



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“CAMBIOS EPIGENÉTICOS INDUCIDOS POR LA FORMACIÓN DEL VÍNCULO DE PAREJA EN EL TOPILLO DE LA PRADERA HEMBRA (*Microtus ochrogaster*)”

Tesis que para optar por el grado de
Maestra en Ciencias (Neurobiología)

Presenta

Q.F.B. Guadalupe Denisse Rivera Bautista

Asesoras:

Dra. Wendy Portillo Martínez/Dra. Daniela Ávila González

Instituto de Neurobiología, UNAM

Comité tutor:

Dr. Gilberto Aleph Prieto Moreno, Instituto de Neurobiología, UNAM

Dr. José Alonso Fernández Guasti, Sede sur farmacobiología, CINVESTAV

Querétaro, Qro. diciembre 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.

Resumen

En el topillo de la pradera (especie socialmente monógama), la estimulación socio-sexual genera un vínculo de pareja que perdura por todo el ciclo de vida del animal. Nuestro grupo y otros laboratorios han demostrado que la estimulación socio-sexual modula la neurogénesis adulta. De esta forma, se ha propuesto que las células nuevas que se originan en la zona subventricular (ZSV) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado pueden cambiar su potencial de proliferación y diferenciación a través de modificaciones epigenéticas. Dentro de estas, la tri-metilación de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) y la tri-metilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) tienen un papel fundamental en la regulación génica. Asimismo, se ha demostrado que la administración de inhibidores de las desacetilasas de histonas, facilitan la formación de este lazo socio-sexual al incrementar la acetilación de la histona H3 en el promotor a oxitocina y a vasopresina en el núcleo accumbens. De igual manera, el incremento en dopamina en esta región neuronal es fundamental en esta conducta socio-sexual. Motivo por el cual, en este trabajo, determinamos si la formación de vínculos de pareja en el topillo hembra induce cambios en los precursores neuronales de la ZSV y la ZSG en las marcas de H3K4m3 y H3K27m3. También determinamos si la formación de vínculos de pareja conlleva cambios en las aferencias catecolaminérgicas (células positivas a tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas) y en las marcas epigenéticas en el núcleo accumbens del topillo hembra. Nuestros datos sugieren que de manera global no hay cambios en los patrones de metilación de H3K4 y H3K27 asociados a la formación del vínculo de pareja. No obstante, el incremento de H3K27me3 en la ZSV abre la posibilidad de que la metilación este involucrada en la proliferación o diferenciación de los precursores neuronales. Para corroborarlo es necesario la integración de estrategias

metodológicas que permitan evaluar la deposición de las marcas sobre genes involucrados en cambios celulares asociados al vínculo de pareja.

Abstract

In the prairie vole (monogamous specie), the socio-sexual stimulation generates a pair bond that lasts for the animal's life cycle. Our research group and others have demonstrated that socio-sexual stimulation modulates adult neurogenesis. Thus, it has been proposed that epigenetic modifications might change the proliferative and differentiative potential of the newly generated cells in the subventricular zone and subgranular zone of the dentate gyrus. Within these modifications, the trimethylation of the lysine 4 in the histone 3 (H3K4me3) and the trimethylation of the lysine 27 in histone 3 (H3K27me3) have a fundamental role in genetic regulation. In addition, the administration of deacetylase inhibitors has been proved to facilitate pair bond formation, increasing the acetylation in the H3 in the oxytocin promotor and vasopressin promotor in the nucleus accumbens.

Similarly, a dopamine surge in this region is fundamental to this behaviour. Given all of the above, in this work, we determined if the pair bond formation in the female prairie vole induces changes in the neural precursors in the H4K4me3 and H3K27me3 marks. Additionally, we evaluated if the pair bond formation changes the catecholaminergic afferences and the epigenetic marks in the female prairie vole nucleus accumbens. Our data suggest there aren't global changes in the methylation patterns of H3K4 and H3K27 associated with the pair bond. Nevertheless, the surge in the subventricular zone of H3K27me3 opens the possibility that the methylation might be involved in the proliferation and differentiation of neural precursors. The application of different methodological strategies is required to evaluate the deposition of the mark on specific genes related to the pair bond formation.

Agradecimientos

Al Instituto de Neurobiología.

Al Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes: 212250-3230-21216-05-15, 2018-1-163

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CVU: 1084126.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN208221.

A la Coordinación General de Estudios de posgrado UNAM.

A la coordinación del Programa Maestría en Ciencias (Neurobiología): Dra. Maricela Luna Muñoz, Dra. Nuri Aranda López.

A la Dra. Deisy Gasca, al Dr. Martín García, a la Dra. Alejandra Castilla y a la Ing. Nydia Hernández y al MVZ Francisco Camacho Barrios por todo su apoyo técnico.

A la Dra. Wendy Portillo por toda su enseñanza, dedicación y guía.

Al laboratorio de Conducta sexual y plasticidad.

A la orden del puma por su amistad y compañerismo.

A Pepe y Cecy, por volverse mi familia adoptiva.

A mi familia por todo su apoyo

A Manuel por todo su amor y ser mi compañero de aventuras

A mí por estar y nunca rendirme

Lista de abreviaturas

| Término | Abreviatura |
|---|--------------------|
| Dopamina | DA |
| Área ventral tegmental | AVT |
| Gen de Linaje Leucémico Mixto | LMM |
| Núcleo Accumbens | NAcc |
| Oxitocina | OT |
| Núcleo Paraventricular | NPV |
| Receptores a dopamina tipo 2 | D2R |
| Receptores a dopamina tipo 1 | D1R |
| Corteza media prefrontal | CPm |
| Lecho del núcleo de la estría terminallis | NCST |
| Arginina vasopresina | AVP |
| Receptores a Oxitocina | OXTR |
| Receptor a vasopresina | AVPR1a |
| Pálido ventral | PV |
| Zona subventricular | SVZ |
| Vía rostral migratoria | VMR |
| Zona Subgranular | SGZ |
| Bulbo Olfatorio | BO |
| Giro dentado | GD |
| Bulbo olfatorio principal | BOP |
| Tirosina Hidroxilasa | TH |
| Temperatura Ambiente | T.A. |

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 3 |
| Abstract..... | 4 |
| Agradecimientos | 5 |
| Lista de abreviaturas..... | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| <i>Microtus ochrogaster</i> | 10 |
| Formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera..... | 10 |
| Circuito Neuronal..... | 11 |
| Efectos de la cópula sobre la proliferación celular en la zona ventricular y subgranular del giro dentado..... | 17 |
| Regulación de la expresión génica..... | 21 |
| Epigenética..... | 22 |
| Remodelado de la cromatina..... | 23 |
| Metilación del DNA..... | 23 |
| Modificaciones postraduccionales de histonas..... | 24 |
| Metilación en H3K4 y H3K27..... | 25 |
| Antecedentes | 30 |
| Cambios en la acetilación durante la formación de vínculos de pareja en el topillo hembra | 30 |
| Planteamiento del problema..... | 31 |
| Justificación..... | 33 |
| Hipótesis | 33 |
| Objetivos | 34 |
| Materiales y Métodos | 34 |
| Animales estímulo | 35 |
| Grupos experimentales..... | 36 |
| Prueba de preferencia de pareja | 36 |
| Determinación de la distribución anatómica de la marca global de tri-metilación de la H3K4 y H3K27 en precursores neuronales y células TH positivas | 37 |
| Inmunohistoquímica..... | 37 |
| Análisis de fotomicrografías..... | 40 |
| Análisis Estadístico..... | 43 |

| | |
|---|----|
| Resultados | 43 |
| Prueba de preferencia de pareja | 43 |
| Identificación de la población celular en regiones anatómicas | 45 |
| | 56 |
| Determinación de la identidad neural en regiones con cambios en las marcas H3K4 y H3K27 | 56 |
| Discusión..... | 67 |
| Presencia de marcas epigenéticas H3K4me3 y H3K27me3 en precursores neuronales de los nichos neurogénicos..... | 70 |
| Conclusión | 74 |
| REFERENCIAS..... | 75 |
| Anexo 1: Lista de anticuerpos empleados..... | 91 |
| Anexo 2: Parámetros de microscopía empleados | 92 |
| Anexo 3: Parámetros análisis de fotomicrografías Fiji/ ImageJ | 93 |
| Índice de figuras..... | 93 |

INTRODUCCIÓN

Toda especie que vive en sociedad requiere la formación de relaciones cooperativas. En el caso de los humanos, los beneficios de las relaciones sociales van desde el funcionamiento adecuado de la comunidad hasta aquellos de índole personal como una buena salud física y mental ([House et al., 1988](#); [Kiecolt-Glaser & Newton, 2001](#); [Kosten et al., 1987](#)). Una de las relaciones más importantes en especies socialmente monógamas son los vínculos de pareja, sin embargo, poco se conoce aún acerca del circuito cerebral y de los mecanismos de plasticidad neuronal involucrados en la formación y mantenimiento de estos vínculos. El estudio de este proceso de adaptación compleja, precisa el entendimiento de numerosas funciones cognitivas, como el procesamiento sensorial, el aprendizaje y la memoria, así como las respuestas motoras. Dada la complejidad de estas conductas en nuestra especie, así como las limitaciones éticas para estudiar sus bases neuronales, se recurre al uso de modelos animales.

Dentro de los modelos animales propuestos para estudios de tipo conductual, el topillo de la pradera (*Microtus ochrogaster*) ha tomado relevancia para abordar el entendimiento de conductas sociales complejas. El topillo de la pradera tiene una estrategia reproductiva socialmente monógama, la cohabitación con un topillo del sexo opuesto con o sin apareamiento deriva en el desarrollo del vínculo de pareja caracterizado por la preferencia de pareja, la agresión selectiva hacia otros congéneres y la presencia de cuidados biparentales para con su descendencia ([Gobrogge, 2014](#); [Walum & Young, 2018](#)).

Microtus ochrogaster

A pesar de pertenecer a una misma familia, existen diferencias en las estrategias de vida de las diferentes especies de topillos. Por ejemplo, *Microtus pennsylvanicus* y *Microtus montanus* son especies asociales promiscuas; mientras que el topillo de la pradera (*Microtus ochrogaster*), *Microtus mandarinus*, y *Microtus pinectorum* son especies monógamas sociales ([Gobrogge, 2014](#); [Hammock & Young, 2007](#); [McGuire & Novak, 1984](#)).

Formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera

El vínculo de pareja es el resultado de la plasticidad neuronal que vincula un conjunto de claves sociosensoriales como son las señales olfativas recibidas con el sistema de recompensa, de esta manera el comportamiento afiliativo se activa y los reforzamientos positivos facilitan la formación del vínculo de pareja ([Walum & Young, 2018](#); [Young & Wang, 2004](#)). Este vínculo se establece cuando el macho y la hembra cohabitan con libertad de cópula por 6 horas o cohabitan sin cópula por 24 horas y se caracteriza por el cuidado de la pareja sexual, cohabitación en el nido, compartir o defender el territorio y un cuidado biparental de las crías ([Gobrogge, 2014](#); [Williams, Carter, et al., 1992](#); [Williams, Catania, et al., 1992](#)). Una vez formado el vínculo de pareja, este suele mantenerse por largo tiempo y a la muerte de uno de los topillos el otro generalmente no vuelve a formar un nuevo vínculo ([Young, 2003](#)). Las pruebas de preferencia de pareja y agresión selectiva son los indicadores más utilizados en condiciones de laboratorio para determinar la formación de un vínculo de pareja. En la exploración de campo, se ha demostrado que la pareja se encuentra junta a lo largo de su vida, incluso después de sucesivas migraciones ([Getz et al., 1993](#); [Gobrogge, 2014](#)).

La complejidad de los circuitos neuronales y la participación de varias rutas simultáneas para diferentes procesos complica la tarea de aislar los circuitos involucrados en el vínculo de pareja. Se han realizado estudios utilizando marcadores de activación neuronal, como el gen temprano c-fos, conectividad funcional, electrofisiología, optogenética, administración de fármacos y lesiones de regiones neuronales específicas entre otras técnicas para elucidar las regiones y redes neuronales asociadas con los vínculos de pareja, las cuales serán descritos a continuación ([Gobrogge, 2014; López-Gutiérrez et al., 2022](#)).

Circuito Neuronal

El comportamiento afiliativo en el topillo de la pradera es regulado por mecanismos neurales que involucran diferentes regiones del cerebro. Es el resultado de la plasticidad cerebral que une la información socio sensorial de la pareja con la recompensa ([Walum & Young, 2018](#)). La interacción social estimula la producción de dopamina (DA) en el área ventral tegmental (AVT) que es liberada en el Núcleo Accumbens (NAcc), también se libera oxitocina (OT) del núcleo paraventricular (NPV) a los sistemas de interacción social. Dentro del sistema de interacción se encuentra el núcleo anterior olfatorio, la amígdala, el hipocampo, la corteza media prefrontal y el NAcc ([López-Gutierrez et al., 2022, Potretzke & Ryabinin, 2019; Walum & Young, 2018](#)).

La señalización por DA parece estar implicada en la formación, expresión y mantenimiento del vínculo de pareja. Los topillos de la pradera muestran mayor densidad en receptores D2 (D2R) y menor expresión de receptores D1 (D1R) en la corteza prefrontal media (CPm), así como menor densidad de D1R en el NAcc comparado con los topillos del prado (especie promiscua) ([Gobrogge, 2014;](#)

[Resendez et al., 2016](#)). La cópula incrementa la actividad de la DA, induciendo el aumento en la densidad de los D2R en el NAcc tanto en hembras como en machos, facilitando así la preferencia de pareja. La DA en el NAcc facilita que exista una asociación del estímulo con su recompensa. Por ejemplo, durante el sexo se motiva el comportamiento por medio del reforzamiento ([Walum & Young, 2018](#)).

Una vez formado el vínculo de pareja se ha propuesto que el mantenimiento de este depende del incremento en la expresión de D1R en el NAcc. Por otro lado, se ha determinado la participación de células dopaminérgicas en el lecho del núcleo de la estria terminallis (NCST) y en la amígdala media del cerebro del topillo de la pradera, pero no en el promiscuo *Microtus pennsylvanicus* ([Potretzke & Ryabinin, 2019](#)). La DA mesolímbica interactúa con los sistemas de OT y la arginina vasopresina (AVP, neuropéptido similar a la OT) para facilitar el establecimiento de la preferencia de pareja ([Walum & Young 2018](#)).

Una conducta que caracteriza el vínculo de pareja es la agresión selectiva hacia hembras o machos no conocidos para el individuo ([Walum & Young, 2018](#)). Este cambio en el comportamiento es regulado por modificaciones en la densidad de los receptores de DA en el estriado. En machos, después de cohabitación por dos semanas se observa un incremento del 60% en la expresión de los D1R en el NAcc mientras los D2R no presentan cambios. El incremento en la agresión selectiva, tanto en machos como en hembras, también es regulado por los receptores κ -opioides en el NAcc ([Gobrogge & Wang, 2015](#); [Numan & Young, 2016](#); [Walum & Young, 2018](#)). En humanos, estudios realizados por imagenología apuntan a una diferencia en la expresión de los receptores D2/3 en el estriado ventral en apegos emocionales, así como incremento en la actividad de DA en la amígdala medial en la formación de

vínculos de pareja monógamos ([Potretzke & Ryabinin, 2019](#)), lo que nos indica mecanismos comunes entre las especies.

La OT es un nonapéptido conservado que media comportamientos maternos y sociales ([Walum & Young, 2018](#)) y la distribución de sus receptores (OXTR) en el topillo de la pradera muestra mayor densidad en el NCST, CPm y NAcc, pero niveles menores en la región ventral del hipotálamo, septum lateral y en la región cortical anterior de la amígdala ([Gobrogge, 2014](#); [Resendez et al., 2016](#)). La expresión de los receptores en el área mesolímbica es importante para la formación de vínculos de pareja. En el topillo hembra, la administración de un antagonista de OXTR en el NAcc bloquea la preferencia de pareja inducida por la activación del D2R, mientras que el bloqueo de los D2R en esta región neuronal impide la formación de preferencia de pareja inducida por la OT sugiriendo que el sistema DA y OT interactúan en dicha región para formar este vínculo socio-sexual ([Wang et al., 1999](#); [Gingrich et al., 2000](#); [Young and Wang 2004](#); [Aragona et al., 2003](#)). Por su parte, en machos, la activación del D2R facilita la formación del vínculo de pareja viéndose reflejado por la preferencia hacia su pareja en vez de preferir una hembra novedosa, incrementando el tiempo de contacto lado a lado (huddling) con la hembra en cohabitación. Por el contrario, al activarse el D1R se bloquea la preferencia de pareja inducida por el apareamiento ([Aragona et al., 2006](#); [Aragona et al., 2003](#); [Gingrich et al., 2000](#)). Se propone que los sistemas de DA y AVP interactúan en el circuito NAcc-pálido ventral (PV) para participar en la formación de vínculos de pareja en machos, lo que sugiere que estas regiones se encuentran interconectadas y que estos neuropéptidos modulan el papel de la DA en el circuito de recompensa ([Gobrogge & Wang, 2015](#); [Walum & Young, 2018](#); [Young, 2003](#); [Young & Wang, 2004](#)).

Por su parte, la AVP participa en la regulación de los vínculos sociales, sus receptores (AVPR1a) tienen una mayor expresión en el PV y en el septum lateral en aquellas especies monógamas en comparación con especies promiscuas ([Liu et al., 2001](#)). En el topillo de la pradera, la conducta de protección de la pareja que consiste en desplegar comportamientos agresivos (ataques) hacia otros congéneres distintos a su pareja, depende de la señalización por los receptores de AVP localizados en la región anterior del hipotálamo ([Curtis et al., 2001](#); [Liu et al., 2001](#)). Los topillos de la pradera en su hábitat natural presentan altas densidades de AVPR1a en la corteza retro espinal, relación que se considera importante para el mantenimiento de la vida social monógama. De esta forma en el topillo macho, la administración intraventricular de un antagonista de los AVPR1a bloquea la formación del vínculo de pareja, aunque los animales copulen. Mientras que la administración de AVP induce los comportamientos de agresión selectiva en ausencia de cópula. También, la AVP en el septum lateral está involucrada en el aprendizaje y la memoria y reconocimiento social, de forma que el incremento en la liberación de AVP septal es importante para la formación del vínculo de pareja ([Liu et al., 2001](#)).

En el establecimiento del vínculo de pareja, primeramente, el cerebro del individuo debe percibir a la pareja como un individuo único y del sexo opuesto. Por ello, el sistema olfatorio cobra relevancia al incrementar su actividad durante el contacto social ([Walum & Young, 2018](#)). Así, las señales olfativas son procesadas por el bulbo olfatorio principal (BOP) por medio de neuronas de proyección, las cuáles reciben estímulos glutamatérgicos provenientes del núcleo anterior olfatorio, en esta área hay una gran cantidad de OXTR que recibe las proyecciones de OT del núcleo paraventricular ([Walum & Young, 2018](#)). De manera que la OT desempeña un papel importante en las primeras etapas de refinamiento olfativo.

En las hembras, el incremento de los OXTR es modulado por estradiol, en el topillo de la pradera hembras sin experiencia sexual, la exposición al macho aumenta el estradiol y OXTR en el núcleo anterior olfatorio para facilitar el reclutamiento de interneuronas en el BOP ([Bonfanti et al., 1997](#); [Walum & Young, 2018](#)). En esta estructura la OT actúa refinando la fidelidad de las señales olfatorias al disminuir la señal base en las células mitrales y empenachadas e incrementar el pico de la respuesta olfatoria. La amígdala medial recibe información del sistema vomeronasal y del BOP, así como OT del núcleo para ventricular, la cual es una región rica en OXTR. En la amígdala medial se integran la información sensorial de la pareja y la relevancia emocional. El reconocimiento a largo plazo es mediado por la plasticidad sináptica que depende de OT en la amígdala medial, la activación de sus receptores facilita la formación de una memoria específica de la pareja y fortalece las sinapsis en la amígdala que permitirán que la información relevante sea transmitida con mayor fuerza al NAcc, PV e hipocampo ([Walum & Young, 2018](#)).

Al hipocampo llega la información sensorial recolectada por el sistema olfatorio a través de la amígdala medial, la amígdala basolateral y el septum lateral, el cual participa en la modulación de comportamientos afiliativos reproductivos y no reproductivos, el estado emocional contexto específico, así como parte de la integración del circuito de recompensa ([Kelly et al., 2020](#)). El hipocampo a su vez conecta bidireccionalmente con la corteza prefrontal medial. La plasticidad hipocampal está, una vez más, regulada por la activación de OXTR, al aumentar los niveles de OT incrementa rápidamente la respuesta de las interneuronas, suprimiendo así la señal remanente en las neuronas piramidales en CA1 y de esta manera discriminar el impulso recibido por el estímulo de la señal basal ([Walum & Young, 2018](#)).

Una vez reconocido el individuo, la cópula estimula la liberación de DA por las neuronas del área ventral tegmental hacia el NAcc y la corteza medial prefrontal. La interacción sexual también incrementa la concentración de OT en el NAcc. La OT liberada en el AVT incrementa la liberación de DA en el NAcc que desencadena la reacción de recompensa ([Walum & Young, 2018](#)). La integración de la información social dada por el entorno en la amígdala, la asociación a un contexto específico, así como la asignación de la identidad de reconocimiento social creada en el hipocampo y la información dirigida a objetivos en la corteza medial prefrontal se integran para generar una señal de salida por medio de la desinhibición del PV ([Gobrogge, 2014; K. Gobrogge & Wang, 2015; Walum & Young, 2018](#)).

Cómo ya se mencionó, la interacción entre DA y OT en el NAcc es esencial para la formación del vínculo de pareja tanto en hembras como en machos. Mientras que la activación coordinada y simultánea de los OXTR y D2R en el NAcc es necesaria para el mantenimiento del vínculo socio-sexual. La activación de los D2R suprime la actividad de las neuronas espinosas medianas GABAérgicas en el NAcc, que resulta en la desinhibición del PV, permitiendo la salida de estímulos excitatorios de la amígdala basolateral. El PV actúa como modulador de respuestas motoras una vez que se da el estímulo de recompensa, a través de proyecciones al tálamo y núcleos motores. En este contexto, esta respuesta motora se traduce en comportamiento afiliativo hacia el compañero sexual. Las sinapsis dentro del PV pueden fortalecerse por la OT, AVP y DA, siendo activadas por estímulos de la pareja por periodos prolongados (figura 1) ([Walum & Young, 2018](#)).

