet.* **8**, e1002440 (2012).
15. M. Uhlén, *et al.*, Tissue-based map of the human proteome. *Science* **347**, 1260419 (2015).
16. G. Bayraktar, M. R. Kreutz, Neuronal DNA Methyltransferases: Epigenetic Mediators between Synaptic Activity and Gene Expression? *The Neuroscientist* **24**, 171–185 (2018).
17. B. Kadriu, A. Guidotti, Y. Chen, D. R. Grayson, DNA methyltransferases1 (DNMT1) and 3a (DNMT3a) colocalize with GAD67-positive neurons in the GAD67-GFP mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **520**, 1951–1964 (2012).
18. J. S. Noh, *et al.*, DNA methyltransferase 1 regulates reelin mRNA expression in mouse primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 1749–1754 (2005).
19. A. M. Deaton, A. Bird, CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**, 1010–1022 (2011).
20. D. Takai, P. A. Jones, Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 3740–3745 (2002).
21. R. Fenouil, *et al.*, CpG islands and GC content dictate nucleosome depletion in a transcription-independent manner at mammalian promoters. *Genome Res.* **22**, 2399–2408 (2012).
22. D. C. Stephens, G. M. K. Poon, Differential sensitivity to methylated DNA by ETS-family transcription factors is intrinsically encoded in their DNA-binding domains. *Nucleic Acids Res.* **44**, 8671–8681 (2016).
23. C. A. Kemme, R. Marquez, R. H. Luu, J. Iwahara, Potential role of DNA methylation as a facilitator of target search processes for transcription factors through interplay with methyl-CpG-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **45**, 7751–7759 (2017).
24. N. Sasai, M. Nakao, P.-A. Defossez, Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5015–5022 (2010).

25. F. Bohne, *et al.*, Kaiso mediates human ICR1 methylation maintenance and H19 transcriptional fine regulation. *Clin. Epigenetics* **8**, 47 (2016).
26. Y. Zhang, *et al.*, Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* **13**, 1924–1935 (1999).
27. N. Reynolds, *et al.*, NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression: NuRD and PRC2 interact to control gene expression. *EMBO J.* **31**, 593–605 (2012).
28. S. F. Wolf, D. J. Jolly, K. D. Lunnen, T. Friedmann, B. R. Migeon, Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 2806–2810 (1984).
29. P. A. Jones, Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 484–492 (2012).
30. A. K. Maunakea, *et al.*, Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* **466**, 253–257 (2010).
31. K. J. Dębski, *et al.*, Etiology matters – Genomic DNA Methylation Patterns in Three Rat Models of Acquired Epilepsy. *Sci. Rep.* **6** (2016).
32. P. Bailey, *et al.*, Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531**, 47–52 (2016).
33. J.-K. Rhee, *et al.*, Integrated analysis of genome-wide DNA methylation and gene expression profiles in molecular subtypes of breast cancer. *Nucleic Acids Res.* **41**, 8464–8474 (2013).
34. G. B. Dixon, L. K. Bay, M. V. Matz, Evolutionary Consequences of DNA Methylation in a Basal Metazoan. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 2285–2293 (2016).
35. T. E. Keller, P. Han, S. V. Yi, Evolutionary Transition of Promoter and Gene Body DNA Methylation across Invertebrate–Vertebrate Boundary. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1019–1028 (2016).
36. S. S. Virani, *et al.*, Heart Disease and Stroke Statistics—2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **141** (2020).
37. A. Peters, *et al.*, The selfish brain: competition for energy resources. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **28**, 143–180 (2004).
38. M. A. Moskowitz, E. H. Lo, C. Iadecola, The Science of Stroke: Mechanisms in Search of Treatments. *Neuron* **67**, 181–198 (2010).
39. N. L. Weillinger, *et al.*, Ionotropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 39–48 (2013).
40. S. M. Harwood, M. M. Yaqoob, D. A. Allen, Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* **42**, 415–431 (2005).
