



Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

“ANÁLISIS DEL MARCADOR EPIGENÉTICO H3K9_{me3} EN
NEURONAS DE HIPOCAMPO DORSAL EN RATONES EXPUESTOS
A UN AMBIENTE NOVEDOSO”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN NEUROCIENCIAS

PRESENTA

ARISBETH CITLALI VALENCIA MORALES

DIRIGIDA POR

DR. GILBERTO ALEPH PRIETO MORENO

Ciudad Universitaria, CDMX, 2023



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.

Agradecimientos

Este proyecto fue realizado con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), del cual recibí la beca de titulación a través del proyecto IA203421 “Estudio del dimorfismo sexual en los códigos sinápticos y epigenéticos que subyacen los procesos de aprendizaje y memoria”.

Al Dr. Aleph, por sus enseñanzas, paciencia y supervisión durante el desarrollo teórico y práctico de este trabajo.

Al apoyo técnico de Alejandra Castillo Carbajal y Carina Uribe Díaz durante el análisis de muestras en el citómetro Attune NxT Acoustic Focusing del Laboratorio Internacional de Investigación sobre el Genoma Humano (UNAM).

A los integrantes del comité sinodal, por su tiempo y atención dedicados a la revisión y corrección de tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio C03: Maru, Citlali, Daniel, Fer y Moni. Gracias por su complicidad, compañía y alegría. Atesoro gratos recuerdos del tiempo que pasamos juntos.

Agradezco las amistades que formé durante la licenciatura, particularmente con Monse, Valeria y Habs, fue un gusto compartir con ustedes las risas y frustraciones durante la carrera, su compañerismo fue un aliento para permanecer en esta trayectoria.

A Gerardo y Néstor, por siempre leerme y aconsejarme. Y a los amigos que la vida ha puesto o quitado de mi camino, pero que en algún momento estuvieron pendientes de mi desarrollo académico.

Los más profundos agradecimientos a mis padres y a mi hermana, quienes siempre confían y apoyan mis decisiones. Son una parte esencial en mi vida y gracias a su respaldo he crecido académica y personalmente. Los amo.

Particularmente a mi mamá, gracias por estar pendiente de mí aun sin importar la distancia, ya sea mediante un mensaje, llamada o abrazo, siempre me acompaña.

A mis padres.

A mí.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Aprendizaje y memoria.....	3
2.1.1 Clasificación de la memoria.....	3
2.1.2 Mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria.....	4
2.2 Hipocampo y memoria.....	5
2.2.1 Anatomía del hipocampo	6
2.2.2 Cuerno de Ammon (CA).....	7
2.2.3 Giro dentado (GD)	8
2.2.4 Hipocampo dorsal y ventral	8
2.3 Epigenética.....	9
2.3.1 Tipos de cromatina.....	10
2.3.2 Metilación de histonas	11
2.3.3 H3K9me3 como inhibidor de la activación neuronal	11
2.3.4 Ambiente novedoso como modulador epigenético.....	13
2.4 Dimorfismo sexual en el cerebro	14
2.4.1 Dimorfismo sexual en hipocampo y memoria	15
2.4.2 Regulación génica específica del ciclo estral y del sexo	16
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS	17
4.1 General.....	17
4.2 Específicos	17
5. MÉTODOS	17
5.1 Animales	17
5.2 Determinación del ciclo estral	18
5.3 Exposición a ambiente novedoso.....	19
5.4 Disección de hipocampo dorsal	20
5.5 Aislamiento de núcleos celulares	20
5.5.1 Fijación	20
5.5.2 Homogeneización	21
5.5.3 Permeabilización.....	21
5.6 Cuantificación de proteínas.....	21
5.7 Tinción para citometría de flujo.....	22
5.8 Adquisición de datos por citometría de flujo	23
5.9 Análisis de citometría	24
5.10 Análisis estadístico.....	26