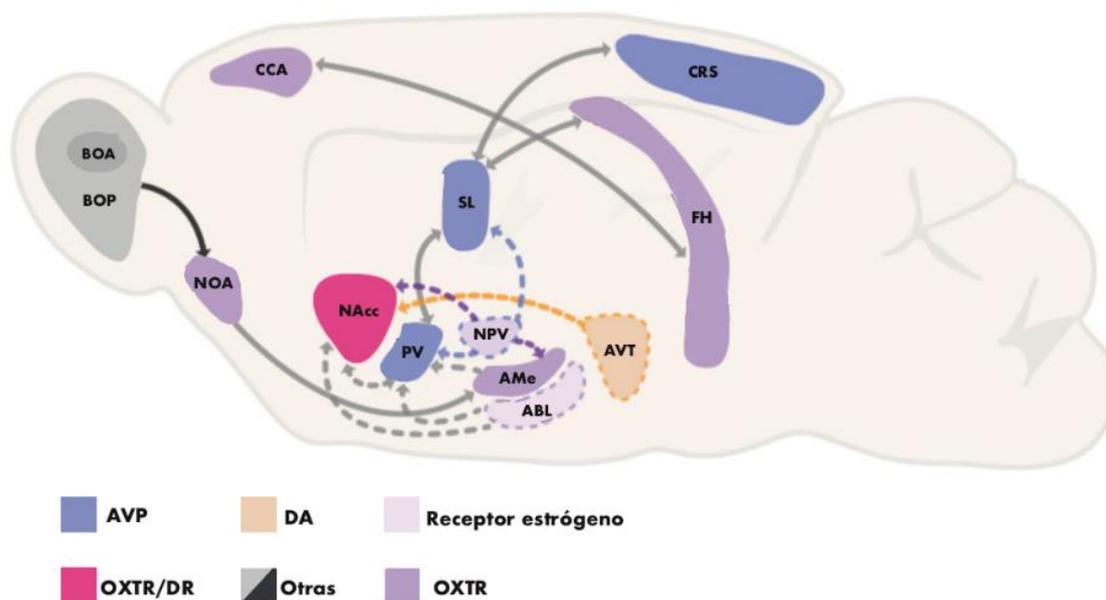


Figura 1. Vista Sagital del cerebro del topillo de la pradera donde se ilustra el circuito propuesto para la formación del vínculo de pareja. Este comportamiento implica la interacción de áreas del sistema de recompensa con regiones procesadoras de estímulos sociales, produciendo una asociación entre una pista social o estímulo y la codificación de una recompensa que desencadena una respuesta. OXTR: receptor a oxitocina; AVP: arginina vasopresina; DR: receptores a dopamina; DA: núcleo dopaminérgico; BOA: bulbo olfatorio accesorio; BOP: bulbo olfatorio principal; NOA: núcleo olfatorio anterior; CCA: corteza cingulada anterior; ABL: amígdala basolateral; FH: formación hipocampal; AVT: área ventral tegmental; AMe: amígdala medial; NPV: núcleo paraventricular; PV: pálido ventral; NAcc: núcleo accumbens; SL: septum lateral; CRS: corteza retrosplenial. Modificado de [López-Gutiérrez et al., 2022](#).

Efectos de la cópula sobre la proliferación celular en la zona subventricular y subgranular del giro dentado

Nuestro grupo de investigación y otros han demostrado que la neurogénesis adulta es un proceso plástico modulado por las conductas sexuales y, por tanto, el vínculo de pareja induce plasticidad neuronal ([Bedos et al., 2018](#); [Ming & Song, 2011](#)). De esta forma, la exposición a feromonas y el comportamiento sexual modulan la neurogénesis adulta. Las células nuevas se generan continuamente en la zona subventricular (ZSV), en la vía migratoria rostral (VMR) y en la zona subgranular (ZSG) del giro dentado (GD) en el hipocampo. Las células nuevas formadas en la

ZSV migran por la VMR hasta llegar al bulbo olfatorio (BO), donde al madurar se integran a las capas granular y glomerular del BO accesorio y BOP (figura 2) ([Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002](#); [Whitman & Greer, 2009](#)). Por su parte, las células progenitoras intermedias generadas en la ZSG migran a la capa granular del GD y al madurar mandan proyecciones axonales hacia la región CA3 del hipocampo donde se integran sinápticamente en el circuito existente (figura 3) ([Castro et al., 2020](#); [Ming & Song, 2011](#)).

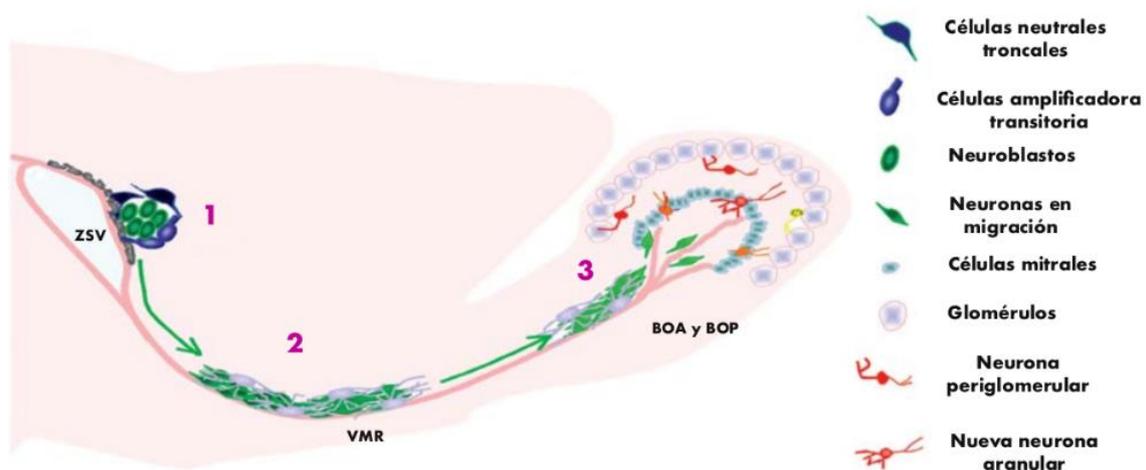


Figura 2. Generación de nuevas interneuronas en el bulbo olfatorio a partir de células neurales troncales en la ZSV. La neurogénesis adulta en la zsv / sistema olfatorio pasa por 3 fases de desarrollo. Fase 1. Proliferación: Células neurales troncales dan lugar a células amplificadoras transitorias; posteriormente se diferencian a neuronas inmaduras, Fase 2. Migración: las neuronas inmaduras migran por la VMR hacia el BO. Fase 3. Integración sináptica: las neuronas inmaduras se diferencian a neuronas granulares o periglomerulares. Modificado de [Ming & Song, 2005](#).

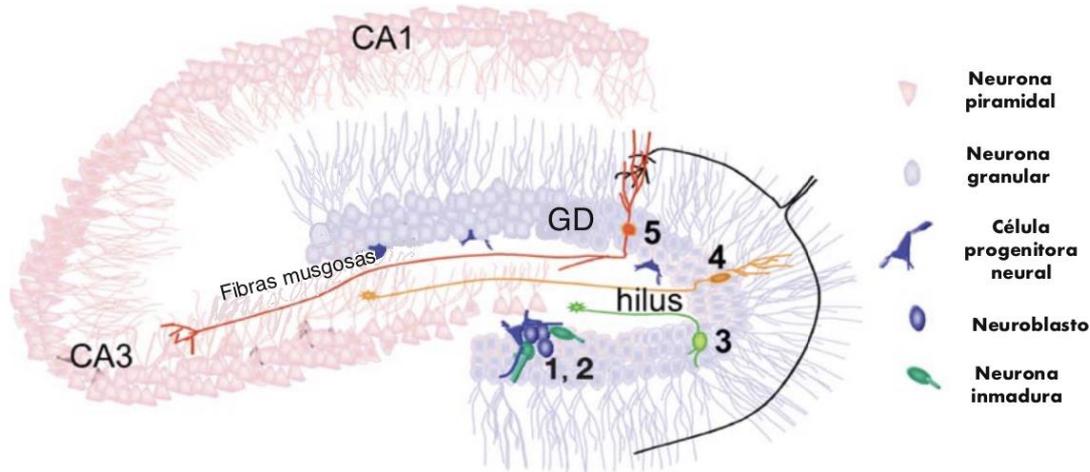


Figura 3. Generación de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo a partir de células neurales troncales en la ZSG. La neurogénesis adulta en el GD pasa por 5 etapas. Etapa 1. Proliferación: las células progenitoras neurales dan lugar a células amplificadoras. Etapa 2. Diferenciación: las células amplificadoras se diferencian a neuronas inmaduras. Etapa 3. Migración: las neuronas inmaduras migran una distancia corta hacia la capa granular. Etapa 4. Formación axonal/ dendrítica: las neuronas inmaduras extienden sus proyecciones axonales a través de las fibras musgosas hacia la capa piramidal en la región CA3; las neuronas envían sus dendritas en la dirección opuesta hacia la capa molecular. Etapa 5. Integración sináptica: Las nuevas células granulares recibe aferencias de la corteza entorrinal y manda proyecciones a la región CA3 y la región del hilus. Modificado de [Ming & Song, 2005](#).

Nuestro grupo de investigación demostró que la cópula que conlleva al vínculo de pareja puede modular la neurogénesis adulta. Los machos del topillo de la pradera que cohabitan con hembras y forman un vínculo de pareja muestran un incremento en la proliferación de los precursores neuronales en la zona dorsal de la ZSV ([Castro et al., 2020](#)), región que genera células granulares dopaminérgicas superficiales y neuronas granulares en el BO. Por otro lado, machos expuestos a hembras sexualmente receptivas muestran un incremento en la proliferación de los precursores celulares neurales de la región ventral de la ZSV en comparación con aquellos que copularon, sugiriendo que la exposición a hembras receptivas genera neuronas periglomerulares y granulares en el BO ([Bonfanti et al., 1997](#); [Castro et al., 2020](#); [Ventura & Goldman, 2007](#)).

Por otra parte, hembras que cohabitaron y copularon con el macho muestran un incremento en la proliferación celular en la región dorsal de la ZSV en comparación con hembras que tuvieron contacto social con otra hembra. Sin embargo, la cópula no tiene un efecto en la diferenciación de los precursores celulares en la ZSV. Por lo que se propone que la exposición social al macho es uno de los factores que alteran la neurogénesis en hembras de manera específica por región ([Fowler et al., 2002](#)). Estas nuevas células se ven influenciadas por el nivel elevado de estrógeno derivado del estro inducido y es posible que el efecto hormonal juegue un papel en su supervivencia y migración por la vía rostral migratoria hacia el BO ([Smith et al., 2001](#)).

Un paso importante para su integración a circuitos neurales es la supervivencia de los precursores neurales generados. En topillos hembras, dos días después de la exposición al macho se muestra incremento en la diferenciación celular y en la supervivencia de las neuronas nuevas generadas en la ZSV y el GD que se encuentran en proceso de migración y a las tres semanas las neuronas nuevas que migraron de la ZSV se integran a la capa granular del BO, de forma que el ambiente social actúa como factor que modula la proliferación y supervivencia ([Fowler et al., 2002](#)). Además, 45 días posteriores al inicio de la cohabitación con cópula se ha evaluado la supervivencia de las nuevas neuronas generadas en el BOP, donde en hembras se denota un incremento en el número de nuevas neuronas en la capa granular y glomerular en comparación con hembras sin exposición a un macho ([Castro et al., 2022](#)).

Las células nuevas que se generan por estimulación socio-sexual pueden ser eventualmente integradas al BO y al GD del hipocampo. Estas células pueden involucrarse en procesos de reconocimiento, discriminación, aprendizaje de olores,

formación de memorias a largo plazo y en la respuesta preferente a los olores de la pareja ([Horton & Shepherd 1979](#); [Kirkpatrick et al., 1994](#); [Mak et al., 2007](#); [Oboti et al., 2011](#); [Brus et al., 2016](#); [Kesner 2018](#)), factores que son relevantes en el topillo de la pradera para establecer la identidad de la pareja y la formación del vínculo.

El mecanismo involucrado en el aumento de la proliferación celular y la diferenciación neural inducido por el comportamiento sexual y exposición a un individuo del sexo opuesto aún no es comprendido del todo. Se ha evaluado *in vitro* que la activación de los D2R y D3R tiene efecto en el aumento de la proliferación celular en precursores neurales aislados de la ZSV y favorece el linaje neural durante las etapas de diferenciación y maduración ([Kim et al., 2010](#); [Lao et al., 2013](#); [Lin et al., 2017](#); [Merlo et al., 2011](#); [Sánchez-Vidaña et al., 2016](#)).

Regulación de la expresión génica

La diversidad en los receptores de DA, AVP y OT, así como su regulación tiene por finalidad la modulación de la conducta. El cambio en la expresión de estos receptores nos dirige a preguntarnos ¿Cuáles son los mecanismos genéticos que regulan el patrón de expresión de receptores específico en cada región cerebral?

La regulación génica es el proceso mediante el cual se activa la expresión de los genes o se reprime. Durante el desarrollo, este proceso determina las funciones específicas de la célula. A lo largo de la vida del organismo, la regulación génica interviene en su interacción y respuesta a situaciones del medio ambiente. Este proceso se lleva a cabo por una variedad de mecanismos que incluyen modificaciones estructurales y proteínas de regulación ([Khorasanizadeh, 2004](#)).

La diferenciación celular y la expresión genética en eucariontes tiene un primer punto de control en el inicio de la transcripción. Durante este proceso se determina si un gen será transcrito y la frecuencia con que sucederá. Este proceso requiere de la coordinación de factores de transcripción y su unión a elementos reguladores que facilitarán la unión y acción de la RNA polimerasa II ([Khorasanizadeh, 2004](#); [Kouzarides, 2007](#)). La disponibilidad del DNA a la RNA polimerasa, depende de su unión a proteínas denominadas histonas. La compactación y por tanto el control de la transcripción en eucariotas se consigue por la formación de complejos DNA con histonas, que en conjunto forman la cromatina. La unidad fundamental de la cromatina es el nucleosoma, compuesto por un octámero de histonas (H3, H4, H2A y H2B). Sobre ellas, se enrolla el DNA, en aproximadamente 147 pares de bases. Las histonas interactúan con el DNA por una región central que forma una α -hélice larga y dos cortas, así como un dominio N-terminal de 15 a 30 residuos al cuál se le denomina cola de histidinas. Las colas de histidinas presentan modificaciones postraduccionales que afectan a la estructura de la cromatina y su función ([Khorasanizadeh, 2004](#)).

Los cambios que presenta la organización de la cromatina de forma temporal y espacial se deben a mecanismos celulares que determinan las funciones que realizará la célula ante determinados estímulos. Las modificaciones que exhibe el material genético y su empaquetamiento sin cambiar la secuencia del DNA se denominan modificaciones epigenéticas ([Khorasanizadeh, 2004](#); [Kouzarides, 2007](#)).

Epigenética

El concepto de epigenética se define como cambios heredables en la expresión génica que no son debidos a alteraciones en la secuencia del DNA. Entre los mecanismos epigenéticos se incluyen modificaciones de las histonas, el remodelado

de la cromatina y la metilación del DNA ([Khorasanizadeh, 2004](#)). Estos procesos son importantes para el establecimiento de patrones de expresión génica. Las alteraciones epigenéticas pueden tener consecuencias graves como el desarrollo de múltiples patologías, entre ellas el cáncer ([Khorasanizadeh, 2004](#)).

Remodelado de la cromatina

Los complejos de remodelado de la cromatina son unidades multiprotéicas que requieren de la hidrólisis del ATP para alterar los contactos histona-DNA. Las formas que se lleva a cabo incluyen el desenrollamiento transitorio del DNA del octámero, la formación de bucles de DNA, o el deslizamiento de los nucleosomas a diferentes posiciones. Lo que resulta en cambios en la accesibilidad del DNA nucleosomal a los factores de transcripción ([Kouzarides, 2007](#)).

Metilación del DNA

Aún se conoce muy poco acerca de la función exacta que la metilación tiene en la expresión genética. Sin embargo, varios estudios han propuesto que la metilación del DNA es esencial para la diferenciación celular y el desarrollo embrionario. También se ha reportado que afecta el control de la expresión genética. Por ejemplo, Suzuki y Bird en el 2008 demostraron que la metilación cerca de regiones promotoras varía considerablemente entre tipos celulares, asociando una mayor metilación de promotores con baja o nula transcripción ([Suzuki & Bird, 2008](#)).

Varios estudios han encontrado que la metilación del DNA y la metilación de histonas se encuentran conectadas. Estudios de inmunoprecipitación de células humanas sugieren que ambas trabajan en conjunto durante la replicación para asegurarse de

que los patrones de metilación sean heredados de manera adecuada a las células hijas ([Henikoff, 2004](#)).

Las proteínas que unen los grupos metilo al DNA a su vez se asocian a otros complejos que se encargan de desacetilar histonas para así facilitar o inhibir la transcripción. Si el DNA no presenta marcas de metilación, las histonas desacetilasas no pueden unirse a sus respectivos sitios, de manera que la acetilación en la histona continúa presente promoviendo la transcripción. Esto entre otros procesos coordina la regulación génica.

Modificaciones postraduccionales de histonas

Hasta el momento se han estudiado al menos 8 tipos de modificaciones en las histonas (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, ADP-ribosilación, deiminación e isomerización de prolina) estas son dinámicas y cambian rápidamente ante los estímulos que recibe la célula. Las más estudiadas son: acetilación, metilación y fosforilación ([Khorasanizadeh, 2004](#); [Kouzarides, 2007](#)). La combinación entre ellas proporciona una inmensa cantidad de respuestas celulares. Las modificaciones realizadas en las histonas son llevadas a cabo por complejos enzimáticos de los que poco se ha estudiado ([Kouzarides, 2007](#)). Las modificaciones en las histonas tienen el efecto de cambiar la carga neta de los nucleosomas, este proceso afecta la interacción entre el ADN y las histonas ayudando al plegamiento o desplegamiento de la cromatina. La metilación es la excepción a este efecto, al no alterar la carga neta. La metilación se realiza en los aminoácidos Lisina o Arginina y puede ocurrir una mono-, di- o tri-metilación ([Khorasanizadeh, 2004](#)).

Las modificaciones de histonas actúan de manera combinada formando un código de histonas, que es leído por proteínas con dominios de interacción y presentan consecuencias funcionales al establecer un estado global de la cromatina o bien, regular procesos específicos de la transcripción. El estado de la cromatina puede establecerse por su grado de condensación. Denominándose heterocromatina cuando está altamente empaquetada y es inactiva a la transcripción, este estado suele asociarse con regiones ricas en secuencias repetidas, niveles bajos de acetilación y niveles altos de metilación en residuos como H3K9, H3K27 y H4K20 ([Kouzarides, 2007](#)). En regiones de eucromatina el DNA presentan una mayor flexibilidad, donde las marcas reguladoras de la cromatina pueden activar la expresión de genes o bien permanecer en estado latente; de manera que la combinación de modificaciones en las histonas ayuda en el proceso de activación de la transcripción. Los genes transcripcionalmente inactivos suelen presentar niveles bajos de acetilación, metilación y fosforilación, mientras que aquellos activos muestran niveles elevados de acetilación ([Khorasanizadeh, 2004](#); [Kouzarides, 2007](#)).

Para que la regulación génica se realice correctamente, no sólo es necesario que se presenten regiones de eucromatina y genes preparados para ser leídos. La regulación necesita también de factores de transcripción, que una vez unidos a secuencias reguladoras en el DNA inician la serie de modificaciones que resultan en la expresión del gen.

Metilación en H3K4 y H3K27

H3K4

Una de las modificaciones más estudiadas en la neuroepigenética es la metilación de histonas; especialmente la regulación del marcaje en la histona 3, lisina 4 (H3K4), considerada una marca de activación transcripcional universal del reino eucarionte ([Pinskaya & Morillon, 2009](#)). Esta marca junto con H3K36 y H3K79 se encuentran altamente conservadas y se asocian con eucromatina y loci activamente transcritos. En estudios en ratones, se encontró que mutaciones en los genes codificados en H3K4 están implicados en disfunciones cognitivas. Por ejemplo, mutaciones en el gen de Linaje Leucémico Mixto (MLL por sus siglas en inglés) ocasionan alteraciones en la enzima metiltransferasa con la consecuente formación de proteínas no funcionales en el síndrome de Wiedemann-Steiner. Este síndrome se caracteriza por un retardo en el crecimiento, discapacidad intelectual y crisis epilépticas ([Jones et al., 2012](#); [Ramirez-Montaña & Pachajoa, 2019](#)).

Por lo general, la metilación en H3K4 es una marca de activación transcripcional. Se encuentra involucrada en regiones neuronales involucradas con la memoria, como el hipocampo y el estriado, entre otras. Gracias a las lisinas metil transferasas (KMT) H3K4 puede presentar mono-, di-, o tri metilaciones (me1, me2 y me3). Estos complejos de lisinas metil transferasas han evolucionado creando varios homólogos. En levaduras hay un solo complejo (Set1) el cual opera junto con un complejo multi proteico asociado a Set 1 denominado COMPASS ([Park et al., 2020](#)); mientras que en mamíferos se tiene la presencia de al menos seis complejos homólogos de Set1: dSet1, Trithorax y relacionados a Trithorax. La adición de grupos metilo utiliza el dominio set o Trithorax para catalizar la transferencia del grupo metilo de la 5-adenosil metionina al amino lateral de la cadena en H3K4. La metilación al ser un proceso dinámico requiere de enzimas “borradoras” denominadas lisina desmetilizas (KDM). Los humanos tenemos 6 KMD, se ha postulado que cada una tiene preferencia por

determinadas ubicaciones genéticas. La familia KMD1 (KMD1A y KMD1B) se encargan de remover grupos metilo de H3K4me2 y H3K4me1; mientras que la familia KMD5 (KDM5A, KDM5B, KDM5C y KDM5D) remueven de manera general metilos de las tres formas de marcaje en H3K4. Se ha postulado que la diferencia en el mecanismo de acción se debe a modificaciones estructurales. Las KMD1 son enzimas dependientes de FAD, desmetilan por un dominio amino oxidasa que requiere un par de electrones libres en la cadena lateral para oxidar el enlace. En el caso de la trimetilación no se cuenta con electrones libres. La familia KMD5 cuenta con un dominio Jumonji (JmjC) que depende de hierro y α -cetoglutarato. Este dominio no requiere formar dobles enlaces carbono-nitrógeno en el proceso de desmetilación, por lo que puede desmetilar H3K4me3 (figura 4) ([Collins et al., 2019](#)).

Además de la regulación por complejos como MLL, la interacción entre marcas como la ubiquitinación de H2BK123 y H3R2me1 son necesarias para que H3K4me2 y H3K4me3 sean eficientes. Esta regulación es una de las mayores caracterizaciones entre la interacción de marcas. Las me1, me2 y me3 de H3K4 están distribuidas en forma de gradientes en genes que se están transcribiendo ([Park et al., 2020](#)). H3K4me3 se localiza en las regiones de inicio de la transcripción, por lo que contribuye al inicio, alargamiento y procesamiento del RNA a través del complejo formado por TAF1, ISWI/NURF y CHD1. Por el contrario, en levaduras, H3K4me2 presenta una mayor presencia dentro de la región codificante, recluta al complejo Set3 y HDC para desacetilar la región 5' del gen ([Park et al., 2020](#); [Pinskaya & Morillon, 2009](#)).