41. N. Y. Tretyakova, *et al.*, Peroxynitrite-induced DNA damage in the supF gene: correlation with the mutational spectrum. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **447**, 287–303 (2000).
42. J.-C. Baron, H. Yamauchi, M. Fujioka, M. Endres, Selective Neuronal Loss in Ischemic Stroke and Cerebrovascular Disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, 2–18 (2014).
43. S. Manzanero, T. Santro, T. V. Arumugam, Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: Sources and contribution to cell injury. *Neurochem. Int.* **62**, 712–718 (2013).
44. Y. Sun, *et al.*, VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Clin. Invest.* **111**, 1843–1851 (2003).
45. O. Mărgăritescu, D. Pirici, C. Mărgăritescu, VEGF expression in human brain tissue after acute ischemic stroke. *Romanian J. Morphol. Embryol. Rev. Roum. Morphol. Embryol.* **52**, 1283–1292 (2011).
46. A. Baccarelli, *et al.*, Ischemic Heart Disease and Stroke in Relation to Blood DNA Methylation: *Epidemiology* **21**, 819–828 (2010).
47. A. M. Gómez-Úriz, *et al.*, Obesity and ischemic stroke modulate the methylation levels of KCNQ1 in white blood cells. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 1432–1440 (2015).
48. J. Z. Long, *et al.*, The Secreted Enzyme PM20D1 Regulates Lipidated Amino Acid Uncouplers of Mitochondria. *Cell* **166**, 424–435 (2016).

49. H.-F. Lin, *et al.*, Methylation in the matrix metalloproteinase-2 gene is associated with cerebral ischemic stroke. *J. Investig. Med.* **65**, 794–799 (2017).
50. K. L. Keene, *et al.*, Genetic Associations with Plasma B12, B6, and Folate Levels in an Ischemic Stroke Population from the Vitamin Intervention for Stroke Prevention (VISP) Trial. *Front. Public Health* **2** (2014).
51. T. Zhang, *et al.*, The association between homocysteine and ischemic stroke subtypes in Chinese: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **99**, e19467 (2020).
52. M. Markišić, A. M. Pavlović, D. M. Pavlović, The Impact of Homocysteine, Vitamin B12, and Vitamin D Levels on Functional Outcome after First-Ever Ischaemic Stroke. *BioMed Res. Int.* **2017**, 1–6 (2017).
53. Department of Bioinformatics, Sri Ramachandra University, Porur, Chennai – 600 116, India, *et al.*, Meta-analysis study to evaluate the association of MTHFR C677T polymorphism with risk of ischemic stroke. *Bioinformatics* **13**, 214–219 (2017).
54. M. Nojima, *et al.*, Correlation between global methylation level of peripheral blood leukocytes and serum C reactive protein level modified by MTHFR polymorphism: a cross-sectional study. *BMC Cancer* **18**, 184 (2018).
55. L. Zhao, *et al.*, DNA methylation of AHCY may increase the risk of ischemic stroke. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* (2020) <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.4535> (November 23, 2021).
56. C. Soriano-Tárraga, *et al.*, Biological age is better than chronological as predictor of 3-month outcome in ischemic stroke. *Neurology* **89**, 830–836 (2017).
57. C. Soriano-Tárraga, *et al.*, Ischemic stroke patients are biologically older than their chronological age. *Aging* **8**, 2655–2666 (2016).
58. Z. Li, *et al.*, Promoter hypomethylation of microRNA223 gene is associated with atherosclerotic cerebral infarction. *Atherosclerosis* **263**, 237–243 (2017).
59. K. C. Vickers, *et al.*, MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 14518–14523 (2014).
60. M. M. Harraz, S. M. Eacker, X. Wang, T. M. Dawson, V. L. Dawson, MicroRNA-223 is neuroprotective by targeting glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 18962–18967 (2012).