6. RESULTADOS.....	27
6.1 La marca epigenética H3K9me3 predomina en las neuronas y no en la glía del hipocampo dorsal	27
6.2 El nivel de H3K9me3 en neuronas depende del sexo y del ciclo estral	29
6.3 Las hembras en diestro poseen más neuronas con H3K9me3 ^{high}	30
6.4 El nivel de H3K9me3 en neuronas de GD es mayor en las hembras en diestro.....	32
6.5 Subpoblaciones de neuronas H3K9me3 ^{Low} y H3K9me3 ^{High} en GD y CA	34
6.6 Distancia recorrida durante la exploración en el NE	36
7. DISCUSIÓN	36
8.CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	39
REFERENCIAS.....	41

RESUMEN

Evidencias recientes indican que el hipocampo es susceptible a modificaciones epigenéticas durante el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas. En particular, se ha reportado que la trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3, marca epigenética represiva involucrada en la formación de heterocromatina) se presenta en altos niveles en la corteza temporal de cerebros *postmortem* de humanos con Alzheimer, y en el hipocampo de ratones macho viejos. Debido al rol que se le atribuye al hipocampo dorsal en operaciones cognitivas como la memoria espacial, en este trabajo evaluamos la expresión de H3K9me3 en múltiples tipos celulares de dicha región cerebral en ratones. Hipotetizamos que la actividad neuronal, el sexo y el ciclo estral influyen en la acumulación de la marca epigenética H3K9me3 en los distintos tipos celulares del hipocampo dorsal, por lo que estudiamos ratones jóvenes macho y hembra, en las etapas del ciclo estral diestro y proestro. Utilizamos el poder de cuantificación a nivel de evento único que brinda la citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas para H3K9me3 en sujetos control y en aquellos sometidos a un ambiente novedoso, el cual promueve la estimulación neuronal en el hipocampo. Nuestros análisis revelaron que la acumulación de H3K9me3 predomina en las neuronas -y no en la glía- del hipocampo dorsal. Además, los niveles de H3K9me3 dependen del sexo y de la etapa del ciclo estral, siendo mayores en hembras en diestro. En la ventana de tiempo estudiada, no encontramos evidencia de que la estimulación por exposición a un ambiente novedoso modifique los niveles de H3K9me3 en machos y hembras en proestro. Estos resultados revelan que el paisaje epigenético neuronal es diferente en machos y hembras, sugiriendo que la marca epigenética H3K9me3 es vulnerable al perfil hormonal característico de las etapas del ciclo estral.

1. INTRODUCCIÓN

El aprendizaje es la adquisición de nueva información, mientras que la memoria es la retención de la información aprendida. No existe una sola estructura cerebral o mecanismo celular capaz de explicar todo el proceso de memoria, pero se sabe que el hipocampo y la síntesis de proteínas juegan un papel importante en la formación y consolidación de la memoria (Bear et al., 2016).

Recientemente se ha sugerido que en el hipocampo ocurren mecanismos epigenéticos que regulan e intervienen en el proceso de memoria (Chen et al., 2022; Lee et al., 2020; Idoia et al., 2020). Una de las modificaciones epigenéticas que ha ganado interés en la investigación es la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3), la cual está involucrada en la formación y mantenimiento de un estado de heterocromatina con baja o nula tasa de transcripción (Andrew et al., 2002). Existe evidencia que sugiere que la condensación de heterocromatina mediada por H3K9me3 está elevada en neuronas de la corteza temporal de cerebros *postmortem* de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Lee et al., 2020). Además, se ha observado que los niveles de H3K9me3 están elevados en el hipocampo de ratones macho viejos en comparación con ratones jóvenes. De manera interesante, la inhibición farmacológica de la enzima que cataliza la trimetilación de H3K9 (SUV39H1) mejora la memoria de los ratones viejos, lo que indica que los niveles altos de H3K9me3 correlaciona con el deterioro de la memoria (Snigdha et al., 2016).