H3K4me3 se encuentra en el 80% de los genes humanos que son transcritos activamente. Así, H3K4me3 en la región promotora puede interactuar con el dominio

PHD del factor de iniciación de la transcripción TAF3, que recluta a TDIID y facilita el ensamblaje del complejo de pre-iniciación. Así mismo, interactúa con el factor remodelador de la cromatina dependiente de ATP (Chd1), esta interacción recluta factores necesarios para la maduración del RNAm. Una de las posibles funciones de H3K4me3 es unir desacetilasas de histonas represivas a loci particulares, en mamíferos se recluta al complejo PHD con la subunidad ING2 para reprimir al gen Cyclin D ([Park et al., 2020](#)).

Los dominios con una mayor presencia de H3K4me3 se localizan en genes relacionados con la transmisión sináptica, la plasticidad sináptica y rutas GABAérgicas en la corteza prefrontal humana. Los cambios en los patrones de metilación se han localizado en algunas alteraciones relacionadas con plasticidad neural como el autismo y la esquizofrenia. En estos padecimientos, la marca H3K4me3 se muestra más enriquecida de lo normal en algunos genes, por ejemplo, en el gen para el canal dependiente de voltaje de potasio KCNC3, o en los genes GRIN2A y GRIN2B para subunidades de receptores glutamatérgicos ([De Rubeis et al., 2014](#); [Park et al., 2020](#); [Shulha et al., 2012](#); [Tarabeux et al., 2011](#)).

La regulación de la transcripción en el hipocampo es necesaria para la formación de memorias a largo plazo. En humanos, la mutación en MLL1/KMT2A y MLL2/KMTDB se asocian con incapacidad intelectual ([Park et al., 2020](#)). En el hipocampo de ratones se ha reportado el incremento de H3K4me3 una hora después de electroshock, seguido de un decremento en las 24 horas en pruebas de asociación a miedo. Los niveles de H3K4me3 en ratones inducidos al miedo incrementan en el gen Zif268, un factor de transcripción necesario en la plasticidad neuronal y formación de la memoria ([Park et al., 2020](#)). Se ha demostrado que genes asociados a regiones con mayor

presencia de H3K4me3 son activados transcripcionalmente y están involucrados en el desarrollo del sistema nervioso, aprendizaje, ensamblaje sináptico y plasticidad neural ([Park et al., 2020](#)). Dada su relevancia en la regulación transcripcional, su papel en la memoria, así como ser una marca altamente conservada entre las especies se abordará su posible participación en el vínculo de pareja en el topillo de la pradera hembra.

H3K27

La metilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3K27me1) es un proceso llevado a cabo por el complejo represivo Polycomb 2 (PRC2) y es una marca de heterocromatina facultativa en diversos organismos. H3K27me3 suele encontrarse junto con H3K4me3, de forma que juntas crean una marca de genes bivalentes donde, después de la diferenciación de las células neurales troncales, alguna de las dos marcas se perderá ([Ezponda & Licht, 2014](#)). A pesar de varios años de investigación aún no se comprende por completo como este marcaje funciona en la represión de genes y cómo se regula. El dominio SET del PRC2 en su componente EZH2 cataliza la di- metilación y tri-metilación (H3K27me2/3) y requiere de EED y SUZ12 para su correcta función. Se ha propuesto que el complejo PRC1 ayuda a mediar la represión transcripcional por medio de K2AK119 y su monoubiquitinación (H2Aub1) (figura 4) ([Ezponda & Licht, 2014](#); [Wiles & Selker, 2017](#)). Estudios de inmunoprecipitación de cromatina seguidos por secuenciación (ChIP-seq) en células neurales troncales extraídas de la ZSV de babuinos encontraron más de 62 genes implicados en diversos procesos del ciclo celular, desde mantenimiento celular hasta señalización y proliferación enriquecidos con esta marca. En estudios *in vivo*, EZH2/H3K27me3 se asoció con regulación del ciclo celular durante la neurogénesis adulta, sugiriendo su

participación en procesos de protección para minimizar expresión génica inapropiada y consecuentemente prevenir que las células neurales troncales entren de manera anormal al ciclo celular (Rhodes et al., 2016).

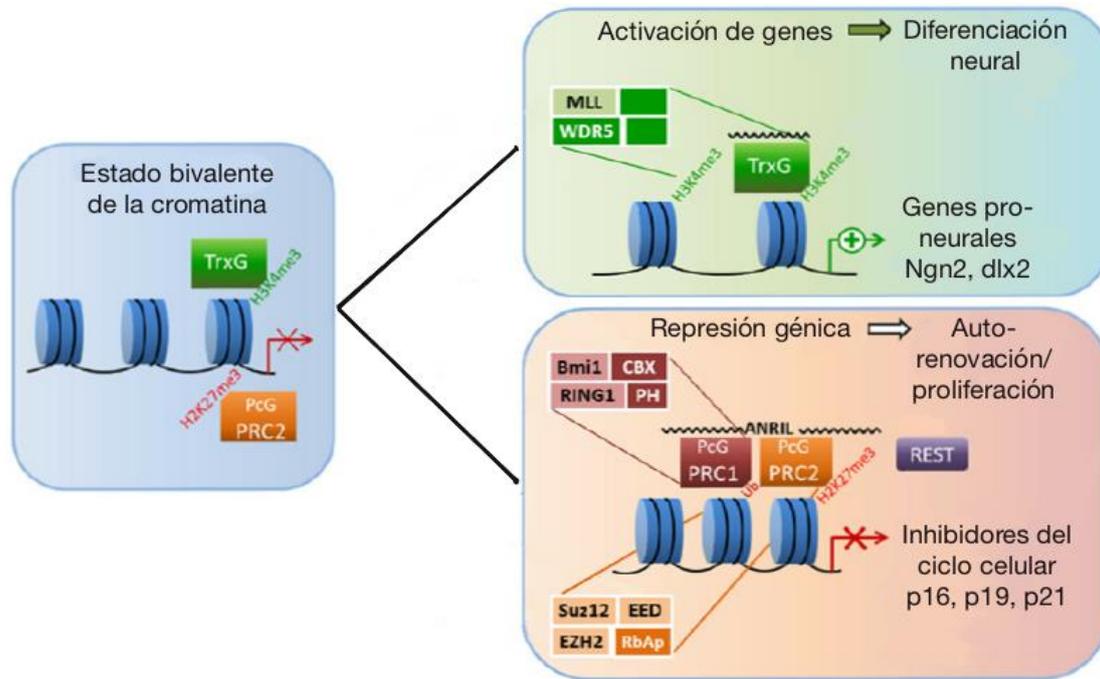


Figura 4. Rol del complejo Polycomb y del complejo Trithorax en la neurogénesis. El complejo Trithorax (TrxG) se asocia con la activación de la histona, propiciando la diferenciación neural mientras que el complejo Polycomb (PcG) es asociado con la represión de las histonas, propiciando la disminución en la proliferación. Modificado de Srinageshwar et al., 2016.

Antecedentes

Cambios en la acetilación durante la formación de vínculos de pareja en el topillo hembra

Los estudios llevados a cabo por Wang y su equipo de trabajo demostraron que en el topillo de la pradera hembra la administración de un inhibidor de la desacetilasa de histonas incrementa la acetilación de histonas en el NAcc, lo cual favorece la preferencia por la pareja sexual en ausencia de cópula. Este efecto también fue

reportado en las hembras que cohabitaron con el macho y copularon *ad libitum*. El aumento de la acetilación en el NAcc produce un incremento en la expresión de OXTR y AVPR1a ([Wang et al., 2013](#)). Durante este proceso, la acetilación global de H3 no se ve alterada. Sin embargo, la acetilación en H3K14 en la región promotora del OXTR incrementa y se asocia con el aumento en la expresión del RNAm de OXTR y sus niveles de proteína. Este incremento en OT y sus receptores en el NAcc es característico de la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera hembra bajo condiciones normales de cohabitación. De forma similar en el topillo de la pradera macho, el tratamiento con un inhibidor de las desacetilasas de histonas facilita la formación del vínculo de pareja en la ausencia de cópula. Este proceso se asocia con un incremento en la expresión de OXTR en el NAcc sin que se incremente la expresión de AVPR1a. Proceso similar al observado en los machos durante la formación de vínculo asociado a la cópula ([Duclot et al., 2016](#))

Dado que en conjunto la OT, la AVP y la DA en el NAcc modula la preferencia de pareja tanto en machos como en hembras, es posible que la liberación de DA en el NAcc module los niveles de expresión de sus receptores sólo después de un periodo extenso de cohabitación. Proceso importante para la consolidación y mantenimiento del vínculo de pareja.

Planteamiento del problema

Los mecanismos moleculares involucrados en la formación de vínculos de pareja en el topillo hembra aún no se conocen completamente. En particular, los cambios epigenéticos pueden desempeñar un papel sumamente relevante en la modulación de esta conducta socio-sexual. Se ha demostrado que los cambios en el patrón de acetilación de histonas pueden facilitar la formación de vínculos de pareja ([Wang et](#)

[al., 2013](#)). Por otra parte, cambios en el patrón de metilación de las histonas también podrían estar involucrados. Las modificaciones epigenéticas que consisten en la metilación de los sitios CpG del DNA y las modificaciones covalentes de las colas N-terminales del núcleo de las histonas son reguladores críticos de la estructura de la cromatina y la expresión de genes. La metilación de la histona 3 en la lisina 4 (H3K4) activa la transcripción y se ha involucrado en procesos de aprendizaje y memoria. Mientras que la metilación de la histona 3 sobre la lisina 27 (H3K27) es una marca bien establecida de la represión de la cromatina, mediante la activación del complejo represivo Polycomb en diversas especies.

Los cambios en la marca de tri-metilación en las lisinas 4 y 27 de la histona 3 se evaluarán en la ZSV y en el GD, nichos neurogénicos donde se ha demostrado que la estimulación sexual incrementa el potencial de proliferación y diferenciación de los precursores neurales del topillo hembra ([Smith et al., 2001](#); [Fowler et al., 2002](#)). Estos cambios en la metilación pueden ser específicos de genes propios de las células troncales/precursoras neurales (Sox2, Nestina, etc.).

Por otro lado, en el topillo de la pradera se han identificado regiones y circuitos neuronales fundamentales en la modulación de los vínculos de pareja, siendo el NAcc y el septum lateral regiones clave ([López-Gutiérrez et al., 2021](#)). Anteriormente, se ha demostrado que cambios epigenéticos en las neuronas oxitocinérgicas del NAcc y neuronas vasopresinérgicas de la corteza retrosplenial favorecen la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera ([Wang et al., 2013](#)). No obstante, son los únicos avances en nuestro conocimiento en donde se evalúa el papel de la epigenética en el despliegue de esta conducta.

De esta forma, en este proyecto evaluaremos si en el topillo hembra la formación del vínculo de pareja conlleva a cambios en la metilación de la H3K27 y H3K4 en la ZSV, el GD y el NAcc. Esto sugeriría mecanismos epigenéticos involucrados para la formación del vínculo de pareja.

Justificación

En nuestra especie, las interacciones sociales son fundamentales en el mantenimiento de la civilización. A nivel personal, los vínculos sociales estables y duraderos, como lo es la relación de pareja, son críticos para una buena salud mental y física. Los mecanismos moleculares, celulares y de plasticidad neuronal involucrados en los vínculos de pareja por razones éticas y por su complejidad son difíciles de estudiar en nuestra especie, por lo que la investigación en animales es fundamental para entender estos procesos. El topillo de la pradera es un modelo óptimo para el abordaje de esta conducta al ser una de las pocas especies de mamíferos que en condiciones naturales y de laboratorio forma vínculos de pareja estables. En este proyecto elucidamos si modificaciones epigenéticas en la metilación de histonas H3K4 y H3K27 en el sistema nervioso central están involucradas en la formación del vínculo de pareja en el topillo hembra.

Hipótesis

En el topillo hembra la formación de vínculo de pareja incrementará la marca H3K4me3 en la ZSV, el GD en células con fenotipo de precursores neurales (Sox2+ o GFAP+) y en el NAcc, donde terminales axonales de neuronas tirosina hidroxilasa

positivas (TH+) convergen, en comparación con los topillos hembra control; mientras que disminuirá la marca de metilación global de la H3K27me3 en las regiones neuronales ya mencionadas.

Objetivos

1. Determinar la población celular en la ZSV y el GD (precursores neurales Sox2+ o GFAP+) e identificar cambios en el patrón global de las marcas epigenéticas H3K4me3 y H3K27me3 en la ZSV y en el GD, regiones consideradas nichos neurogénicos en el topillo hembra adulto asociado a la formación del vínculo de pareja.
2. Identificar en el NAcc las terminales axonales con presencia de tirosina hidroxilasa (TH+) y determinar cambios en el patrón global de las marcas epigenéticas H3K4me3 y H3K27me3 en la formación del vínculo de pareja del topillo hembra adulto.

Materiales y Métodos

Los animales del pie de cría fueron donados por el Dr. Larry Young de la Universidad de Emory en Atlanta GA, USA. Los topillos de la pradera fueron alojados en el Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, en un cuarto exclusivo para esta especie. Para iniciar nuestra colonia las unidades reproductivas fueron conformadas con sujetos no emparentados familiarmente. Después del destete los topillos fueron alojados con un máximo 5 individuos en cajas hogar por sexo y edad, en cada unidad había sujetos de al menos dos unidades reproductivas.

Los animales reciben ad libitum comida para conejos (5326, LabDiet), semillas de girasol y avena, con libre acceso a agua. Las cajas hogar contienen alrededor de 5 centímetros de aserrín y se les provee de viruta de papel estraza para que los sujetos puedan hacer sus nidos. El cuarto se mantiene en condiciones de temperatura y humedad controladas en un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los topillos de la pradera tienen ciclos de actividad ultradiana, en los cuales los ciclos de actividad ocurren a través del día y la noche en periodos de 1-4 horas ([Nelson, 1985](#)) por lo que en esta especie los estudios conductuales se realizan en el ciclo de luz. Todos los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con la “Ley general de salud en materia de investigación para la salud” de la Secretaría de salud de México, la cual se basa en los lineamientos de la agencia de investigación médica de Estados Unidos (NIH) para el uso y cuidado de animales en investigación. El protocolo experimental fue aprobado por el comité de bioética del Instituto de neurobiología.

Para la realización de los objetivos planteados, se siguió la metodología descrita a continuación:

Animales estímulo

Se seleccionaron machos estímulos (machos utilizados para el despliegue conductual en las hembras experimentales) los cuales no tuvieran una relación de parentesco familiar con las hembras experimentales. Para evitar la gestación durante la cohabitación con cópula, los machos fueron vasectomizados de acuerdo con procedimientos estándares del laboratorio. Para adquirir experiencia sexual, los machos tuvieron tres sesiones de una hora de cópula con hembras que no participaron en el proyecto. Estas hembras fueron ovariectomizadas y se les dejó recuperar de la cirugía por dos semanas, posteriormente se les administró benzoato

de estradiol (0.5 µg s.c./día Sigma-Aldrich) por cinco días consecutivos para inducir receptividad sexual (hembras estímulo) ([Roberts et al., 1998](#)).

Grupos experimentales

Se obtuvieron dos grupos experimentales de topillos hembra: a) grupo control formado por dos hembras que cohabitaron en cajas hogar limpias; y b) grupo vínculo de pareja, constituido por hembras gonadalmente intactas que copularon libremente con machos sexualmente expertos vasectomizados.

A las 24 horas del inicio de la cohabitación los sujetos realizaron una prueba de preferencia de pareja para determinar si formaron el vínculo de pareja. Al término de la prueba los animales regresaron a su caja hogar y fueron sacrificados 24 horas después, tiempo que estudios previos han mostrado suficiente para inducir preferencia de pareja e incrementar los niveles de estradiol en la hembra producido por la estimulación del macho (cohabitación con o sin cópula) ([Carter et al., 1989](#); [Williams et al., 1992](#); [Gobrogge 2014](#)).

Prueba de preferencia de pareja

Las hembras del grupo vínculos de pareja realizaron la prueba de preferencia de pareja 24 h después de estar en contacto con el macho. Dicho procedimiento se realizó en una cámara de acrílico con tres compartimentos (figura 5). En uno de ellos se colocó a la pareja sexual de la hembra experimental y en el compartimento opuesto a un macho no conocido por la hembra (mismo peso, edad y experiencia sexual que la pareja sexual). Los machos fueron atados por su cuello por medio de collares y correas de metal para que no pudieran salir de su compartimento, pero tuvieran la

libertad para interactuar con la hembra dentro de su zona de confinamiento. Las pruebas tuvieron una duración de dos horas, dentro de las cuales se registró el tiempo que las hembras pasaron en cada compartimento, parámetros copulatorios, agresividad y la latencia de contacto lado a lado. Al término de la prueba las parejas regresaron a su caja hogar ([Williams, Catania, et al., 1992](#)).

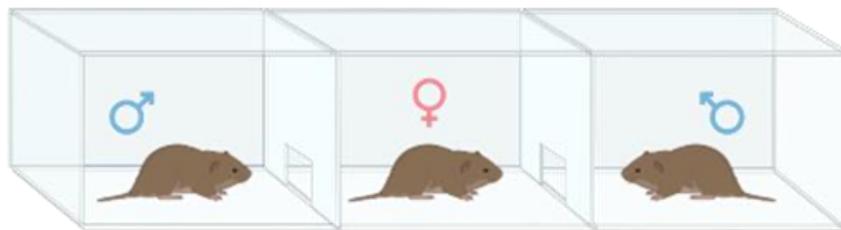


Figura 5. Arena de la prueba de preferencia de pareja de tres compartimentos.

Determinación de la distribución anatómica de la marca global de tri-metilación de la H3K4 y H3K27 en precursores neuronales y células TH positivas

Inmunohistoquímica

Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital (150 µg/g Cheminova) y sacrificados mediante perfusión intracardiaca con paraformaldehído (Sigma Aldrich) al 4% en PBS 0.1M, los cerebros se mantuvieron en solución de paraformaldehído al 4% por 1 hora. Posteriormente, los cerebros fueron removidos y almacenados en solución amortiguadora de fosfatos- sacarosa (J.T. Baker) al 30% en PBS a 4°C por al menos 24 horas. Con ayuda de un criostato (Leica CM1850) se obtuvieron cortes coronales de los cerebros de 20 µm de grosor, que incluían las regiones de interés.

Zona Subventricular y Giro Dentado

En la ZSV y el GD, se realizaron dobles marcajes para H3K4me3 con Sox2. Con relación a la marca epigenética H3K27me3 se analizó su localización nuclear con el marcador de células neurales troncales GFAP en ambas regiones.

Primeramente, se seleccionaron cortes coronales de la ZSV y del GD y se realizaron tres lavados consecutivos con solución PBS 0.1M y se procedió a permeabilizar el tejido con solución de tritón al 0.3% en PBS por 15 min en agitación y a temperatura ambiente (T.A.). Al terminar el tiempo de incubación, se retiró por completo el tritón y se continuó con un bloqueo con solución de suero de albumina bovina V A9418 (Sigma Aldrich) 5% / tween (BioRad) 0.05% por 30 min en agitación, a T.A. A continuación, se incubaron por 12 horas a 4°C los anticuerpos primarios H3K4me3 (ab600 Abcam, desarrollado en ratón, dilución 1:500) y H3K27me3 (ABE44 Millipore, desarrollado en conejo, dilución 1:1000) en combinación con los anticuerpos SOX2 (ab9249 Abcam, desarrollado en conejo, dilución 1:500) y GFAP (Millipore, desarrollado en ratón, dilución 1:500). Una vez concluido el tiempo de incubación, se prosiguió con tres lavados consecutivos con solución PBS 0.1M y se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario (Alexa 488 anti-IgG de conejo y Alexa 568 anti-IgG de ratón, Alexa 488 anti-IgG de ratón y Alexa 568 anti-IgG de conejo (Molecular Probes Invitrogen); diluciones 1:1000) por una hora en agitación y en oscuridad, de acuerdo con las combinaciones correspondientes con los anticuerpos primarios.

Posterior a la incubación, se realizaron dos lavados consecutivos con solución PBS 0.1 M a T.A., con agitación y en oscuridad y se realizó una tinción de Hoechst (Invitrogen) utilizando una dilución 1:2000 en PBS e incubando por seis min. Se

prosiguió a realizar dos lavados con solución PBS y se montaron los cortes a analizar utilizando Aqua-Poly mount (Polysciences) sobre portaobjetos. Las muestras fueron visualizadas por microscopía confocal utilizando el microscopio Zeiss LSM700 mediante el objetivo 20x. Utilizando el software de microscopía Zen Black, primeramente, se determinaron los parámetros y configuración de los laser a emplear para la obtención de imágenes (Anexo 2). Una vez establecidos, se analizaron muestras de las regiones de interés al menos por duplicado por cada animal (control y formación de vínculo).

Núcleo Accumbens

Para analizar los posibles cambios en las aferencias catecolaminérgicas en el NAcc, como parte del proyecto de estadía profesional de María del Carmen Cortéz del Instituto Tecnológico de Corregidora se estandarizó el protocolo para inmunofluorescencia de tirosina hidroxilasa (TH) y las marcas epigenéticas, desarrollando la siguiente técnica a partir de protocolos previos del laboratorio y tomando como referencia la metodología de Takeuchi y colaboradores ([Takeuchi et al., 2020](#)).

Se seleccionaron los cortes histológicos correspondientes a las coordenadas AP: 2.20 mm- 1.0 mm; ML: 0.6mm-3.0mm a 0.6mm-2.6mm con respecto a Bregma ([Paxinos & Watson, 2006](#)). Los cortes por triplicado seleccionados de cada animal se lavaron con PBS 0.1M (3 veces por 1 min, 400 µL aprox) en agitación. Posteriormente fueron incubados en una solución de bloqueo (5% suero de cabra, 0.3% tritón (Sigma Aldrich) PBS 0.1M 1 hora T.A.). A continuación, se retiró la solución de bloqueo y se incubaron los cortes con los anticuerpos primarios: H3K4me3 (ab600 Abcam, desarrollado en ratón, dilución 1:500) junto con TH (AB152 Millipore, desarrollado en conejo, dilución

1:5000) y H3K27me3 (ABE44 Millipore, desarrollado en conejo, dilución 1:1000) en combinación con TH (mAb 45648 Cell signalling, desarrollado en ratón, dilución 1:800) toda la noche a 4°C con agitación continua. Al término los cortes se lavaron con PBS (2 veces, 4 min) y fueron incubados con los anticuerpos secundarios respectivos (Alexa 488 anti-IgG de conejo y Alexa 568 anti-IgG de ratón, Alexa 488 anti-IgG de ratón y Alexa 568 anti-IgG de conejo (Molecular Probes Invitrogen; diluciones 1:1000) en oscuridad, por una hora a T.A. en agitación. A partir de este paso se trabajó en condiciones de poca luz. Pasado el tiempo de incubación con anticuerpos secundarios los cortes fueron lavados con PBS 0.1M (2 veces por 4 min) y se incubaron con Hoechst (Invitrogen)1:2000 por 6 min en agitación constante a T.A. para luego lavarse con PBS 0.1M dos veces por 4 min. Al terminar con el proceso de inmunohistoquímica los cortes se montaron en portaobjetos con Aqua-Poly Mount (Polysciences). Las muestras fueron visualizadas por microscopia confocal utilizando el microscopio Zeiss LSM 700 mediante el objetivo 20x. Utilizando el software de microscopia Zen Black, primeramente, se determinaron los parámetros y configuración de los laser a emplear para la obtención de imágenes (Anexo 2). Una vez establecidos, se analizaron muestras de las regiones de interés al menos por duplicado por cada animal (control y formación de vínculo).