61. B. J. Kim, *et al.*, Genome-wide blood DNA methylation analysis in patients with delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Sci. Rep.* **10**, 11419 (2020).
62. G.-X. Deng, *et al.*, Association between promoter DNA methylation and gene expression in the pathogenesis of ischemic stroke. *Aging* **11**, 7663–7677 (2019).
63. C. Soriano-Tárraga, *et al.*, Identification of 20 novel loci associated with ischaemic stroke. Epigenome-wide association study. *Epigenetics* **15**, 988–997 (2020).
64. Y. Shen, *et al.*, Epigenome-Wide Association Study Indicates Hypomethylation of *MTRNR2L8* in Large-Artery Atherosclerosis Stroke. *Stroke* **50**, 1330–1338 (2019).
65. F. Luciano, *et al.*, Cytoprotective Peptide Humanin Binds and Inhibits Proapoptotic Bcl-2/Bax Family Protein BimEL. *J. Biol. Chem.* **280**, 15825–15835 (2005).
66. S. P. Pantazatos, *et al.*, Whole-transcriptome brain expression and exon-usage profiling in major depression and suicide: evidence for altered glial, endothelial and ATPase activity. *Mol. Psychiatry* **22**, 760–773 (2017).
67. M. Miao, *et al.*, Methylation of the RIN3 Promoter is Associated with Transient Ischemic Stroke/Mild Ischemic Stroke with Early Cognitive Impairment. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **Volume 17**, 2587–2598 (2021).
68. I. Juul Rasmussen, A. Tybjærg-Hansen, K. L. Rasmussen, B. G. Nordestgaard, R. Frikke-Schmidt, Blood–brain barrier transcytosis genes, risk of dementia and stroke: a prospective cohort study of 74,754 individuals. *Eur. J. Epidemiol.* **34**, 579–590 (2019).
69. M. Endres, *et al.*, DNA Methyltransferase Contributes to Delayed Ischemic Brain Injury. *J. Neurosci.* **20**, 3175–3181 (2000).
70. M. Endres, G. Fan, A. Meisel, U. Dirnagl, R. Jaenisch, Effects of cerebral ischemia in mice lacking Dna methyltransferase 1 in post-mitotic neurons. *Neuroreport* **12**, 3763–3766 (2017).

71. J.-C. Lee, *et al.*, Effects of Transient Cerebral Ischemia on the Expression of DNA Methyltransferase 1 in the Gerbil Hippocampal CA1 Region. *Neurochem. Res.* **38**, 74–81 (2013).
72. I. Hartley, *et al.*, Long-Lasting Changes in DNA Methylation Following Short-Term Hypoxic Exposure in Primary Hippocampal Neuronal Cultures. *PLoS ONE* **8**, e77859 (2013).
73. Z. Hu, *et al.*, The Emerging Role of Epigenetics in Cerebral Ischemia. *Mol. Neurobiol.* **54**, 1887–1905 (2017).
74. R. J. Felling, H. Song, Epigenetic mechanisms of neuroplasticity and the implications for stroke recovery. *Exp. Neurol.* **268**, 37–45 (2015).
75. H. Yin, K. L. Blanchard, DNA methylation represses the expression of the human erythropoietin gene by two different mechanisms. *Blood* **95**, 111–119 (2000).
76. R. H. Wenger, I. Kvietikova, A. Rolfs, G. Camenisch, M. Gassmann, Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation-free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *Eur. J. Biochem.* **253**, 771–777 (1998).
77. S. Wang, S. Kelly, Global cerebral ischemia induces increased expression of multiple retrotransposons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 572–576 (2013).
78. E. T. Chouchani, *et al.*, Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **515**, 431–435 (2014).
79. T. H. Sanderson, C. A. Reynolds, R. Kumar, K. Przyklenk, M. Hüttemann, Molecular Mechanisms of Ischemia–Reperfusion Injury in Brain: Pivotal Role of the Mitochondrial Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Generation. *Mol. Neurobiol.* **47**, 9–23 (2013).