En este trabajo cuantificamos los niveles de H3K9me3 en diferentes tipos celulares presentes en el hipocampo dorsal de ratones. Dado que existe poca información sobre si los mecanismos epigenéticos en las neuronas son sexualmente dimórficos y/o son regulados por hormonas esteroideas sexuales, incluimos en nuestro estudio ratones macho y hembras (en proestro y diestro); y examinamos el efecto de la exposición a un ambiente novedoso sobre la estabilidad de la marca H3K9me3.

2. ANTECEDENTES

2.1 Aprendizaje y memoria

El interés por entender el proceso de aprendizaje y memoria se remonta desde los antiguos griegos. Actualmente, en términos neurobiológicos, definimos el aprendizaje como la adquisición de información o conocimientos que cumplen una función crítica al permitir que los organismos alteren su comportamiento frente a entornos cambiantes; mientras que la memoria es el resultado de un proceso neuroquímico que permite retener la información aprendida (Bear et al., 2016). Es útil considerar el aprendizaje y la memoria como fenómenos que ocurren en tres etapas: 1) la codificación, que hace referencia a la entrada de estímulos al sistema sensorial, 2) la consolidación, que retiene y estabiliza la información y 3) la evocación, que permite acceder a la información previamente almacenada; sin embargo, podríamos añadir eventos intermedios como la reconsolidación y el olvido, que convierten a la memoria en un fenómeno dinámico y sujeto a alteraciones (Zlotnik y Vansintjan, 2019).

La cognición humana y animal necesita y utiliza a la memoria y el aprendizaje como capacidad intrínseca y esencial para actuar en el mundo, su pérdida o alteración significa no solo el daño a la cognición, sino en gran medida a la personalidad, es por eso la insistente inclinación hacia el estudio y debate científico orientado a la neurobiología de la memoria (Díaz, 2019).

2.1.1 Clasificación de la memoria

Refiriéndonos a un proceso tan complejo como lo es la memoria, es práctico clasificarla en diversas categorías. De acuerdo con el tipo de información que se almacena, se distinguen dos tipos de memoria: 1) declarativa o explícita y 2) no declarativa o implícita. La memoria declarativa se divide en episódica y semántica. La memoria episódica hace referencia al almacenamiento de acontecimientos autobiográficos, contiene experiencias personales que se evocan de manera voluntaria y consciente; mientras que la memoria semántica está conformada por datos sistematizados y datos conceptuales. Por otro lado, la memoria no declarativa se divide en: memoria procedimental, que comprende hábitos y habilidades motoras, donde los movimientos no se realizan de manera consciente sino en forma de procedimiento habitual; y el primado o *priming*,

el cual se refiere a la identificación de estímulos, o algún cambio de respuesta a este, que puede ser perceptual, conceptual o semántico (Alaniz et al., 2022).

En cuanto a la temporalidad de permanencia, la memoria a corto plazo almacena información de forma transitoria, su función es retener información por un periodo corto de tiempo; en este caso, la información es vulnerable a la interrupción u olvido, pero si dicha información es consolidada pasa a ser una memoria de largo plazo, que hace referencia a un almacenamiento permanente.

Aunque pareciera que cada uno de los diferentes tipos de memoria juegan diferentes roles, es importante enfatizar que se refieren a un mismo fenómeno, con procesos de almacenamiento semejantes y estructuras anatómicas estrechamente vinculadas.

2.1.2 Mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria

El establecimiento de memorias duraderas requiere extensos cambios celulares y moleculares en las regiones del cerebro asociadas con la formación y el mantenimiento de la memoria. A continuación, se destacan tres eventos clave que impactaron en la búsqueda de los mecanismos moleculares de cómo almacenamos los recuerdos. Primero, a finales de 1940 Donald Hebb postuló la teoría de que las conexiones sinápticas se fortalecen cuando dos o más neuronas se activan de manera concomitante y que esto es requerido para la formación de memorias a largo plazo. Hebb afirmaba que, si una neurona A está lo suficientemente cerca de la neurona B, habrá cambios estructurales o metabólicos que aumentarían la eficacia de tal sinapsis, provocando la aparición de botones terminales en el axón de la neurona presináptica (Hebb, 1949); esta idea dio paso a lo que hoy denominamos engramas o redes neuronales.