Análisis de fotomicrografías

Se obtuvieron fotomicrografías con 5-6 planos en z y se delimitaron las áreas a analizar (regiones anatómicas). Dependiendo de la marca analizada, así como la densidad celular por área se procedió a realizar un análisis de las marcas desarrollando protocolos (Anexo 3) de procesamiento semiautomatizado en el programa de libre dominio FIJI.

Para realizar el conteo celular relativo en la ZSV de los núcleos SOX⁺/H4K3me³⁺ se seleccionó el plano medio del compendio en z, por tener la mejor señal de fluorescencia ([Castro et al., 2020](#)). Se calibraron los parámetros de tamaño de la imagen en Fiji, tomando los valores del microscopio (distancia en pixeles: 972, distancia conocida 1150 μm) y se delimitó el área correspondiente a la ZSV. Para definir los núcleos individuales y poder realizar su conteo en cada fotomicrografía, se determinó el tamaño y circularidad promedio de las partículas denominadas núcleos, así como los filtros necesarios para que la delimitación en la imagen sea posible. Se crearon macros para el conteo de núcleos celulares a 438 nm, así como el conteo de partículas que expresaran la marca de precursores neurales SOX2 a 488 nm con la marca epigenética H3K4me3 a 568nm. Una vez desarrollado el protocolo, se corrió en cada una de las imágenes por animal y posteriormente se promediaron el número de células totales y células SOX2⁺/ H3K4me³⁺ por animal calculando el porcentaje relativo de precursores neurales que expresen H3K4me3 en la población celular total (figura 6).

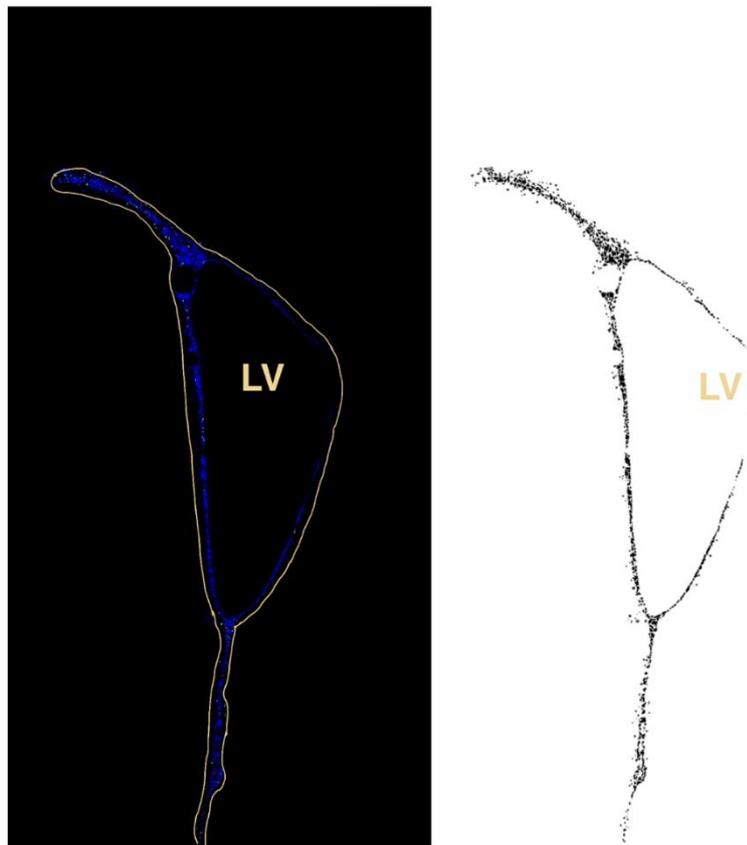


Figura 6. Fotografías del proceso de delimitación y conteo celular semiautomatizado mediante el uso del programa FIJI. Izquierda: delimitación de la zona ventricular en imagen de la tinción nuclear de Hoechst. Derecha: imagen invertida durante el análisis para conteo celular

Dada la densidad celular, así como la naturaleza de las marcas, el análisis de SOX2/H4K4me3 en el GD, GFAP/H3K27me3 en la ZSV y el GD y TH/H3K4me3, TH/H3K27me3 en el Nacc, se realizó por medio de densidad integrada. Para ello primero se calibraron los parámetros de tamaño de imagen en FIJI y se delimitaron las áreas a analizar. Posteriormente, la intensidad de fluorescencia por área fue medida por canales separados y se le restó el valor correspondiente a fondo para eliminar el valor de autofluorescencia (Anexo 3).

Dado el conteo celular y medición de densidad integrada se procedió a su análisis estadístico utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism 8.

Análisis Estadístico

Considerando el tamaño de nuestra muestra y asumiendo observaciones independientes, se analizó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk con un nivel de significancia de 0.05. Para comparar muestras que presentaron una distribución normal (*i.e.*, $p > 0.05$) se empleó una prueba t de student pareada o para muestras independientes según lo indicase la información. Para datos con distribución no normal, se empleó la prueba U de Mann-Whitney para comparar las muestras. Dado el tamaño muestral (7 y 8 individuos) y el análisis de la distribución de los datos y con el fin de unificar el análisis estadístico por región. Los análisis respectivos a la ZSV fueron analizados mediante la prueba t de student, al igual que el análisis de porcentaje de colocación de señal en el GD. Por su parte, las poblaciones en el GD y en el NAcc fueron evaluadas mediante la prueba U de Mann-Whitney. Todos los análisis se realizaron con una significancia de $p < 0.05$.

Resultados

Prueba de preferencia de pareja

Se obtuvo un grupo experimental de siete hembras que cohabitaron y copularon con su pareja por 24 h y posteriormente realizaron la prueba de preferencia de pareja. Los datos fueron analizados con la prueba t pareada (figura 7).

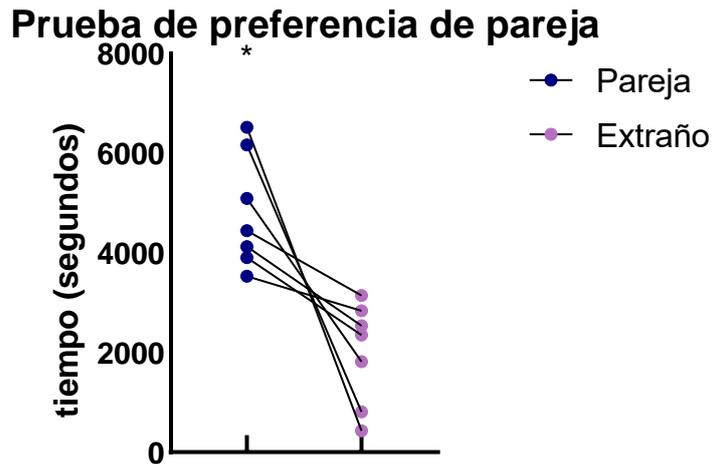


Figura 7. Prueba de preferencia de pareja, se cuantificó el tiempo que las hembras pasan con su pareja sexual y con un macho extraño ($n=7$). Los datos se representan por cada sujeto. Diferencias estadísticamente significativas fueron encontradas entre tiempo con la pareja y el extraño $*p<0.05$.

Los datos demuestran que las hembras presentan una preferencia significativa por su pareja sexual en comparación con el extraño ($t_{(6)}=3.517$; $p=0.0126$).

Para determinar si la cohabitación con cópula efectivamente induce una respuesta fisiológica que conlleva a la receptividad sexual, se evaluó el peso uterino. En la figura 8 se muestra el peso uterino de las hembras control y vínculo (figura 8).

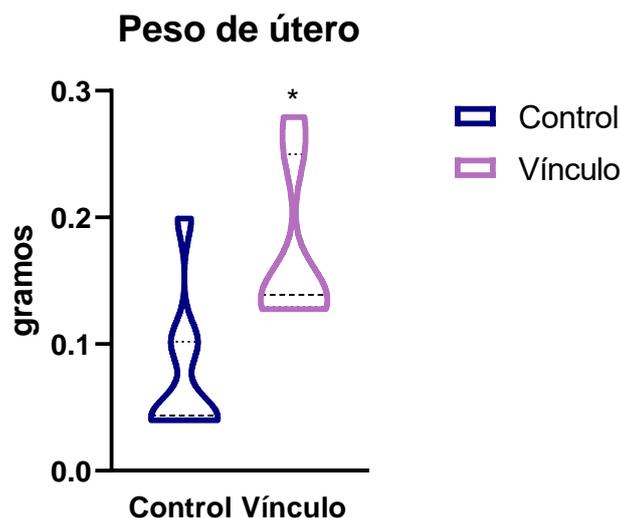


Figura 8. Peso de los úteros disectados de hembras control y vínculo (el número de topillos por grupo se indica en cada columna). Los datos son presentados como mediana y su rango intercuartílico. Mediante la prueba U de Mann-Whitney se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de hembras * $p < 0.05$.

Donde se encontró un incremento significativo en el peso del útero de hembras que cohabitó y copuló con el macho en comparación con las hembras control (U=5; $p=0.0059$).

Al tratarse de hembras gonadalmente intactas, el incremento en el peso del útero de aquellas hembras cohabitando con el macho demuestra la inducción de un estado de receptividad sexual inducido por la variación hormonal, donde los niveles de estrógeno incrementan y activan una serie de cambios a nivel del sistema reproductor entre los que se encuentra el incremento de vascularización y tejido del endometrio y consecuente aumento de peso en el útero ([Carter et al., 1989](#); [Williams, Catania, et al., 1992](#)).

Identificación de la población celular en regiones anatómicas

Se detectaron las marcas epigenéticas en la ZSV, el GD y el NAcc las cuales son nucleares como lo muestra su colocalización con la tinción de Hoechst (figuras 9-21). Así mismo, el marcaje nuclear observado para Sox2 colocaliza con H3K4me3 en la

ZSV (figura 13) y GD (figura 15). Con relación a la inmunofluorescencia de H3K27me3 con GFAP, el marcaje colocaliza en los nichos neurogénicos (figura 16 y 17) mostrando la marca epigenética en una región nuclear delimitada y GFAP en región citoplasmática.

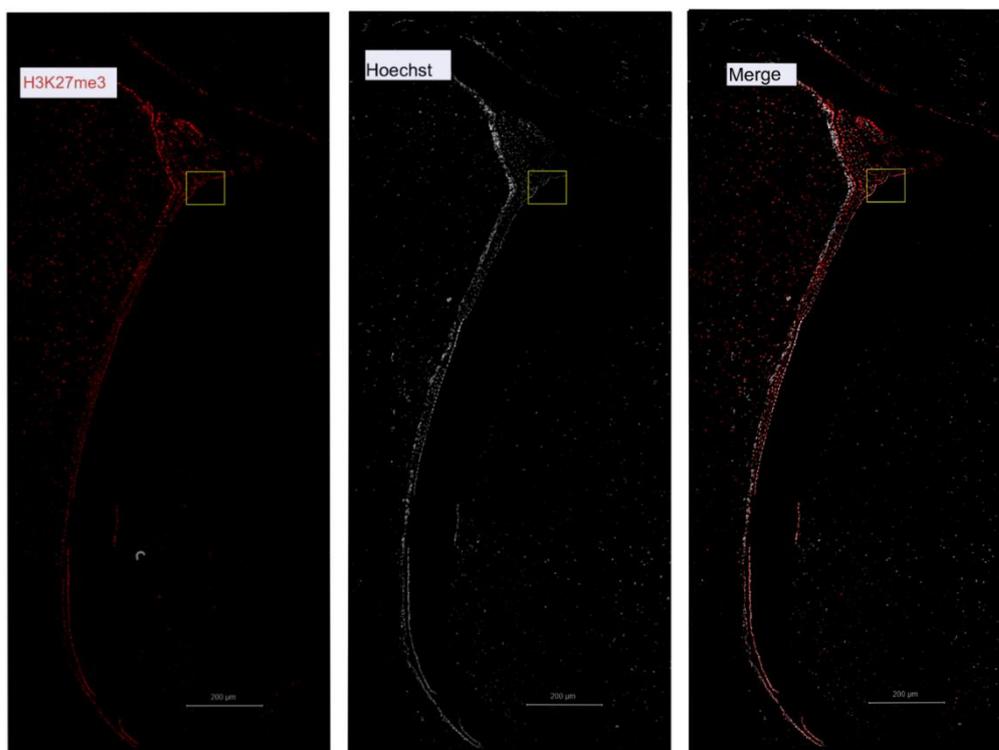


Figura 9. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en ZSV de topillo adulto hembra control (fotografías tomadas a 20x). Izquierda: marcaje para H3K27me3; Panel Central: tinción nuclear con Hoechst; Derecha: doble marcaje con H3K27me3 y Hoechst. El recuadro señala zona ejemplo del marcaje de H3K27me3 en colocalización con la tinción nuclear de Hoechst en la ZSV presentada en la figura 10.

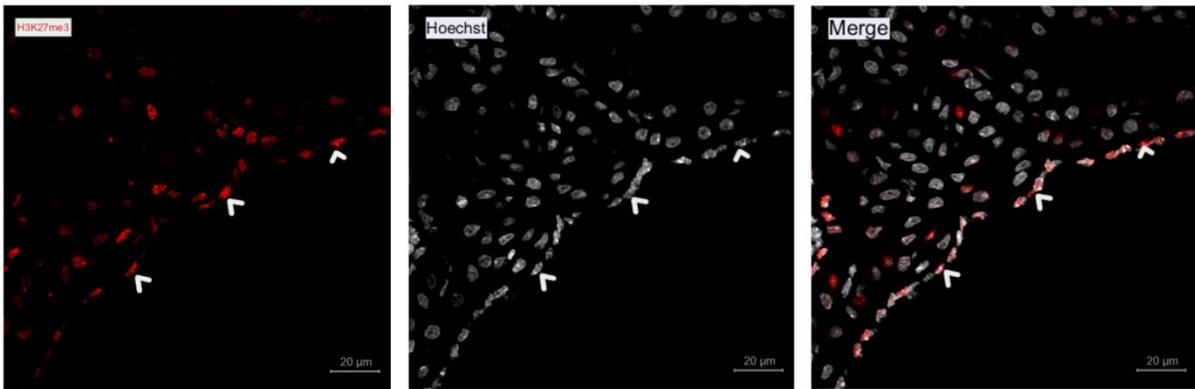


Figura 10. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en la ZSV de topillo adulto hembra control (fotografías tomadas a 40x, barra de escala a 20µm) Las flechas señalan células que muestran distribución nuclear de la marca epigenética H3K27me3, colocalizando con tinción nuclear de Hoechst. Izquierda: marcaje para H3K27me3; Panel central: tinción nuclear con Hoechst; Derecha: doble marcaje con H3K27me3 y Hoechst.

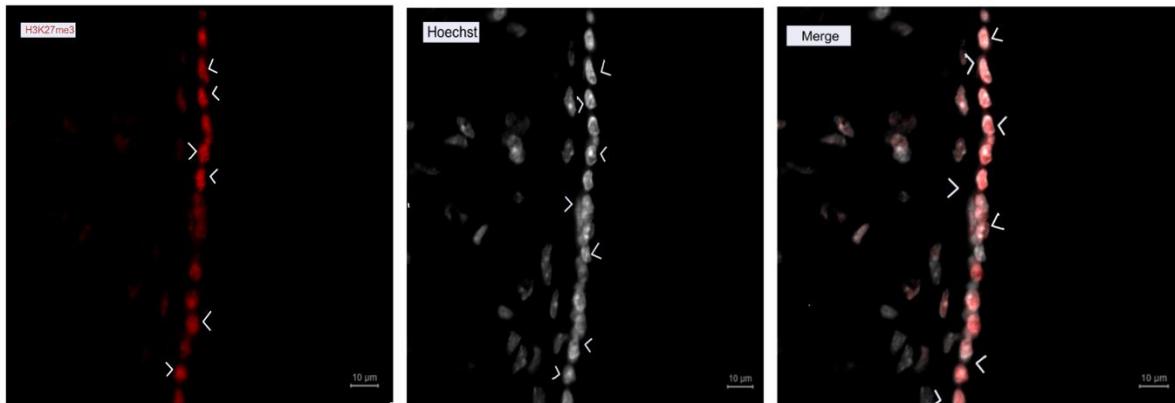


Figura 11. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en ZSV de topillo adulto hembra control (fotografías tomadas a 20x, barra de escala a 10µm). Las flechas señalan células que muestran distribución nuclear de la marca epigenética H3K27me3, colocalizando con tinción nuclear de Hoechst. A) marcaje para H3K27me3; B) Tinción nuclear con Hoechst; C) Doble marcaje con H3K27me3 y Hoechst.

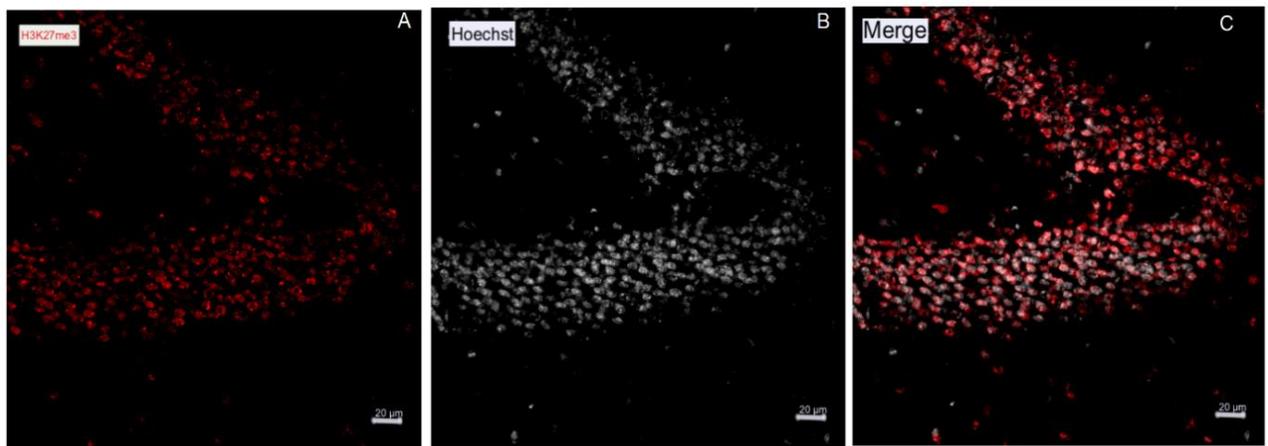


Figura 12. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en el GD de hembra control. A) marcaje para H3K27me3 (fotografías tomadas a 20 x, escala a 20 μm); B) Tinción nuclear con Hoechst (a 20 x, escala 20 μm); C) Doble marcaje con H3K27me3 y Hoechst (fotografías tomadas a 20 x, escala a 20 μm).

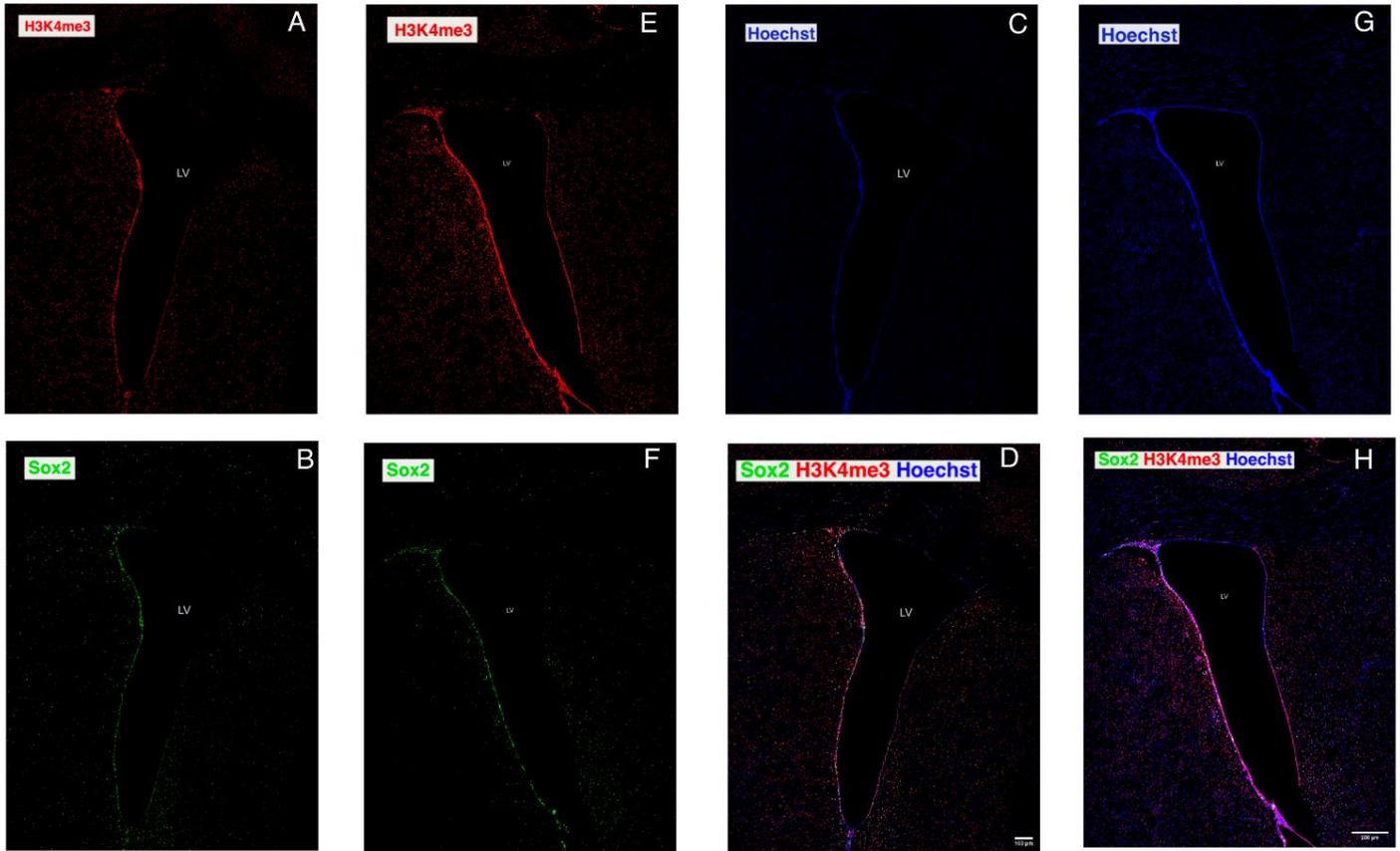


Figura 13. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en ZSV de topillo adulto hembra control (A-D) y vínculo (E-H) (fotografías tomadas a 20x, escala a 100µm). A) y E) marcaje para H3K4me3; B) y F) marcaje para Sox2; C) y G) tinción nuclear de Hoechst D) y H) Doble inmunocuímica para marcaje con H3K4me3 y Sox2 colocalizando con tinción nuclear de Hoechst. LV: ventrículo lateral.