80. L.-J. Wu, *et al.*, The voltage-gated proton channel Hv1 enhances brain damage from ischemic stroke. *Nat. Neurosci.* **15**, 565–573 (2012).
81. Y.-J. Xin, *et al.*, Tet1-mediated DNA demethylation regulates neuronal cell death induced by oxidative stress. *Sci. Rep.* **5**, 7645 (2015).
82. J. Li, *et al.*, Reperfusion Promotes Mitochondrial Dysfunction following Focal Cerebral Ischemia in Rats. *PLoS ONE* **7**, e46498 (2012).
83. K. C. Morris-Blanco, *et al.*, Induction of DNA Hydroxymethylation Protects the Brain After Stroke. *Stroke* **50**, 2513–2521 (2019).
84. A. Ergul, A. Alhusban, S. C. Fagan, Angiogenesis: A Harmonized Target for Recovery After Stroke. *Stroke* **43**, 2270–2274 (2012).
85. B. Margosio, *et al.*, Fibroblast growth factor-2 binding to the thrombospondin-1 type III repeats, a novel antiangiogenic domain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 700–709 (2008).
86. C.-J. Hu, *et al.*, Promoter Region Methylation and Reduced Expression of Thrombospondin-1 after Oxygen—Glucose Deprivation in Murine Cerebral Endothelial Cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26**, 1519–1526 (2006).
87. Q. Yang, X. Wu, J. Sun, J. Cui, L. Li, Epigenetic Features Induced by Ischemia-Hypoxia in Cultured Rat Astrocytes. *Mol. Neurobiol.* **53**, 436–445 (2016).
88. N. C. Chisholm, *et al.*, Histone methylation patterns in astrocytes are influenced by age following ischemia. *Epigenetics* **10**, 142–152 (2015).
89. M. Ziu, L. Fletcher, S. Rana, D. F. Jimenez, M. Digicaylioglu, Temporal Differences in MicroRNA Expression Patterns in Astrocytes and Neurons after Ischemic Injury. *PLoS ONE* **6**, e14724 (2011).
90. M. Fabbri, *et al.*, MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 15805–15810 (2007).
91. P. Li, K. Ma, H.-Y. Wu, Y.-P. Wu, B.-X. Li, Isoflavones Induce BEX2-Dependent Autophagy to Prevent ATR-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **43**, 1866–1879 (2017).
92. E. Z. Longa, P. R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84–91 (1989).
93. L. Zhang, *et al.*, A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia. *J. Neurosci. Methods* **117**, 207–214 (2002).

94. K. Matsuura, H. Kabuto, H. Makino, N. Ogawa, Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. *J. Neurosci. Methods* **73**, 45–48 (1997).
95. A. L. Southwell, J. Ko, P. H. Patterson, Intrabody Gene Therapy Ameliorates Motor, Cognitive, and Neuropathological Symptoms in Multiple Mouse Models of Huntington's Disease. *J. Neurosci.* **29**, 13589–13602 (2009).
96. T. K. Wojdacz, A. Dobrovic, L. L. Hansen, Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat. Protoc.* **3**, 1903–1908 (2008).
97. T. K. Wojdacz, A. Dobrovic, Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* **35**, e41–e41 (2007).
98. M. Furlan, G. Marchal, J.-M. Derlon, J.-C. Baron, F. Viader, Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Ann. Neurol.* **40**, 216–226 (1996).
99. M. Paciaroni, V. Caso, G. Agnelli, The Concept of Ischemic Penumbra in Acute Stroke and Therapeutic Opportunities. *Eur. Neurol.* **61**, 321–330 (2009).
100. F. Sodaei, V. Shahmaei, Identification of penumbra in acute ischemic stroke using multimodal MR imaging analysis: A case report study. *Radiol. Case Rep.* **15**, 2041–2046 (2020).