En segundo lugar, Bliss y Lomo (1973) demostraron que la estimulación de alta frecuencia con un tren de potenciales de acción produce un fortalecimiento prolongado de la transmisión sináptica en las vías del hipocampo, esta potenciación a largo plazo (LTP, long-term potentiation) de cierta manera sigue las ideas postuladas por Hebb: se requiere de la actividad postsináptica precedida por la actividad presináptica para fortalecer una conexión sináptica (Mayford et al., 2012).

Por último, el trabajo de Kandel (2001) desarrollado en *Aplysia*, reveló que la memoria a corto plazo es el resultado de un fortalecimiento transitorio de las

conexiones sinápticas preexistentes debido a la modificación covalente de proteínas preexistentes; por el contrario, la memoria a largo plazo es el producto de un fortalecimiento persistente de las conexiones sinápticas mediado por la síntesis de nuevas proteínas, crecimiento sináptico en terminales pre y postsinápticos y transcripción de genes de *novo* (Asok et al., 2019).

Estos datos y el resto de las investigaciones posteriores apuntan a que en la consolidación de memoria intervienen los procesos de expresión génica, síntesis de proteínas y establecimiento de conexiones sinápticas. Es importante destacar que hay múltiples proteínas y cascadas de señalización involucradas. Por ejemplo, tanto la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) como la proteína quinasa A (PKA) llevan a cabo la fosforilación de la proteína CREB (cAMP Response Element Binding), que en el núcleo ejerce como factor de transcripción impulsando la expresión de genes necesarios para el crecimiento sináptico y, en consecuencia, la consolidación de la memoria (Kandel, 2009).

Hoy en día se considera a la LTP como uno de los procesos importantes que sustentan el aprendizaje y la memoria. La LTP se define como un aumento duradero en la comunicación entre dos neuronas como consecuencia de una estimulación eléctrica de alta frecuencia, dicha estimulación permite que la neurona presináptica libere glutamato, el cual aumenta la permeabilidad de los receptores AMPA, lo que despolariza a la terminal postsináptica y produce la repulsión electrostática del ion Mg^{2+} que bloqueaba los canales NMDA, permitiendo así el flujo de iones de Ca^{2+} , que desencadena cascadas de segundos mensajeros que resultan en la inserción de nuevos receptores AMPA en la membrana postsináptica (Mayford et al., 2012).

2.2 Hipocampo y memoria

No existe una sola estructura cerebral o mecanismo celular capaz de explicar todo el proceso de memoria; la formación, retención y recuperación de la memoria implican un sistema de áreas cerebrales conectadas entre sí, tales como la corteza prefrontal, tálamo, amígdala, cuerpos mamilares, etc. Existen evidencias que apuntan a la importancia del lóbulo temporal medio para la memoria declarativa. A partir del trabajo de Brenda Milner y colaboradores (1957) en el caso HM y otros pacientes con problemas de memoria y lesiones en el

lóbulo temporal medial, el hipocampo asumió un papel central en el proceso de memoria; sin embargo, esta estructura no cumple una única función, pues en 1937 James Papez propuso al hipocampo como el centro de las emociones, incluyéndolo dentro del circuito de Papez, que más tarde fue incorporado al sistema límbico por Mac Lean (1952). Además, hay un interés creciente en el estudio del hipocampo, pues es una de las únicas zonas cerebrales del cerebro adulto en donde ocurre la neurogénesis, además del bulbo olfatorio. En resumen, todas estas funciones atribuyen al hipocampo características peculiares y fascinantes por explorar. No obstante, el rol principal que se le atribuye al hipocampo y el que más nos interesa es la actividad fundamental que desempeña en ligar la información sensorial para consolidar la memoria (Bear et al., 2016).

2.2.1 Anatomía del hipocampo

El hipocampo deriva de la región medial del telencéfalo, se ubica en el lóbulo temporal y va desde el hipotálamo hasta la amígdala. Está formado por el subículo y dos capas de neuronas plegadas una sobre otra; una de las láminas se denomina Cuerno de Ammon (CA), y la otra circunvolución o giro dentado (GD).