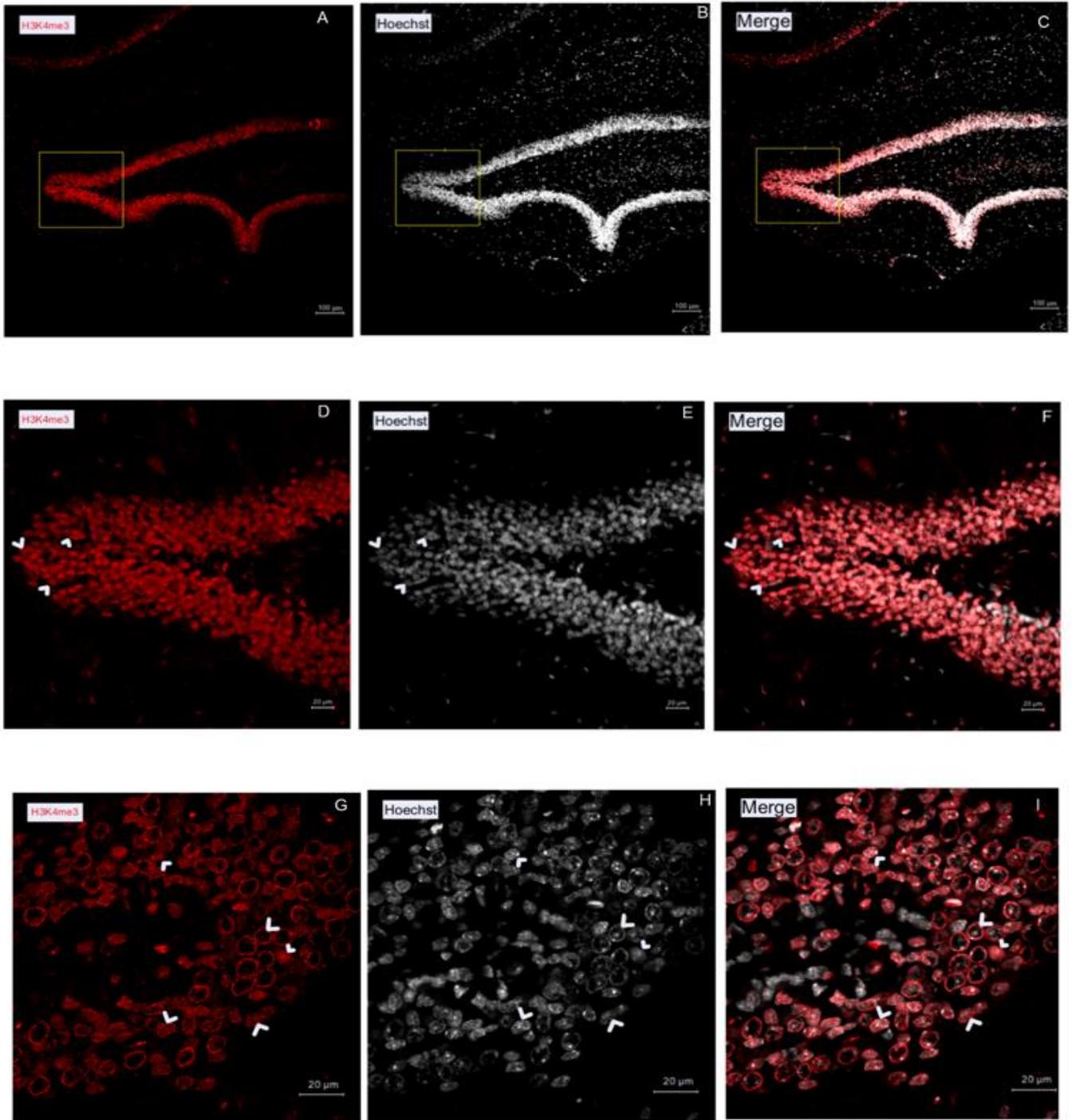


Figura 14. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en GD de topillo adulto hembra control A) marcaje para H3K4me3 (fotografías tomadas a 10 x, escala a 100 μ m); B) Tinción nuclear con Hoechst (a 100 x, escala 100 μ m); C) Doble marcaje con H3K4me3 y Hoechst (fotografías tomadas a 10 x, escala a 100 μ m); D) marcaje para H3K4me3 (fotografías tomadas a 20 x, escala a 50 μ m); E) Tinción nuclear con Hoechst (a 20 x, escala 50 μ m); F) Doble marcaje con H3K4me3 y Hoechst (fotografías tomadas a 20 x, escala a 50 μ m); G) marcaje para H3K4me3 (fotografías tomadas a 40 x, escala a 20 μ m); H) Tinción nuclear con Hoechst (a 40 x, escala 20 μ m); I) Doble marcaje con H3K4me3 y Hoechst (fotografías tomadas a 40 x, escala a 20 μ m). Las flechas señalan células que muestran distribución nuclear de la marca epigenética H3K4me3, colocalizando con tinción nuclear de Hoechst (D-I).

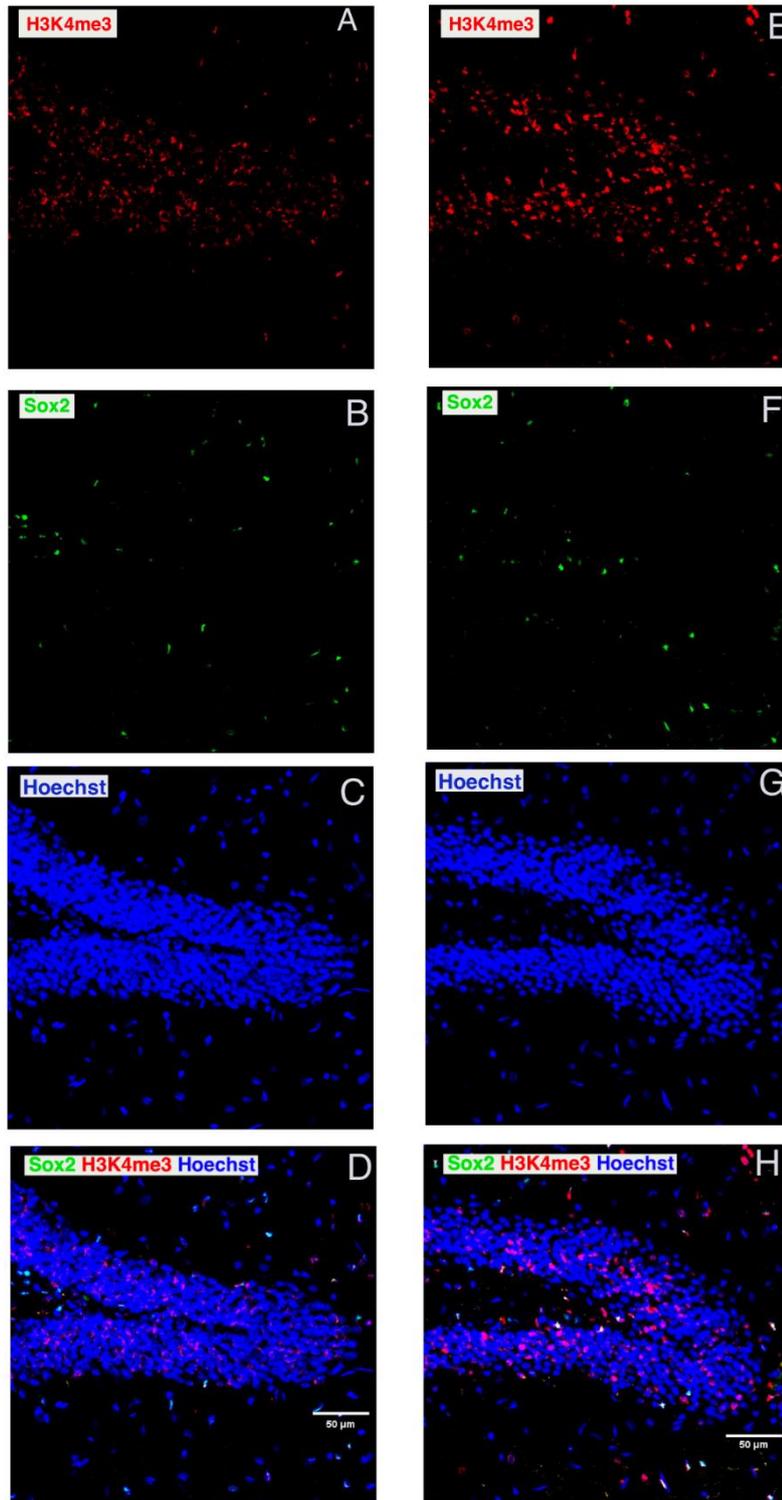


Figura 15. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en GD de topillo adulto hembra. Panel izquierdo hembras control, panel derecho hembras vínculo (fotografías tomadas a 20x, escala a 100 μ m). A) y E) Marcaje para H4K3me3; B) y F) Marcaje para Sox2; C) y G) Tinción nuclear de Hoechst; D) y H) Doble marcaje con H3K4me3 y Sox2 colocalizando con tinción nuclear Hoechst.

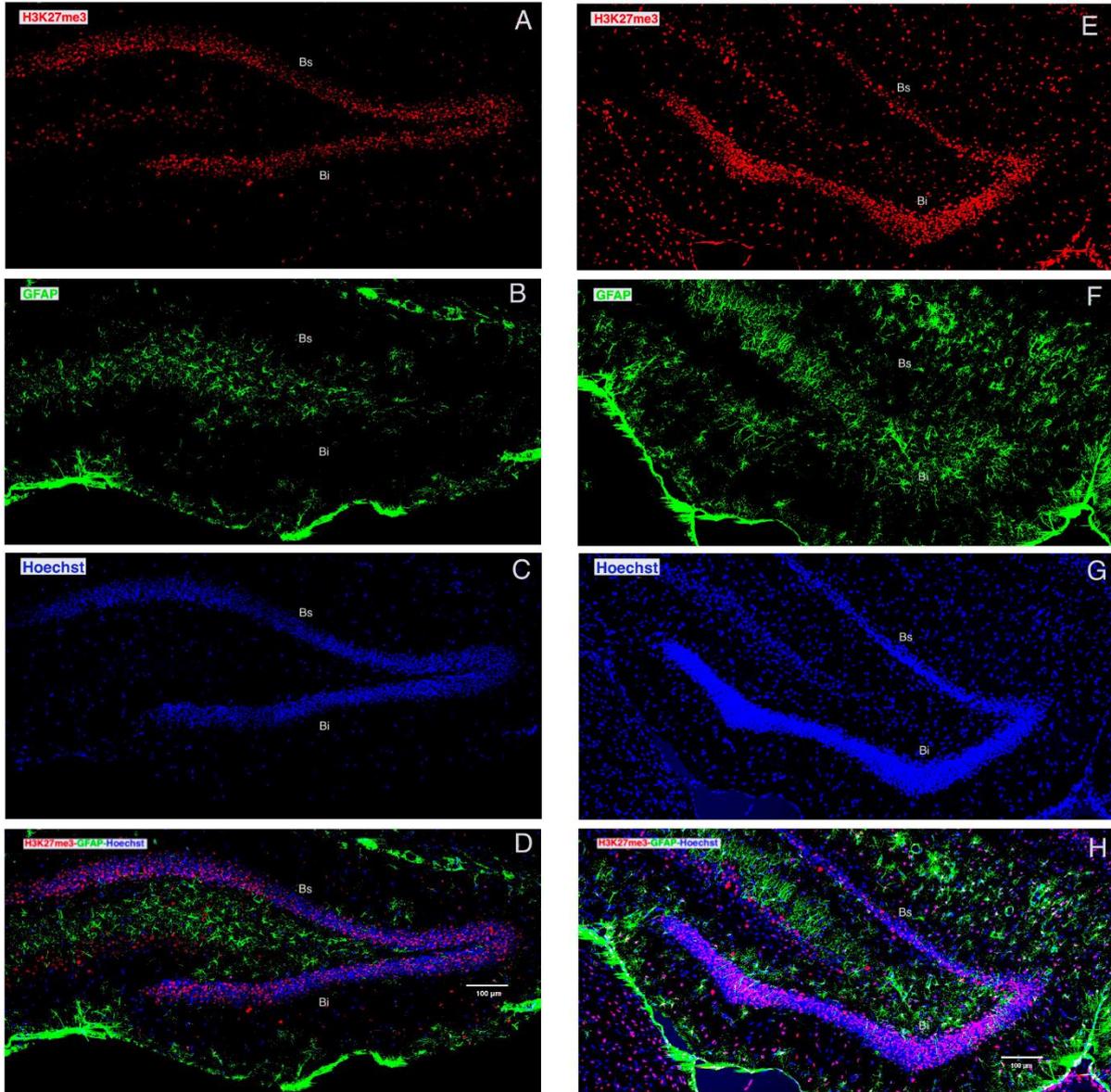


Figura 16. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en GD de topillo adulto hembra. Panel izquierdo hembras control, panel derecho hembras vínculo (fotografías tomadas a 20x, escala a 100 μ m). A) E) Marcaje para H4K27me3; B) y F) Marcaje para GFAP; C) y G) Tinción nuclear de Hoechst; D) y H) Doble marcaje con H3K27me3 y GFAP colocalizando con tinción nuclear Hoechst. Bs: brazo suprapiramidal; Bi: brazo infrapiramidal.

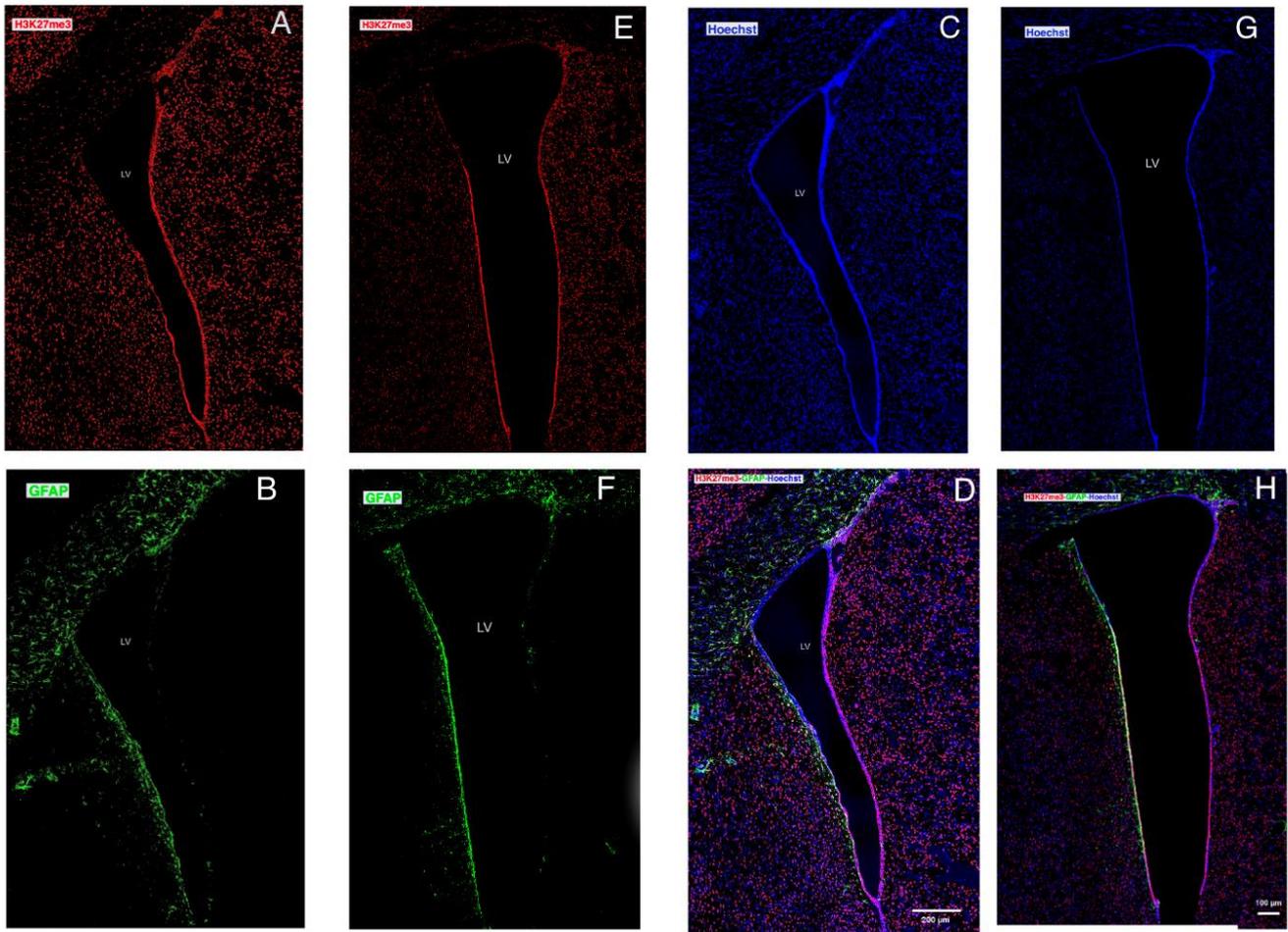


Figura 17. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en ZSV de topillo adulto hembra control (A-D) y hembra vínculo (E-H) (fotografías tomadas a 20x, escala a 200 μ m). A) y E) Marcaje para H4K27me3; B) y F) Marcaje para GFAP; C) y G) Tinción nuclear de Hoechst; G) y H) Doble marcaje con H3K27me3 y GFAP colocalizando con tinción nuclear de Hoechst. LV: ventrículo lateral.

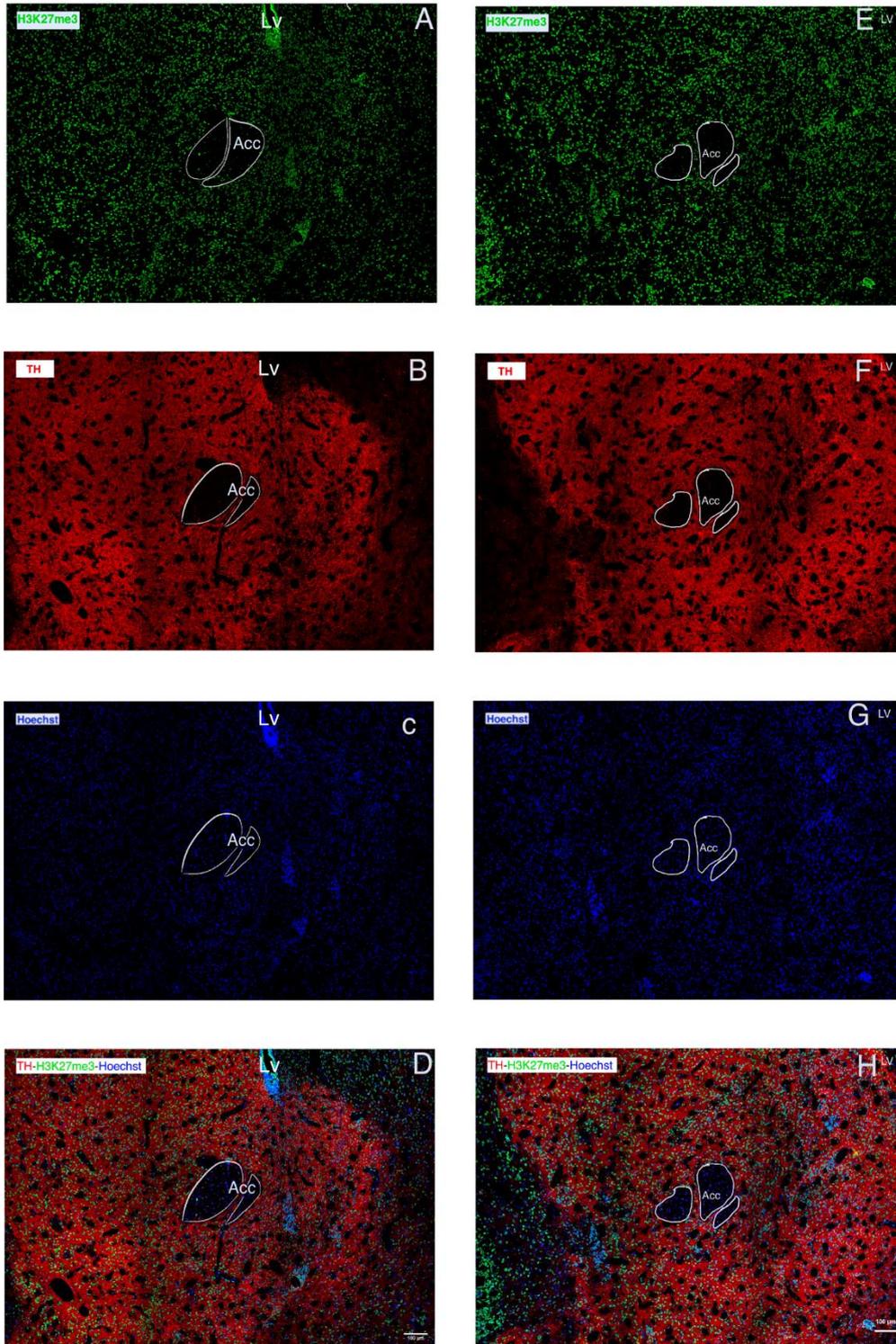


Figura 18. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en NAcc de topillo adulto hembra control (A-D) y vínculo (E-H) (fotografías tomadas a 20x, escala a 100 μ m). A) E) Marcaje para H4K27me3; B) y F) Marcaje para aferencias de TH+; C) y G) Tinción nuclear de Hoechst; D) y H) Doble marcaje con H3K27me3 y GFAP colocalizando con tinción nuclear de Hoechst.