101. P. Baumgartner, M. El Amki, O. Bracko, A. R. Luft, S. Wegener, Sensorimotor stroke alters hippocampo-thalamic network activity. *Sci. Rep.* **8**, 15770 (2018).
102. D. Chung, A. Shum, G. Caraveo, GAP-43 and BASP1 in Axon Regeneration: Implications for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 567537 (2020).
103. A.-M. Buga, *et al.*, The genomic response of the ipsilateral and contralateral cortex to stroke in aged rats. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 2731–2753 (2008).
104. N. Kidani, *et al.*, Cerebellar Blood Flow and Gene Expression in Crossed Cerebellar Diaschisis after Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4137 (2020).
105. I.-A. Choi, C. Lee, H. Kim, D.-H. Choi, J. Lee, Effect of Inhibition of DNA Methylation Combined with Task-Specific Training on Chronic Stroke Recovery. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2019 (2018).
106. S. Lieschke, *et al.*, CCL11 Differentially Affects Post-Stroke Brain Injury and Neuroregeneration in Mice Depending on Age. *Cells* **9**, 66 (2019).
107. S. B. Ortega, *et al.*, B cells migrate into remote brain areas and support neurogenesis and functional recovery after focal stroke in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 4983–4993 (2020).
108. Z. Liu, Y. Li, J. Qian, Y. Cui, M. Chopp, Plasminogen Deficiency Causes Reduced Corticospinal Axonal Plasticity and Functional Recovery after Stroke in Mice. *PLoS ONE* **9**, e94505 (2014).
109. F. Alamri, *et al.*, Delayed atomoxetine or fluoxetine treatment coupled with limited voluntary running promotes motor recovery in mice after ischemic stroke. *Neural Regen. Res.* **16**, 1244 (2021).
110. T. Shibahara, *et al.*, Pericyte-Mediated Tissue Repair through PDGFR $\beta$  Promotes Peri-Infarct Astrogliosis, Oligodendrogenesis, and Functional Recovery after Acute Ischemic Stroke. *ENEURO*.0474-19.2020 (2020).
111. Z. Pickell, A. M. Williams, H. B. Alam, C. H. Hsu, Histone Deacetylase Inhibitors: A Novel Strategy for Neuroprotection and Cardioprotection Following Ischemia/Reperfusion Injury. *J. Am. Heart Assoc.* **9** (2020).
112. Y.-H. Lin, *et al.*, Opening a New Time Window for Treatment of Stroke by Targeting HDAC2. *J. Neurosci.* **37**, 6712–6728 (2017).
113. J.-S. Chen, *et al.*, HDAC1 deregulation promotes neuronal loss and deficit of motor function in stroke pathogenesis. *Sci. Rep.* **11**, 16354 (2021).
114. E. A. Saunderson, *et al.*, Stress-induced gene expression and behavior are controlled by DNA methylation and methyl donor availability in the dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 4830–4835 (2016).
115. S. Nguyen, K. Meletis, D. Fu, S. Jhaveri, R. Jaenisch, Ablation of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in the nervous system leads to neuromuscular defects and shortened lifespan. *Dev. Dyn.* **236**, 1663–1676 (2007).

116. Y.-L. Weng, *et al.*, An Intrinsic Epigenetic Barrier for Functional Axon Regeneration. *Neuron* **94**, 337–346.e6 (2017).
117. K. Gulmez Karaca, *et al.*, Neuronal ensemble-specific DNA methylation strengthens engram stability. *Nat. Commun.* **11**, 639 (2020).
118. M. J. Morris, M. Adachi, E. S. Na, L. M. Monteggia, Selective role for DNMT3a in learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **115**, 30–37 (2014).
119. S. Zocher, *et al.*, *De novo* DNA methylation controls neuronal maturation during adult hippocampal neurogenesis. *EMBO J.* **40** (2021).