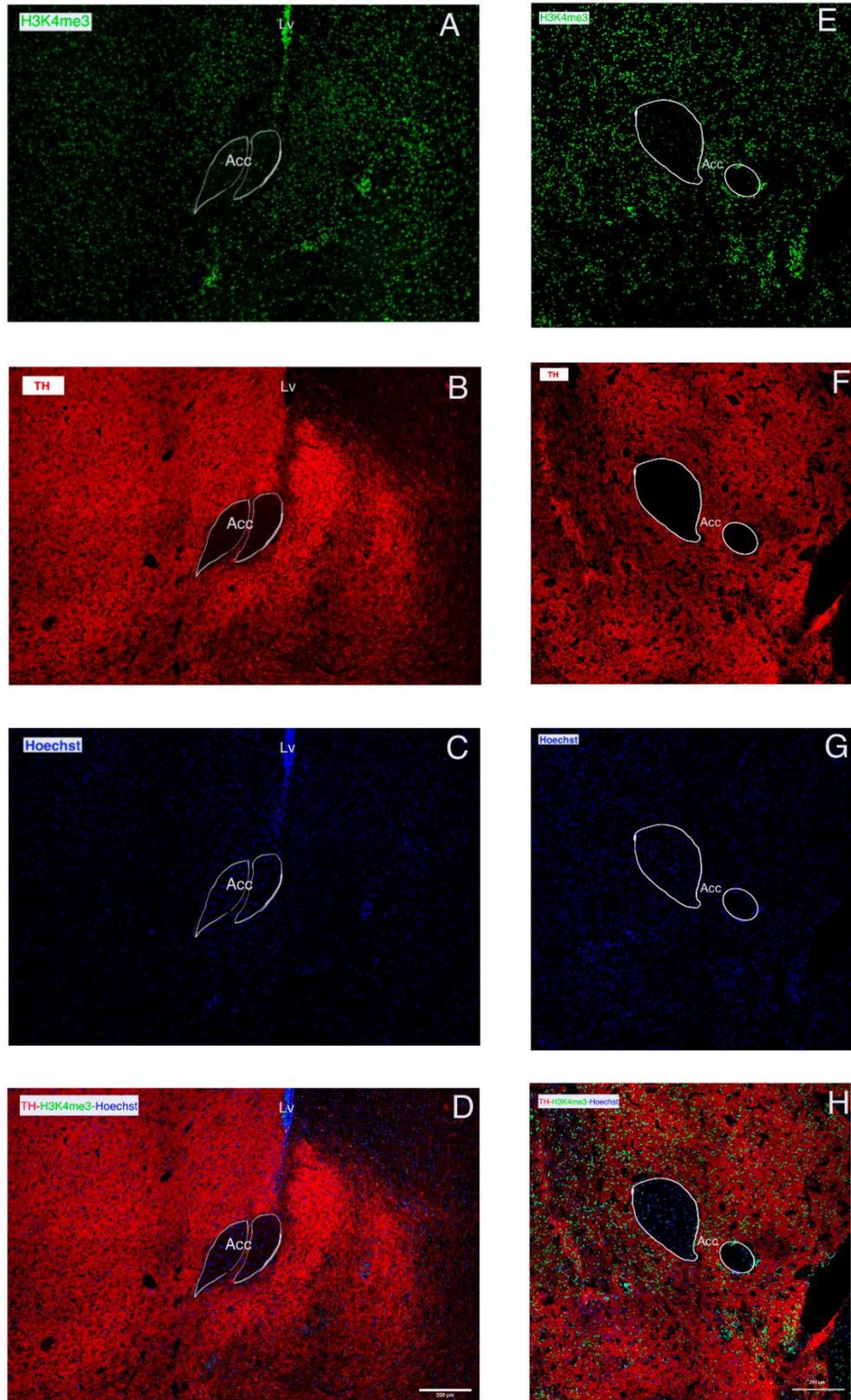


Figura 19. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en NAcc de topillo adulto hembra control (A-D) y vínculo (E-H) (fotografías tomadas a 20x, escala a 200μm). A) y E) Marcaje para TH; B) y F) Marcaje para H4K4me3; C) y G) Tinción nuclear de Hoechst; D) y H) Doble marcaje con H3K4me3 y GFAP colocalizando con tinción nuclear de Hoechst.

En la región del NAcc se observó la presencia de las marcas epigenéticas de manera nuclear siendo rodeadas por una distribución general por la marca para tirosina hidroxilasa (figura 18 y 19).

Para su análisis por regiones, se delimitó de manera visual la región externa y central del NAcc (figura 20) tomando como referencias el atlas de ratas Paxinos ([Paxinos & Watson, 2006](#)).

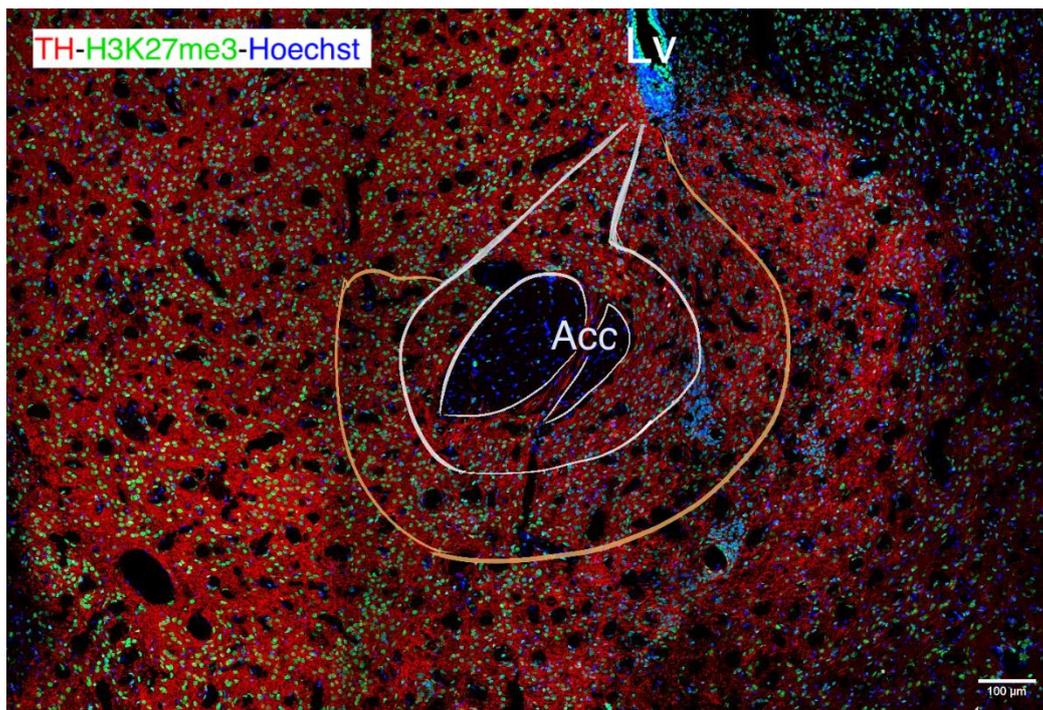


Figura 20. Fotomicrografía representativa del núcleo accumbens topillo adulto hembra control procesadas por doble inmunohistoquímica para TH (rojo)-H3K27me3 (verde) y colocalizando con tinción nuclear de Hoechst (azul). Fotografías tomadas a 20x, escala a 100μm. En amarillo región externa del NAcc, en blanco región central del NAcc. Acc: comisura anterior, Lv (ventrículo lateral)

Determinación de la identidad neural en regiones con cambios en las marcas H3K4 y H3K27

Se realizó un análisis de la población celular presente en cada nicho neurogénico. En la ZSV mediante conteo semiautomatizado de aquellas células que, en el mismo plano en z, estuvieran expresando el marcador de precursores neurales Sox2 y la marca epigenética H3K4me3 (figura 13). En el DG se determinó la presencia de

ambas marcas mediante porcentaje de colocación de señal. Debido a la alta densidad celular en la región no fue posible realizar el conteo de núcleos (figura 15 y 16). El conteo se realizó analizando las fotomicrografías de cada corte en el área delimitada por medio del software FIJI y los macros diseñados.

Para el análisis de la marca H3K27me3 expresada en progenitores neurales (GFAP +) se diseñaron protocolos para determinar la densidad integrada en FIJI y ambas señales se midieron de manera independiente comparando en RFU/ μm^2 la señal por área de interés (ZSV, GD). En todos los casos se restó la ID de un área donde no se espera marcaje para eliminar la señal de fondo causada por la autofluorescencia.

Para la región central y exterior del NAcc (figura 20), se diseñó el protocolo para determinar la densidad integrada de TH y las marcas epigenéticas H3K4me3 y H3K27me3 siendo éstas analizadas de manera independiente (Apéndice 3) (figura 18 y 19).

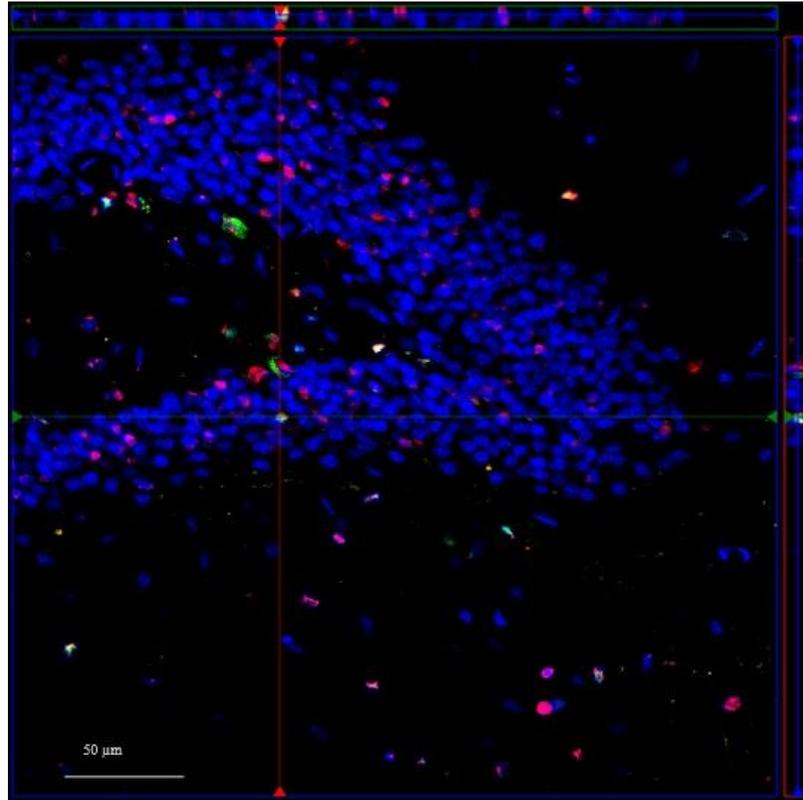


Figura 21. Fotomicrografía representativa de inmunohistoquímica en el GD de un topillo adulto hembra del grupo control mostrando corte ortogonal de células doble positivas a contabilizar (sox2 verde, H3K4me3 rojo, Hoechst azul) (fotografías tomadas a 20x, escala a 50 μ m).

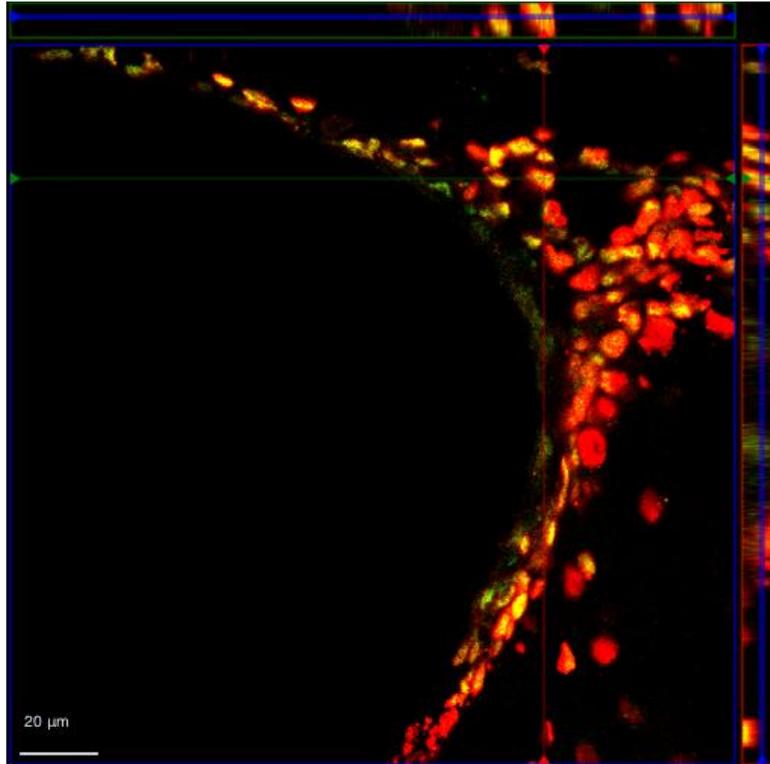


Figura 22. Fotomicrografía representativa de ZSV de topillo adulto hembra control mostrando corte ortogonal de núcleos doble positivos (Sox2 en verde, H3K4me3 en rojo) en la región de interés (fotografías tomadas a 60x, escala a 20μm).

Zona Subventricular

Los datos de la expresión global de H3K4me3 en precursores neurales en la ZSV evaluados mediante porcentaje celular relativo (número de células Sox2+/ H3K4me3+ en relación número total de células Hoechst+ presentes en la ZSV) y fueron analizados mediante una prueba t de student no pareada (figura 23).

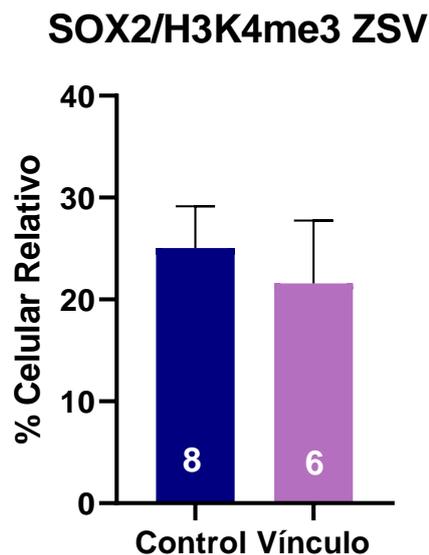


Figura 23. Análisis de precursores neurales expresando H3K4me3 en la ZSV. Porcentaje de células Sox2/H3K4me3-positivas relativo al número total de células presente en hembras control y en vínculo de pareja. El número de topillos por grupo se indica en las columnas. Los datos son presentados como la media ± error estándar ($p > 0.05$).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de núcleos en la ZSV positivos a Sox2/H3K4me3 entre los topillos control y los topillos en vínculo de pareja.

Por su parte, los datos de la expresión global de H3K27me3 y precursores neurales (GFAP-positivos) ambas medidas en RFU/ μm^2 en la ZSV fueron analizados mediante una prueba t de student no pareada (figura 24). La densidad integrada de GFAP en la ZSV no presentó diferencias estadísticamente significativas entre el control y el grupo de formación de vínculo de pareja. Por su parte, la densidad integrada de la marca para H3K27me3 mostró un incremento significativo en el grupo de hembras que formaron un vínculo de pareja en comparación con el grupo ($t_{(13)}=2.548$; $p=0.0243$) (figura 24).

Mann-Whitney, no se encontró diferencia significativa entre hembras control y hembras que formaron vínculo de pareja (figura 25).

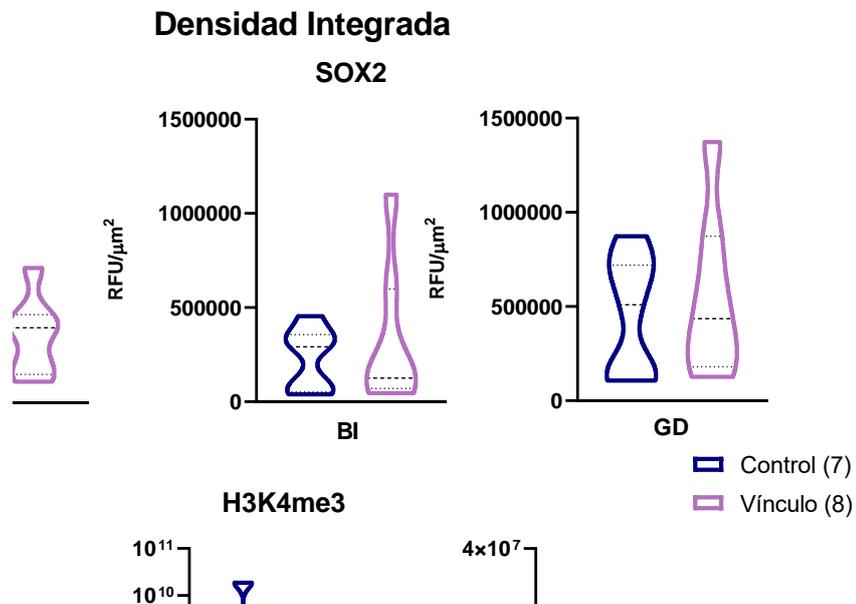


Figura 25. Análisis de precursores neurales Sox2 y expresión de H3K4me3. Densidad integrada en unidades de fluorescencia relativa por micrómetro cuadrado (RFU/μm²) en animales control y animales vínculo (BS:brazo suprapiramidal, BI: brazo infrapiramidal, GD: giro dentado). El número de topillos por grupo se indica en la barra de leyenda. Los datos son presentados como media + rango intercuartílico (p>0.05).

De igual manera se analizó la densidad integrada de la marca H3K4me3 en las diferentes regiones comparando entre control y vínculo de pareja. Para el brazo suprapiramidal, al ser datos con distribución no normal fueron analizados mediante una prueba U de Mann-Whitney sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo de vínculo de pareja (figura 25). En tanto que en el brazo infrapiramidal y en el GD no se presentó una distribución normal y los datos fueron analizados utilizando una prueba U de Mann-Whitney. Por medio de esta

prueba se determinó que no se tienen diferencias significativas en la intensidad de señal presente entre animales control y topillos en vínculo de pareja (figura 25).

Dado que ambos marcadores son de naturaleza nuclear, se analizó el porcentaje de colocalización de la densidad de señal de la marca para Sox2 y para H3K4me3 (figura 26). Los datos fueron normalmente distribuidos, no mostraron una diferencia significativa usando la prueba t de student no pareada en el porcentaje de fluorescencia de células Sox2/H3K4me3-positivas en la totalidad del GD entre topillos control y los topillos que formaron un vínculo de pareja.

Colocalización de señal en el GD H3K4me3/Sox2

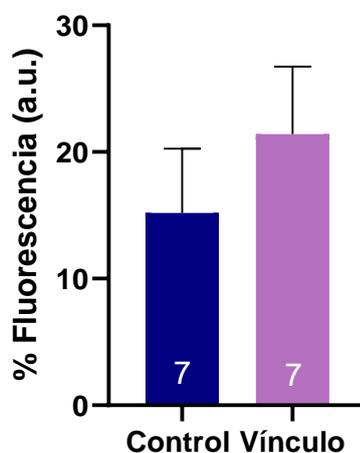


Figura 26. Análisis de colocalización de precursores neurales expresando H3K4me3. Porcentaje de señal de fluorescencia en unidades arbitrarias (a.u.) en animales control y animales vínculo. El número de topillos por grupo se indica en la barra de leyenda. Los datos son presentados como media \pm error estándar ($p > 0.05$).

Los análisis de la densidad integrada de la marca GFAP mostraron en todos los casos una distribución no normal, por lo que cada región fue analizada mediante una prueba U de Mann-Whitney. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las regiones (figura 27).

En el caso de la densidad integrada para H3K27me3, todos los datos por región no tuvieron distribución normal de manera que fueron analizados por medio una prueba U de Mann-Whitney donde no se encontró una diferencia significativa en la expresión entre animales control y vínculo de pareja (figura 27).

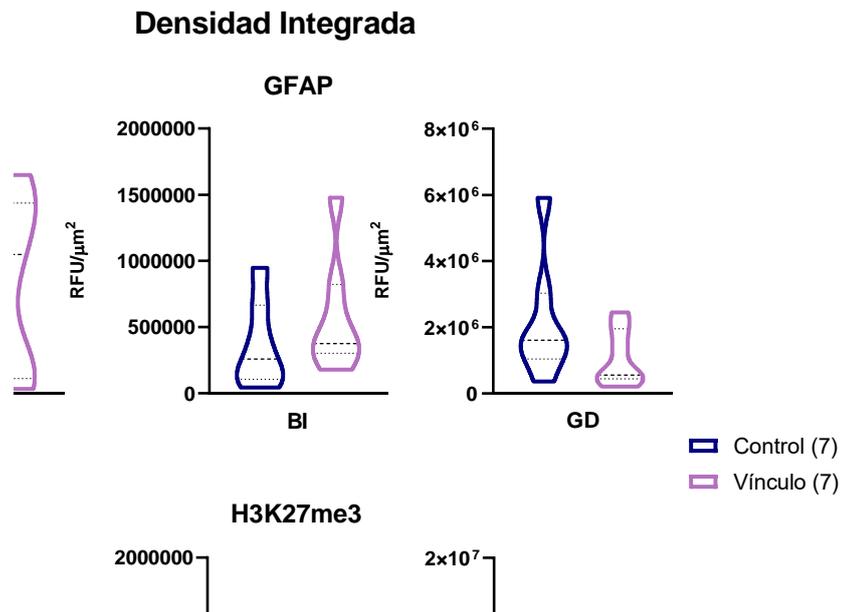


Figura 27. Análisis de precursores neurales que expresan H3K27me3. Densidad integrada en unidades de fluorescencia relativa por micrómetro cuadrado ($RFU/\mu m^2$) en animales control y animales vínculo (BS: brazo suprapiramidal, BI: brazo infrapiramidal, GD: giro dentado). El número de topillos por grupo se indica en la barra de leyenda. Los datos son presentados como mediana + rango intercuartílico ($p > 0.05$).

Núcleo Accumbens

Dentro de los análisis llevados a cabo por la alumna a mi cargo Carmen Cortéz del Tecnológico de Corregidora en sus prácticas profesionales, se identificó y delimitó al NAcc en sus subregiones central y exterior. Se desarrolló el protocolo para la detección de las marcas epigenéticas y anticuerpos para tirosina hidroxilasa (TH) con el fin de identificar los posibles cambios en las marcas epigenéticas asociados con la presencia de aferencias catecolaminérgicas (TH+) derivados de la formación del vínculo de pareja en las regiones central y exterior del NAcc. Al analizar la densidad integrada de H3K4me3 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la región central de animales control y vínculo de pareja y, por su parte, la región externa de animales control y en vínculo de pareja por medio de las pruebas U de Mann-Whitney. El análisis de la densidad integrada de la marca para TH en las regiones central y externa por medio de una prueba U de Mann-Whitney, no expuso diferencias estadísticamente significativas en la región central entre animales control y animales que formaron vínculo de pareja ni en la región externa entre animales control y animales en vínculo de pareja (figura 28).

Por su parte, la densidad integrada de la marca de represión H3K27me3 fue analizada mediante la prueba U de Mann-Whitney para región central y mediante la prueba t de student no pareada en el caso de la región externa. No se observó diferencia significativa de la densidad integrada en la región central entre animales control y en vínculo de pareja ni en la región externa entre animales control y animales que formaron un vínculo de pareja. De igual manera, el análisis por medio de U de Mann-Whitney de la densidad integrada de TH no mostró una diferencia significativa en la región central entre animales control y en vínculo de pareja ni en la región externa entre animales control y vínculo (figura 29).

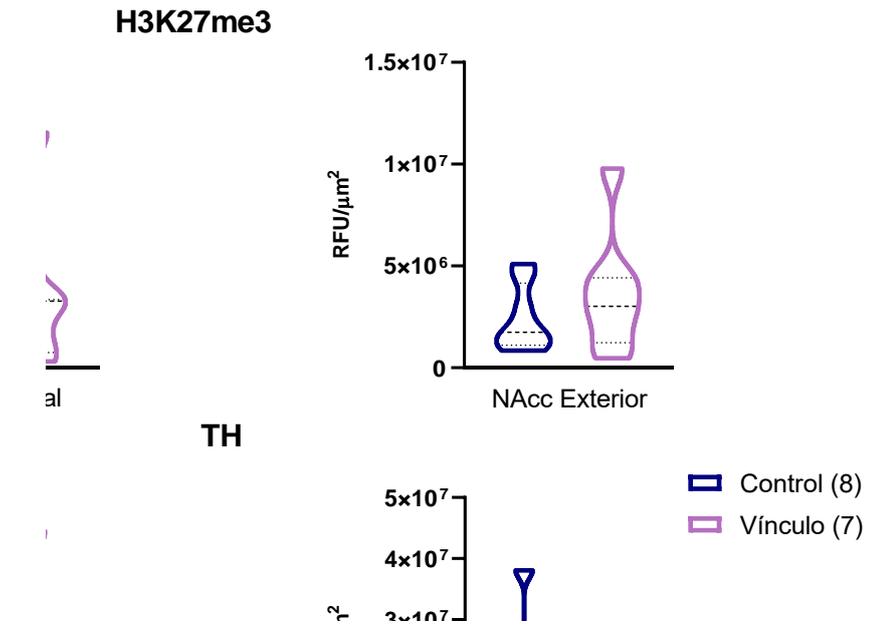


Figura 28. Análisis de población neuronal expresando H3K4me3 y expresión de tirosina hidroxilasa (TH). Densidad integrada en unidades de fluorescencia relativa por micrómetro cuadrado (RFU/ μm^2) en animales control y animales en vínculo de pareja. El número de topillos por grupo se indica en la barra de leyenda. Los datos son presentados como mediana + rango intercuartílico estándar ($p>0.05$).

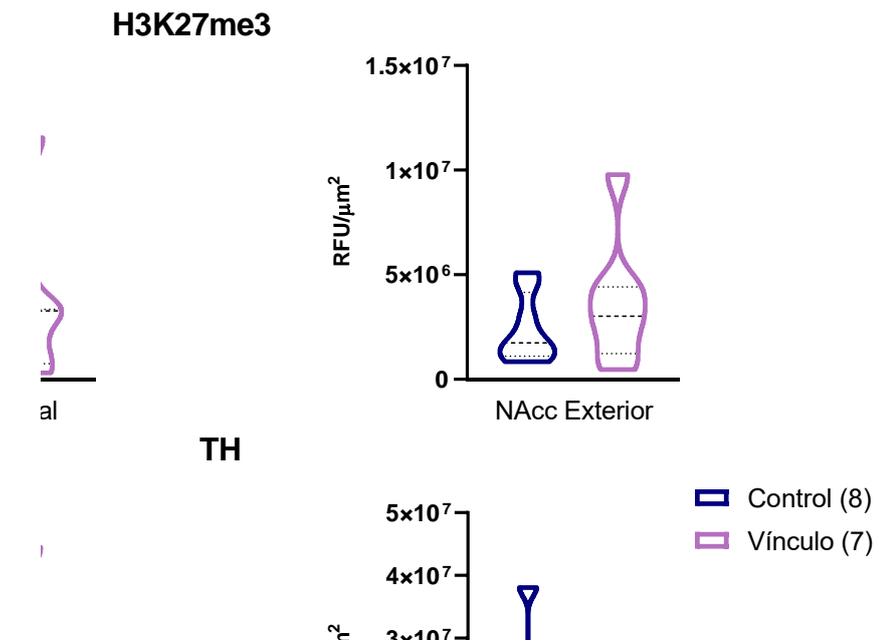


Figura 29. Análisis de población neuronal expresando H3K27me3 y expresión de tirosina hidroxilasa (TH). Densidad integrada en unidades de fluorescencia relativa por micrómetro cuadrado (RFU/ μm^2) en animales control y animales en vínculo de pareja. El número de topillos por grupo se indica en la barra de leyenda. Los datos son presentados como mediana + rango intercuartílico estándar ($p > 0.05$).

Discusión

Dentro de las conductas sociales complejas necesarias para la supervivencia de la especie se encuentra la formación de un vínculo de pareja. Este lazo social además tiene efecto positivo sobre la salud física y psicológica de los miembros de la pareja y su descendencia. Por su estrategia de reproducción monógama social el topillo de la pradera (*Microtus ochrogaster*) ha sido utilizado para el entendimiento de las bases neurobiológicas de los vínculos de pareja.

Las hembras del grupo de formación de vínculo de pareja cohabitaron libremente con machos sexualmente expertos por 24 horas, este lapso fue suficiente para formar un

vínculo de pareja confirmado por el incremento en el tiempo que pasó la hembra con su pareja sexual en contraste con el macho extraño. Nuestros datos concuerdan con lo anteriormente observado por otros grupos de investigación. Donde, se ha descrito que cuando topillos de la pradera sin relación familiar cohabitan sin cópula por 24 horas o cohabitan con cópula por 6 horas el vínculo de pareja es formado ([Williams et al., 1992a](#); [Williams et al., 1992b](#); [Gobrogge 2014](#)).

La cohabitación con el macho conlleva a cambios fisiológicos en el topillo hembra, uno de estos es la inducción del estro, durante el cual se desencadenan procesos hormonales que son característicos del estado de receptividad sexual, estos procesos se reflejan en el aumento de la vascularización y de tejido del endometrio con el consecuente aumento del peso uterino, lo cual se considera una respuesta dependiente de estrógeno ([Carter et al., 1989](#); [Williams et al., 1992](#)). De esta forma, la diferencia del peso uterino observado en este trabajo entre las hembras que forman vínculo de pareja y las hembras control concuerda con la respuesta fisiológica de las hembras inducidas en receptividad sexual por contacto con el macho.

Este despliegue conductual afiliativo en el topillo de la pradera se propone involucran diferentes regiones cerebrales y resulta de procesos de plasticidad neuronal que une la información socio sensorial de la pareja con un estado afectivo positivo ([Walum & Young 2018](#)).

Se ha reportado que la interacción social estimula la liberación de dopamina en el área ventral tegmental al NAcc. Esta señalización mediada por dopamina está implicada en la formación, expresión y mantenimiento del vínculo de pareja ([Gobrogge & Wang 2015](#); [Walum & Young 2018](#)). Se ha propuesto que la dopamina al interactuar con los sistemas de oxitocina y vasopresina facilita que la preferencia de pareja se establezca. Nuestros resultados demostraron que no hay cambios

estadísticamente significativos en la TH ni en las marcas epigenéticas estudiadas (H3K4me3 y H3K27me3) en las regiones central y externa del NAcc. Esto se puede deber a una relación temporal en la señalización dopaminérgica y la expresión o represión de determinados genes para la consolidación de la relación socio sensorial de la pareja con el sistema de recompensa y un estado afectivo positivo. En las primeras etapas de este proceso de consolidación del vínculo de pareja, el incremento de la señalización por dopamina en el NAcc es crucial junto a la interacción con otros sistemas y posteriormente se llega a una estabilización de la señal al haberse consolidado el vínculo de pareja y desplegado la respuesta motora esperada (tiempo de contacto lado a lado) ([Walum and Young 2018](#)), demostrando así la necesidad de una reorganización de la neuroplasticidad regio-temporal del sistema dopaminérgico en el NAcc para la consolidación del lazos afectivos en el vínculo de pareja entre topillos de la pradera ([Aragona et al., 2006; Wang et al., 1999](#)). Dado que nuestros animales experimentales fueron hembras vírgenes sin exposición previa a un macho, es posible que el tiempo de cohabitación de 48 horas no fuera suficiente para que los animales copularan de manera cotidiana. Por ende, primeramente, se estaría induciendo la formación de preferencia social observada en la prueba de preferencia de pareja. En la preferencia social se ha observado que la liberación de dopamina es suficiente pero no necesaria para la formación de preferencia por un congénere en cohabitación ([Lee & Beery, 2021](#)).

La formación de vínculo de pareja en nuestros animales se encontraría en una etapa temprana; en la cual comienza a consolidarse la asociación de la pareja con el sistema de recompensa. Para que el vínculo de pareja se consolide por completo, requiere la transición de comportamiento que culmina con el desarrollo de la agresión selectiva. Se ha reportado que el tiempo necesario para que dicha transición se lleve a cabo y

se establezca un vínculo estable en el topillo de la pradera es de dos semanas ([Liu & Wang, 2003](#); [Aragona et al., 2006](#); [Lee & Beery, 2021](#)).

Presencia de marcas epigenéticas H3K4me3 y H3K27me3 en precursores neuronales de los nichos neurogénicos

Uno de los mecanismos moleculares que modulan la proliferación y diferenciación en los nichos neurogénicos derivados de las conductas socio-sexuales puede implicar modificaciones epigenéticas como las modificaciones post-traduccionales de histonas ([Khorasanizadeh 2004](#); [Sheehy et al., 2022](#)). En nuestro trabajo, no se observó una diferencia en el porcentaje celular relativo en precursores Sox2+ que expresaran H3K4me3 entre las hembras de los grupos control y vínculo de pareja, de igual forma no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de colocación de H3K4me3 en células neurales troncales GFAP+ en el GD. Es posible que exista una distribución cambiante de la marca en diferentes genes y sus regiones, lo que corresponde con lo observado por el Dr. Wang y colaboradores donde no se reportaron cambios en la acetilación global de H3. En su trabajo, el Dr. Wang demostró que tanto en hembras cohabitando con cópula *ad libitum* con el macho como aquellas administradas con un inhibidor de las desacetilasas de histonas incrementan la acetilación en el NAcc de manera específica a H3K14 y la región promotora del gen para el receptor a oxitocina y el aumento en la expresión de su RNAm y la proteína. Este aumento es característico de la formación de vínculo de pareja en el topillo hembra bajo condiciones de cohabitación con cópula *ad libitum* ([Wang et al., 2013](#)). El análisis individual de las marcas epigenéticas y las marcas para precursores neuronales no presentaron un cambio estadísticamente significativo. Nuevamente, esto puede deberse a una regulación específica de las marcas a regiones determinadas

en algunos genes. Dado que la neurogénesis adulta es una continuación del proceso de desarrollo, ejemplos de esta regulación los podemos encontrar durante neurodesarrollo ([Sheehy et al., 2022](#)). Durante la diferenciación de las células embrionarias a progenitores neurales troncales, múltiples regiones promotoras de genes determinantes del linaje neural pierden la modificación H3K27me3, pero retienen la marca H3K4me3 originando el incremento en la expresión de dichos genes ([Mikkelsen et al., 2007](#)). Por su parte, algunos genes que participan activamente en el estado neuronal maduro muestran un enriquecimiento de H3K27me3 y H3K4me2 en el periodo de transición de célula embrionaria a célula neural troncal ([Mohn et al., 2008](#)).

Además del papel de las regulaciones epigenéticas en el desarrollo, varios autores han abordado su participación en la regulación de diversas conductas incluidas las de índole social. Reshetnikov y colaboradores encontraron una asociación entre estresores en etapas tempranas de la vida con el desarrollo de estrés crónico y el incremento de H3K4me3 en la región promotora de genes en la corteza prefrontal ([Reshetnikov et al., 2021](#)). Por su parte, en el mono Rhesus, Baker y colaboradores estudiaron las influencias de la crianza en la regulación epigenética de receptores a oxitocina. En su trabajo encontraron una disminución de H3K4me3 en genes cruciales para la respuesta al estrés entre ellos el receptor a oxitocina y su RNAm; estos cambios podrían contribuir a las diferencias de comportamiento en sujetos con inductores tempranos de estrés y su implicación en enfermedades psiquiátricas ([Baker et al., 2017](#)).

De igual forma, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de las marcas H3K4me3 y H3K27me3 en el GD que pueda asociarse a una expresión

temporal diferencial en el momento de la formación del vínculo de pareja similar a lo demostrado durante el desarrollo. En precursores neurales troncales, la expresión de Sox2 permite mantener a las células en un estado de proliferación lento sin definir el linaje neural, una vez que entran al estado de diferenciación, los niveles de Sox2 disminuyen y asociado a ello se observa cierta dinámica de las marcas de metilación donde hay un enriquecimiento de H3K27me3 en etapas tempranas del desarrollo de células neurales troncales. Por su parte, H3K36me3, se encuentra enriquecida durante metafase mientras que, H3K4me3, se encuentra en mayores niveles durante las últimas etapas del desarrollo de las células neurales troncales ([Hagey and Muhr 2014; Zhang et al., 2020](#)).

Se observó un incremento en la señal de la marca de represión H3k27me3 en hembras que formaron vínculo de pareja. Este aumento en la señal indica que hay un aumento en la metilación. Esto podría relacionarse con dos procesos: (1) Represión de genes que inhiben procesos de proliferación neuronal. Lo que produciría un aumento de precursores neuronales. (2) Represión de genes que inhiben la diferenciación celular. En el contexto del vínculo de pareja es más probable que primero suceda el aumento de precursores neuronales y después la diferenciación de estos. Por lo tanto, es posible que lo observado sea el aumento de la marca que genera que los precursores neuronales se diferencien ([Zhang et al., 2020](#)).

Recientemente nuestro equipo de trabajo demostró que en el topillo de la pradera macho la cohabitación con hembras por 6 horas incrementa la proliferación celular en la zona dorsal de la ZSV al igual que la cópula con hembras sexualmente activas incrementa la proliferación en el GD ([Castro et al., 2020](#)). Por su parte, Wang y colaboradores encontraron en la región dorsal de la ZSV de hembras que cohabitaron

con cópula presentan un incremento en la proliferación celular en comparación con hembras que tuvieron contacto con otras hembras ([Fowler et al., 2002](#)). Dado que la señal de la marca H3K27me3 se cuantificó de manera general y no asociada a algún determinado tipo celular sólo es posible teorizar cambios en las marcas epigenéticas en la población celular de los nichos neurogénicos.

Para determinar si los cambios en la marca H3K27me3 pueden asociarse a precursores neurales, es necesario incluir un marcador celular de expresión nuclear (como Sox2, Nestina, Pax6, etc) que permita delimitar la presencia de las marcas epigenéticas asociadas con su expresión nuclear y vincularla a un linaje concreto. De esta forma será posible delimitar la población de estudio y posibles genes asociados para el análisis del estado de metilación de histonas.

Para abordar el estudio desde un panorama enfocado al enriquecimiento de marcas epigenéticas en diferentes regiones del gen se requieren técnicas de exploración del epigenoma. Diversos grupos han usado la técnica de inmunoprecipitación de cromatina en combinación con análisis de microarreglos (ChIP-chip) o con secuenciación (ChIP-seq) para demostrar que los nucleosomas localizados en determinados genes ([Hirabayashi 2010](#)), como en el caso de genes esenciales para la regulación del desarrollo presentan marcas epigenéticas como la tri-metilación de la lisina 27 en la histona 3 ([Lee et al., 2006](#); [Boyer et al., 2006](#)). Métodos como “CUT&RUN”, “CUT&tag” permiten realizar la identificación de proteínas específicas, como la unión a modificadores de histonas, a través de todo el genoma sin la necesidad de utilizar demasiadas células ([Skene and Henikoff 2017](#); [Kaya-Okur et al., 2019](#)).

Conclusión

Los resultados presentes no son suficientes para determinar si el vínculo de pareja induce cambios en los patrones de metilación de las histonas. Sin embargo, el incremento de la marca H3KA27me3 en la ZSV como respuesta al vínculo de pareja vislumbra la posibilidad de que estos cambios se producen, aunque de manera sutil. Para corroborarlo es necesario integrar nuevas estrategias metodológicas al utilizar marcadores de especificidad nuclear, así como la implementación de técnicas para la evaluación del mapa epigenético y los cambios en los patrones de metilación de las histonas en genes específicos asociados a cambios celulares involucrados en la formación del vínculo de pareja como lo es la técnica ChIP-seq o ChIP acoplado a PCR.

REFERENCIAS

Aragona, B. J., Liu, Y., Curtis, J. T., Stephan, F. K., & Wang, Z. (2003). A critical role for nucleus accumbens dopamine in partner-preference formation in male prairie voles. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), 3483–3490. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03483.2003>

Aragona, B. J., Liu, Y., Yu, Y. J., Curtis, J. T., Detwiler, J. M., Insel, T. R., & Wang, Z. (2006). Nucleus accumbens dopamine differentially mediates the formation and maintenance of monogamous pair bonds. *Nature Neuroscience*, 9(1), 133–139. <https://doi.org/10.1038/nn1613>

Aragona, B. J., & Wang, Z. (2007). Opposing regulation of pair bond formation by cAMP signaling within the nucleus accumbens shell. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(48), 13352–13356. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3216-07.2007>

Baker, M., Lindell, S. G., Driscoll, C. A., Zhou, Z., Yuan, Q., Schwandt, M. L., Miller-Crews, I., Simpson, E. A., Paukner, A., Ferrari, P. F., Sindhu, R. K., Razaqyar, M., Sommer, W. H., Lopez, J. F., Thompson, R. C., Goldman, D., Heilig, M., Higley, J. D., Suomi, S. J., & Barr, C. S. (2017). Early rearing history influences oxytocin receptor epigenetic regulation in rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(44), 11769–11774. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706206114>

Bedos, M., Portillo, W., & Paredes, R. G. (2018). Neurogenesis and sexual behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *51*, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.02.004>

Bonfanti, L., Peretto, P., Merighi, A., & Fasolo, A. (1997). Newly-generated cells from the rostral migratory stream in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *Neuroscience*, *81*(2), 489–502. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00090-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00090-0)

Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M. K., Bell, G. W., Otte, A. P., Vidal, M., Gifford, D. K., Young, R. A., & Jaenisch, R. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*, *441*(7091), 349–353. <https://doi.org/10.1038/nature04733>

Brus, M., Trouillet, A.-C., Hellier, V., & Bakker, J. (2016). Estradiol-induced neurogenesis in the female accessory olfactory bulb is required for the learning of the male odor. *Journal of Neurochemistry*, *138*(3), 457–468. <https://doi.org/10.1111/jnc.13677>

Carter, C. S., Witt, D. M., Manock, S. R., Adams, K. A., Bahr, J. M., & Carlstead, K. (1989). Hormonal correlates of sexual behavior and ovulation in male-induced and postpartum estrus in female prairie voles. *Physiology & Behavior*, *46*(6), 941–948. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90195-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90195-9)

Castro, A. E., Young, L. J., Camacho, F. J., Paredes, R. G., Diaz, N. F., & Portillo, W. (2020). Effects of Mating and Social Exposure on Cell Proliferation in the Adult Male Prairie Vole (*Microtus ochrogaster*). *Neural Plasticity*, *2020*, 8869669. <https://doi.org/10.1155/2020/8869669>

Castro, A., Domínguez-Ordoñez, R., Young, L., Camacho, F., Ávila-González, D., & Paredes, R. et al., (2022). Pair-bonding and social experience modulate new neurons survival in adult male and female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Frontiers In Neuroanatomy*, 16. doi: 10.3389/fnana.2022.987229

Collins, B. E., Greer, C. B., Coleman, B. C., & Sweatt, J. D. (2019). Histone H3 lysine K4 methylation and its role in learning and memory. *Epigenetics & Chromatin*, 12(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0251-8>

Curtis, J. T., Liu, Y., & Wang, Z. (2001). Lesions of the vomeronasal organ disrupt mating-induced pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Brain Research*, 901(1-2), 167–174. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02343-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02343-5)

De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., Samocha, K., Cicek, A. E., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Shih-Chen, F., Aleksic, B., Biscaldi, M., Bolton, P. F., Brownfeld, J. M., Cai, J., ... Buxbaum, J. D. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, 515(7526), 209–215. <https://doi.org/10.1038/nature13772>

Duclot, F., Wang, H., Youssef, C., Liu, Y., Wang, Z., & Kabbaj, M. (2016). Trichostatin A (TSA) facilitates formation of partner preference in male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Hormones and Behavior*, 81, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.04.001>

Ezponda, T., & Licht, J. D. (2014). Molecular Pathways: Deregulation of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Cancer—Different Paths, Same Destination. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 20(19), 5001–5008. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2499>

Fowler, C. D., Liu, Y., Ouimet, C., & Wang, Z. (2002). The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *Journal of Neurobiology*, *51*(2), 115–128. <https://doi.org/10.1002/neu.10042>

Getz, L. L., Dluzen, D., & McDermott, J. L. (1983). Suppression of reproductive maturation in male-stimulated virgin female microtus by a female urinary chemosignal. *Behavioural Processes*, *8*(1), 59–64. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(83\)90043-8](https://doi.org/10.1016/0376-6357(83)90043-8)

Getz, L. L., McGuire, B., Pizzuto, T., Hofmann, J. E., & Frase, B. (1993). Social Organization of the Prairie Vole (*Microtus ochrogaster*). *Journal of Mammalogy*, *74*(1), 44–58. <https://doi.org/10.2307/1381904>

Gingrich, B., Liu, Y., Cascio, C., Wang, Z., & Insel, T. R. (2000). Dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens are important for social attachment in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behavioral Neuroscience*, *114*(1), 173–183. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.114.1.173>

Gobrogge, K. L. (2014). Sex, drugs, and violence: neuromodulation of attachment and conflict in voles. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *17*, 229–264. https://doi.org/10.1007/7854_2013_264

Gobrogge, K., & Wang, Z. (2015). Neuropeptidergic regulation of pair-bonding and stress buffering: Lessons from voles. *Hormones and Behavior*, *76*, 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.08.010>

Hagey, D. W., & Muhr, J. (2014). Sox2 Acts in a Dose-Dependent Fashion to Regulate Proliferation of Cortical Progenitors. In *Cell Reports* (Vol. 9, Issue 5, pp. 1908–1920). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.013>

Hammock, E. A. D., & Young, L. J. (2007). Neuropeptide Systems and Social Behavior: Noncoding Repeats as a Genetic Mechanism for Rapid Evolution of Social Behavior. In *Evolution of Nervous Systems* (pp. 361–371). <https://doi.org/10.1016/b0-12-370878-8/00091-4>

Henikoff, S. (2004). Faculty Opinions recommendation of Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. In *Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature*. <https://doi.org/10.3410/f.1020909.240546>