120. M. I. Cuartero, *et al.*, Abolition of aberrant neurogenesis ameliorates cognitive impairment after stroke in mice. *J. Clin. Invest.* **129**, 1536–1550 (2019).
121. M. Zhang, *et al.*, Ten-eleven translocation 1 mediated-DNA hydroxymethylation is required for myelination and remyelination in the mouse brain. *Nat. Commun.* **12**, 5091 (2021).
122. R. Xie, *et al.*, Mammalian Target of Rapamycin Cell Signaling Pathway Contributes to the Protective Effects of Ischemic Postconditioning Against Stroke. *Stroke* **45**, 2769–2776 (2014).
123. O. Z. Chi, *et al.*, Rapalink-1 Increased Infarct Size in Early Cerebral Ischemia–Reperfusion With Increased Blood–Brain Barrier Disruption. *Front. Physiol.* **12**, 706528 (2021).
124. E. Nie, *et al.*,  $\beta$ -Catenin is involved in Bex2 down-regulation induced glioma cell invasion/migration inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456**, 494–499 (2015).
125. Z. Hu, *et al.*, Brain-expressed X-linked 2 Is Pivotal for Hyperactive Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)-mediated Tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* **290**, 25756–25765 (2015).
126. M. Kanazawa, *et al.*, Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **39**, 753–769 (2019).
127. H. Zhu, *et al.*, Inflammation-Mediated Angiogenesis in Ischemic Stroke. *Front. Cell. Neurosci.* **15**, 652647 (2021).
128. P. S. Manoonkitiwongsa, R. L. Schultz, E. F. Whitter, P. D. Lyden, Contraindications of VEGF-based therapeutic angiogenesis: Effects on macrophage density and histology of normal and ischemic brains. *Vascul. Pharmacol.* **44**, 316–325 (2006).
129. Y. Wang, VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain* **128**, 52–63 (2004).
130. J. Liauw, *et al.*, Thrombospondins 1 and 2 are Necessary for Synaptic Plasticity and Functional Recovery after Stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28**, 1722–1732 (2008).
131. W. Li, *et al.*, Annexin A2 is a Robo4 ligand that modulates ARF6 activation-associated cerebral trans-endothelial permeability. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **39**, 2048–2060 (2019).
132. D. Gorup, *et al.*, Increased expression and colocalization of GAP43 and CASP3 after brain ischemic lesion in mouse. *Neurosci. Lett.* **597**, 176–182 (2015).
133. Å. Sandelius, *et al.*, Transient increase in CSF GAP-43 concentration after ischemic stroke. *BMC Neurol.* **18**, 202 (2018).
134. X. Chen, *et al.*, Transcriptome profiling unveils GAP43 regulates ABC transporters and EIF2 signaling in colorectal cancer cells. *BMC Cancer* **21**, 24 (2021).
135. K. Baumgärtel, I. M. Mansuy, Neural functions of calcineurin in synaptic plasticity and memory: Figure 1. *Learn. Mem.* **19**, 375–384 (2012).
136. A. Pascale, *et al.*, Increase of the RNA-binding protein HuD and posttranscriptional up-regulation of the GAP-43 gene during spatial memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 1217–1222 (2004).
137. T. Casoli, *et al.*, Cellular Distribution of GAP-43 mRNA in Hippocampus and Cerebellum of Adult Rat Brain by In Situ RT-PCR. *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 1195–1196 (2001).
138. H.-J. Kang, *et al.*, Association of SLC6A4 methylation with long-term outcomes after stroke: focus on the interaction with suicidal ideation. *Sci. Rep.* **11**, 2710 (2021).
139. M. Dennis, *et al.*, Effects of fluoxetine on functional outcomes after acute stroke (FOCUS): a pragmatic, double-blind, randomised, controlled trial. *The Lancet* **393**, 265–274 (2019).
140. G. J. Hankey, *et al.*, Safety and efficacy of fluoxetine on functional outcome after acute stroke (AFFINITY): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* **19**, 651–660 (2020).