Hirabayashi, Y., & Gotoh, Y. (2010). Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(6), 377–388. <https://doi.org/10.1038/nrn2810>

Horton, L. W., & Shepherd, B. A. (1979). Effects of olfactory bulb ablation on estrus-induction and frequency of pregnancy. *Physiology & Behavior*, 22(5), 847–850. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(79\)90326-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(79)90326-3)

House, J. S., Landis, K. R., & Umberson, D. (1988). Social relationships and health. *Science*, 241(4865), 540–545. <https://doi.org/10.1126/science.3399889>

Jones, W. D., Dafou, D., McEntagart, M., Woollard, W. J., Elmslie, F. V., Holder-Espinasse, M., Irving, M., Saggar, A. K., Smithson, S., Trembath, R. C., Deshpande, C., & Simpson, M. A. (2012). De novo mutations in MLL cause Wiedemann-Steiner syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 91(2), 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.06.008>

Kaya-Okur, H. S., Wu, S. J., Codomo, C. A., Pledger, E. S., Bryson, T. D., Henikoff, J. G., Ahmad, K., & Henikoff, S. (2019). CUT&Tag for efficient epigenomic profiling of small samples and single cells. *Nature Communications*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09982-5>

Kelly, A. M., Ong, J. Y., Witmer, R. A., & Ophir, A. G. (2020). Paternal deprivation impairs social behavior putatively via epigenetic modification to lateral septum vasopressin receptor. *Science Advances*, *6*(36). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb9116>

Kesner, R. P. (2018). An analysis of dentate gyrus function (an update). *Behavioural Brain Research*, *354*, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.033>

Khorasanizadeh, S. (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*, *116*(2), 259–272. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00044-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00044-3)

Kiecolt-Glaser, J. K., & Newton, T. L. (2001). Marriage and health: his and hers. *Psychological Bulletin*, *127*(4), 472–503. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.127.4.472>

Kim, Y., Wang, W.-Z., Comte, I., Pastrana, E., Tran, P. B., Brown, J., Miller, R. J., Doetsch, F., Molnár, Z., & Szele, F. G. (2010). Dopamine stimulation of postnatal murine subventricular zone neurogenesis via the D3 receptor. *Journal of Neurochemistry*, *114*(3), 750–760. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06799.x>

Kirkpatrick, B., Williams, J. R., Slotnick, B. M., & Carter, C. S. (1994). Olfactory bulbectomy decreases social behavior in male prairie voles (*M. ochrogaster*). *Physiology & Behavior*, *55*(5), 885–889. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90075-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90075-2)

Kosten, T. R., Jalali, B., Steidl, J. H., & Kleber, H. D. (1987). Relationship of marital structure and interactions to opiate abuse relapse. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 13(4), 387–399. <https://doi.org/10.3109/00952998709001523>

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

Lao, C. L., Lu, C.-S., & Chen, J.-C. (2013). Dopamine D3 receptor activation promotes neural stem/progenitor cell proliferation through AKT and ERK1/2 pathways and expands type-B and -C cells in adult subventricular zone. *Glia*, 61(4), 475–489. <https://doi.org/10.1002/glia.22449>

Lee, N., & Beery, A. (2021). The role of dopamine signaling in prairie vole peer relationships. *Hormones And Behavior*, 127, 104876. doi: 10.1016/j.yhbeh.2020.104876

Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., Johnstone, S. E., Cole, M. F., Isono, K.-I., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K., Murray, H. L., Zucker, J. P., Yuan, B., Bell, G. W., Herbolsheimer, E., Hannett, N. M., ... Young, R. A. (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 301–313. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.043>

Lin, Y.-T., Chen, C.-C., Huang, C.-C., Nishimori, K., & Hsu, K.-S. (2017). Oxytocin stimulates hippocampal neurogenesis via oxytocin receptor expressed in CA3 pyramidal neurons. *Nature Communications*, 8(1), 537. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00675-5>

Liu, Y., Curtis, J. T., & Wang, Z. (2001). Vasopressin in the lateral septum regulates pair bond formation in male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behavioral Neuroscience*, *115*(4), 910–919. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.115.4.910>

Liu, Y., & Wang, Z. X. (2003). Nucleus accumbens oxytocin and dopamine interact to regulate pair bond formation in female prairie voles. *Neuroscience*, *121*(3), 537–544. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00555-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00555-4)

López-Gutiérrez, M. F., Gracia-Tabuenca, Z., Ortiz, J. J., Camacho, F. J., Young, L. J., Paredes, R. G., Díaz, N. F., Portillo, W., & Alcauter, S. (2021). Brain functional networks associated with social bonding in monogamous voles. *eLife*, *10*. <https://doi.org/10.7554/eLife.55081>

López-Gutiérrez, M. F., Mejía-Chávez, S., Alcauter, S., & Portillo, W. (2022). The neural circuits of monogamous behavior. *Frontiers in Neural Circuits*, *16*. <https://doi.org/10.3389/fncir.2022.978344>

Mak, G. K., Enwere, E. K., Gregg, C., Pakarainen, T., Poutanen, M., Huhtaniemi, I., & Weiss, S. (2007). Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nature Neuroscience*, *10*(8), 1003–1011. <https://doi.org/10.1038/nn1928>

McGuire, B., & Novak, M. (1984). A comparison of maternal behaviour in the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*), prairie vole (*M. ochrogaster*) and pine vole (*M. pinetorum*). *Animal Behaviour*, *32*(4), 1132–1141. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(84\)80229-8](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(84)80229-8)

Merlo, S., Canonico, P. L., & Sortino, M. A. (2011). Distinct effects of pramipexole on the proliferation of adult mouse sub-ventricular zone-derived cells and the appearance of a neuronal phenotype. *Neuropharmacology*, *60*(6), 892–900. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.026>

Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R. P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., ... Bernstein, B. E. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, *448*(7153), 553–560. <https://doi.org/10.1038/nature06008>

Ming, G.-li, & Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neuroscience*, *28*(1), 223–250. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.051804.101459>

Ming, G.-L., & Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, *70*(4), 687–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>

Mohn, F., Weber, M., Rebhan, M., Roloff, T. C., Richter, J., Stadler, M. B., Bibel, M., & Schübeler, D. (2008). Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Molecular Cell*, *30*(6), 755–766. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.007>

Nelson, R. J. (1985). Photoperiod influences reproduction in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Biology of Reproduction*, 33(3), 596–602. <https://doi.org/10.1095/biolreprod33.3.596>

Numan, M., & Young, L. J. (2016). Neural mechanisms of mother–infant bonding and pair bonding: Similarities, differences, and broader implications. *Hormones and Behavior*, 77, 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.015>

Oboti, L., Schellino, R., Giachino, C., Chamero, P., Pyrski, M., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., Fasolo, A., & Peretto, P. (2011). Newborn interneurons in the accessory olfactory bulb promote mate recognition in female mice. *Frontiers in Neuroscience*, 5, 113. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00113>

Park, S., Kim, G. W., Kwon, S. H., & Lee, J.-S. (2020). Broad domains of histone H3 lysine 4 trimethylation in transcriptional regulation and disease. *The FEBS Journal*, 287(14), 2891–2902. <https://doi.org/10.1111/febs.15219>

Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*. Elsevier. <https://play.google.com/store/books/details?id=0prYfdDbh58C>

Petreaanu, L., & Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(14), 6106–6113. <https://doi.org/20026588>

Pinskaya, M., & Morillon, A. (2009). Histone H3 lysine 4 di-methylation: a novel mark for transcriptional fidelity? *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society*, 4(5), 302–306. <https://doi.org/10.4161/epi.4.5.9369>

Portillo, W., Unda, N., Camacho, F. J., Sánchez, M., Corona, R., Arzate, D. M., Díaz, N. F., & Paredes, R. G. (2012). Sexual activity increases the number of newborn cells in the accessory olfactory bulb of male rats. *Frontiers in Neuroanatomy*, 6, 25. <https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00025>

Potretzke, S., & Ryabinin, A. E. (2019). The Prairie Vole Model of Pair-Bonding and Its Sensitivity to Addictive Substances. *Frontiers in Psychology*, 10, 2477. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.02477>

Ramirez-Montaño, D., & Pachajoa, H. (2019). Wiedemann-Steiner syndrome with a novel pathogenic variant in KMT2A: a case report. *Colombia Medica*, 50(1), 40–45. <https://doi.org/10.25100/cm.v50i1.3555>

Resendez, S. L., Keyes, P. C., Day, J. J., Hambro, C., Austin, C. J., Maina, F. K., Eidson, L. N., Porter-Stransky, K. A., Nevárez, N., McLean, J. W., Kuhnmuensch, M. A., Murphy, A. Z., Mathews, T. A., & Aragona, B. J. (2016). Dopamine and opioid systems interact within the nucleus accumbens to maintain monogamous pair bonds. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.15325>

Resendez, S. L., Kuhnmuensch, M., Krzywosinski, T., & Aragona, B. J. (2012). κ -Opioid receptors within the nucleus accumbens shell mediate pair bond maintenance. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(20), 6771–6784. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5779-11.2012>

Reshetnikov, V. V., Kisaretova, P. E., Ershov, N. I., Merkulova, T. I., & Bondar, N. P. (2021). Social defeat stress in adult mice causes alterations in gene expression, alternative splicing, and the epigenetic landscape of H3K4me3 in the prefrontal cortex: An impact of early-life stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 106, 110068. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110068>

Roberts, R. L., Cushing, B. S., & Carter, C. S. (1998). Intraspecific variation in the induction of female sexual receptivity in prairie voles. *Physiology & Behavior*, 64(2), 209–212. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00042-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00042-0)

Rhodes, C., Sandstrom, R., Huang, S., Wang, Y., Schotta, G., Berger, M., & Lin, C. (2016). Cross-species analyses unravel the complexity of H3K27me3 and H4K20me3 in the context of neural stem progenitor cells. *Neuroepigenetics*, 6, 10-25. doi: 10.1016/j.nepig.2016.04.001

Sánchez-Vidaña, D. I., Chan, N.-M. J., Chan, A. H. L., Hui, K. K. Y., Lee, S., Chan, H.-Y., Law, Y. S., Sze, M. Y., Tsui, W.-C. S., Fung, T. K. H., Lau, B. W.-M., & Lai, C. Y. Y. (2016). Repeated treatment with oxytocin promotes hippocampal cell proliferation, dendritic maturation and affects socio-emotional behavior. *Neuroscience*, 333, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.005>

Sarraf, S. A., & Stancheva, I. (2004). RETRACTED: Methyl-CpG Binding Protein MBD1 Couples Histone H3 Methylation at Lysine 9 by SETDB1 to DNA Replication and Chromatin Assembly. *Molecular Cell*, 15(4), 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.043>

Sheehy, R. N., Quintanilla, L. J., & Song, J. (2022). Epigenetic regulation in the neurogenic niche of the adult dentate gyrus. *Neuroscience Letters*, 766, 136343. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136343>

Shulha, H. P., Cheung, I., Whittle, C., Wang, J., Virgil, D., Lin, C. L., Guo, Y., Lessard, A., Akbarian, S., & Weng, Z. (2012). Epigenetic signatures of autism: trimethylated H3K4 landscapes in prefrontal neurons. *Archives of General Psychiatry*, 69(3), 314–324. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2011.151>

Skene, P. J., & Henikoff, S. (2017). An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.21856>

Smith, M. T., Pencea, V., Wang, Z., Luskin, M. B., & Insel, T. R. (2001). Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrous prairie vole. *Hormones and Behavior*, 39(1), 11–21. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2000.1630>

Snyder, J. S., Ferrante, S. C., & Cameron, H. A. (2012). Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *PloS One*, 7(11), e48757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048757>

Srinageshwar, B., Maiti, P., Dunbar, G., & Rossignol, J. (2016). Role of epigenetics in stem cell proliferation and differentiation: Implications for treating neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 199. <https://doi.org/10.3390/ijms17020199>

Suzuki, M. M., & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews. Genetics*, 9(6), 465–476. <https://doi.org/10.1038/nrg2341>

Takeuchi, E., Yamada, D., Suzuki, S., Saitoh, A., Itoh, M., Hayashi, T., Yamada, M., Wada, K., & Sekiguchi, M. (2020). Participation of the nucleus accumbens dopaminergic system in the antidepressant-like actions of a diet rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids. *PloS One*, 15(3), e0230647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230647>

Tarabeux, J., Kebir, O., Gauthier, J., Hamdan, F. F., Xiong, L., Piton, A., Spiegelman, D., Henrion, É., Millet, B., S2D team, Fathalli, F., Joobar, R., Rapoport, J. L., DeLisi, L. E., Fombonne, É., Mottron, L., Forget-Dubois, N., Boivin, M., Michaud, J. L., ... Krebs, M.-O. (2011). Rare mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in autism spectrum disorders and schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 1, e55. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.52>

Ventura, R. E., & Goldman, J. E. (2007). Dorsal radial glia generates olfactory bulb interneurons in the postnatal murine brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(16), 4297–4302. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0399-07.2007>

Walum, H., & Young, L. J. (2018). The neural mechanisms and circuitry of the pair bond. *Nature Reviews. Neuroscience*, 19(11), 643–654. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0072-6>

Wang, H., Duclot, F., Liu, Y., Wang, Z., & Kabbaj, M. (2013). Histone deacetylase inhibitors facilitate partner preference formation in female prairie voles. In *Nature Neuroscience* (Vol. 16, Issue 7, pp. 919–924). <https://doi.org/10.1038/nn.3420>

Wang, Z., Yu, G., Cascio, C., Liu, Y., Gingrich, B., & Insel, T. R. (1999). Dopamine D2 receptor-mediated regulation of partner preferences in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*): a mechanism for pair bonding? *Behavioral Neuroscience*, *113*(3), 602–611. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.113.3.602>

Whitman, M. C., & Greer, C. A. (2009). Adult neurogenesis and the olfactory system. *Progress in Neurobiology*, *89*(2), 162–175. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.07.003>

Wiles, E. T., & Selker, E. U. (2017). H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark. *Current Opinion in Genetics & Development*, *43*, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.11.001>

Williams, J. R., Carter, C. S., & Insel, T. (1992). Partner preference development in female prairie voles is facilitated by mating or the central infusion of oxytocin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *652*, 487–489. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb34393.x>

Williams, J. R., Catania, K. C., & Carter, C. S. (1992). Development of partner preferences in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*): the role of social and sexual experience. *Hormones and Behavior*, *26*(3), 339–349. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(92\)90004-f](https://doi.org/10.1016/0018-506x(92)90004-f)

Young, L. J. (2003). *The Neural Basis of Pair Bonding in a Monogamous Species: A Model for Understanding the Biological Basis of Human Behavior*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK97287/>

Young, L. J., & Wang, Z. (2004). The neurobiology of pair bonding. *Nature Neuroscience*, 7(10), 1048–1054. <https://doi.org/10.1038/nn1327>

Zhang, Z., Manaf, A., Li, Y., Perez, S. P., Suganthan, R., Dahl, J. A., Bjørås, M., & Klungland, A. (2020). Histone Methylations Define Neural Stem/Progenitor Cell Subtypes in the Mouse Subventricular Zone. *Molecular Neurobiology*, 57(2), 997–1008. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01777-5>

Anexo 1: Lista de anticuerpos empleados

| Anticuerpo | Host | Isotipo | Marca | Cátalogo | Dilución | RRID |
|------------------------------|------------------------------|---------|----------------|------------|----------|-------------|
| H3K4me3 | Ratón monoclonal | IgG2b | Abcam | Ab6000 | 1:500 | AB_2118290 |
| H3K27me3 | Conejo Policlonal | N/A | Millipore | ABE44 | 1:1000 | AB_10563660 |
| Sox2 | Conejo monoclonal | IgG | Abcam | Ab92494 | 1:500 | AB_10585428 |
| GFAP | Ratón monoclonal | IgG1 | Abcam | Ab279289 | 1:500 | - |
| *Tirosina Hidroxilasa | Conejo policlonal | N/A | Millipore | AB152 | 1:5000 | AB_390204 |
| *Tirosina Hidroxilasa (LNC1) | Ratón monoclonal | IgG1 | Cell Signaling | mAb 45648S | 1:800 | - |
| Alexa Fluor 488 | Cabra anti conejo policlonal | N/A | Invitrogen | A32731 | 1:1000 | AB_2633280 |
| Alexa Fluor 488 | Cabra anti ratón policlonal | N/A | Invitrogen | A48262 | 1:1000 | AB_2896330 |
| Alexa Fluor 568 | Cabra anti Conejo policlonal | N/A | Invitrogen | A11011 | 1:1000 | AB_143157 |
| Alexa Fluor 568 | Cabra anti ratón policlonal | N/A | Invitrogen | A11004 | 1:1000 | AB_2534072 |

Nota. Las concentraciones fueron seleccionadas atendiendo a las recomendaciones del fabricante y * adaptadas a las referencias mencionadas

Anexo 2: Parámetros de microscopía empleados

| Parámetro/Región | ZSV | | GD | | Nacc | |
|------------------------|-----------------------------|----------------|------------------|----------------|----------------|-----------------|
| Objetivo | Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 | | | | | |
| Experimento | H3K4me3- Sox2 | H3K27- GFAP | H3K4me3- Sox2 | H3K27- GFAP | H3K4me3- TH | H3K27me3- TH |
| Canal Rojo | | | | | | |
| Pinhole | 0.97 | 0.96 | 0.96 | 0.96 | 0.97 | 0.96 |
| Longitud de excitación | 555 | | | | | |
| Longitud emisión | 573 | | | | | |
| Longitud de detección | 568-800 | | | | | |
| Ganancia del detector | 753 | 628 | 689 | 581 | 771.6 | 771.6 |
| Detector offset | -113 | -89 | -404 | -357 | -70 | -70 |
| Ganancia digital | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| Canal Verde | | | | | | |
| Pinhole | 0.97 | 1.0 | 1.00 | 1.00 | 0.98 | 0.96 |
| Longitud de excitación | 488 | | | | | |
| Longitud emisión | 518 | | | | | |
| Longitud de detección | 300-598 | | | | | |
| Ganancia del detector | 843.2 | 759 | 677 | 689 | 707.0 | 673 |
| Detector offset | -189 | -273 | -126 | -296 | -33 | -33 |
| Ganancia digital | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| Canal Azul | | | | | | |
| Pinhole | 0.93 | 0.93 | 1.08 | 1.07 | 0.93 | 0.93 |
| Longitud de excitación | 405 | | | | | |
| Longitud emisión | 435 | | | | | |
| Longitud de detección | 300-508 | | | | | |
| Ganancia del detector | 568 | 568 | 512.0 | 571 | 534.0 | 534 |
| Detector offset | -7 | -82 | -93 | -199 | -53 | -53 |
| Ganancia digital | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 | 1.2 |

Anexo 3: Parámetros análisis de fotomicrografías Fiji/ ImageJ

Protocolo para conteo celular en ZSV H3K4me3/Sox2, células totales

Protocolo conteo celular en ZSV

Parámetros circularidad: área (20-infinito), circularidad (0.4-0.9)

Filtros empleados:

- Subtract Background: 50.0 pixels
- Unsharp Mask: 2, 0.6
- Enhance Contrast: 0.3%
- Gaussian Blur: 0.9
- Make Binary

Watershed

En todos los casos, se delimitó el área de la ZSV de manera externa e interna al ventrículo.

Protocolo Densidad integrada ZSV, GD y Nacc

Protocolo densidad integrada en ZSV, GD y Nacc

En todos los casos se delimitó la región externa e interna de la ZSV. Para el GD se delimitó el área total del GD y por regiones correspondientes al BS y al BI. En el caso del Nacc se delimitaron las porciones externa e interna del núcleo y se restó el área correspondiente a la comisura anterior. En todos los casos, se restó la densidad integrada de una región esperada sin marcaje de la misma fotomicrografía para contrarrestar la autofluorescencia.

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Vista Sagital del cerebro del topillo de la pradera donde se ilustra el circuito propuesto para la formación del vínculo de pareja. | 17 |
| Figura 2. Generación de nuevas interneuronas en el bulbo olfatorio a partir de células neurales troncales en la ZSV. | 18 |
| Figura 3. Generación de nuevas neuronas en el giro dentado del hipocampo a partir de células neurales troncales en la ZSG. | 19 |
| Figura 4. Rol del complejo Polycomb y del complejo Trithorax en la neurogénesis. | 30 |
| Figura 5. Arena de la prueba de preferencia de pareja de tres compartimentos. | 37 |
| Figura 6. Fotografías del proceso de delimitación y conteo celular semiautomatizado mediante el uso del programa FIJI. | 42 |
| Figura 7. Prueba de preferencia de pareja. | 44 |
| Figura 8. Peso de los úteros disectados de hembras control y vínculo. | 45 |
| Figura 9. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en ZSV de topillo adulto hembra control. | 46 |

| | |
|--|----|
| Figura 10. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en la ZSV de topillo adulto hembra control (fotografías tomadas a 40x). | 47 |
| Figura 11. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en ZSV de topillo adulto hembra control (fotografías tomadas a 20x) barra de escala a 10µm). | 47 |
| Figura 12. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en el GD de hembra control. | 48 |
| Figura 13. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en ZSV de topillo adulto hembra control y vínculo. | 49 |
| Figura 14. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en GD de topillo adulto hembra control y vínculo | 50 |
| Figura 15. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en GD de topillo adulto hembra. | 51 |
| Figura 16. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en GD de topillo adulto hembra. | 52 |
| Figura 17. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en ZSV de topillo adulto hembra control y vínculo. | 53 |
| Figura 18. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en NAcc de topillo adulto hembra control y vínculo. | 54 |
| Figura 19. Fotomicrografías representativas de inmunohistoquímica en NAcc de topillo adulto hembra control y vínculo. | 55 |
| Figura 20. Fotomicrografía representativa del núcleo accumbens topillo adulto hembra. | 56 |
| Figura 21. Fotomicrografía representativa de inmunohistoquímica en el GD de un topillo adulto hembra del grupo control mostrando corte ortogonal. | 58 |
| Figura 22. Fotomicrografía representativa de ZSV de topillo adulto hembra control mostrando corte ortogonal. | 59 |
| Figura 23. Análisis de precursores neurales expresando H3K4me3 en la ZSV. | 60 |
| Figura 24. Análisis de precursores neuronales GFAP y expresión de H3K27me3 en la ZSV. | 61 |
| Figura 25. Análisis de precursores neurales Sox2 y expresión de H3K4me3. | 62 |
| Figura 26. Análisis de colocación de precursores neurales expresando H3K4me3. | 63 |
| Figura 27. Análisis de precursores neurales que expresan H3K27me3. | 64 |
| Figura 28. Análisis de población neuronal expresando H3K4me3 y expresión de tirosina hidroxilasa (TH). | 66 |
| Figura 29. Análisis de población neuronal expresando H3K4me3 y expresión de tirosina hidroxilasa (TH). | 67 |