El tejido hipocampal está constituido por diferentes capas: desde la superficie ventricular hacia el GD se encuentra la capa plexiforme externa, seguida de la capa *oriens*, piramidal, radiada y por último la capa molecular. Esta organización en capas hace al hipocampo una estructura con circuitos intrínsecos complejos y gran cantidad de conexiones (Andersen et al., 2007).

El hipocampo recibe aferencias por tres vías principales que conforman el denominado circuito trisináptico (Fig.1):

1. La vía perforante, que se proyecta desde la corteza entorrinal a las células granulares del giro dentado.
2. La vía de las fibras musgosas, que contiene los axones de las células granulares y se dirige a las células piramidales de la región CA3.
3. La vía colateral de Schaffer, que consiste en colaterales excitadoras de las células piramidales de la región CA3, que terminan en las células piramidales de la región CA1 (Loubon y Franco, 2010).

Además, el hipocampo está conectado recíprocamente a través del fórnix con el tálamo, los cuerpos mamilares y el prosencéfalo basal, así como con la amígdala, los ganglios basales, el cíngulo y los lóbulos frontal y parietal (Billig et al., 2022).

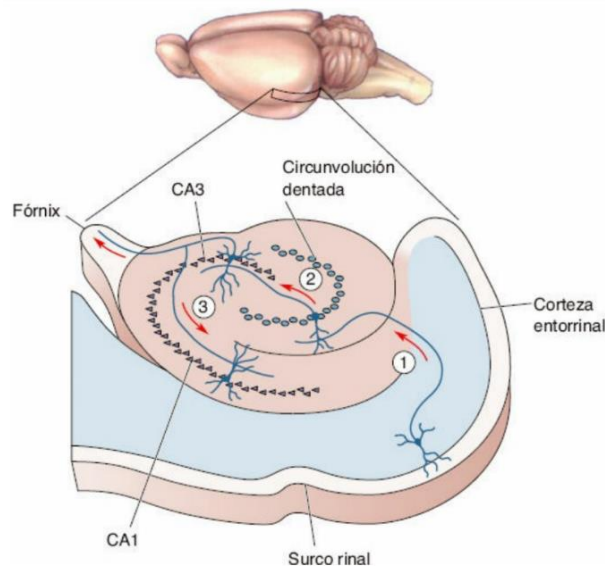


Figura 1. Anatomía y circuitos del hipocampo. 1) Entrada de información desde la corteza entorrinal a través de la vía perforante hacia la circunvolución dentada. 2) Las células granulares del giro dentado emiten axones llamados fibras musgosas que hacen sinapsis con CA3. 3) Las colaterales de Schaffer, provenientes de las células de CA3 se conectan con CA1 (Bear et al., 2016).

2.2.2 Cuerno de Ammon (CA)

La región de CA se divide en tres secciones: CA1, también conocido como sector de Sommer, CA2, y CA3 o sector de Bratz. En CA1 se encuentran células piramidales ubicadas más cerca del subículo, mientras que las piramidales en CA2 y CA3 están más cerca de la superficie y son más largas que las piramidales de CA1 (López y Solís, 2012).

Una característica particular de CA3 es que los procesos axonales que extienden se conocen como colaterales de Schaffer, las cuales inervan a las células piramidales de CA1. Dado el papel de CA en el circuito trisináptico y la formación de memoria, se ha empezado a indagar en la estructura de la cromatina en las diferentes regiones del hipocampo. Por ejemplo, Levenson et al. (2004) observaron cambios epigenéticos en el área CA1 en respuesta al

condicionamiento del miedo contextual, sin embargo, es un campo de investigación que aún falta por explorar.

2.2.3 Giro dentado (GD)

De las regiones que conforman el hipocampo, el GD ha ganado cierta popularidad en la investigación científica, uno de los motivos que lo vuelven interesante es que se considera el principal nicho neurogénico en el cerebro adulto (Camacho et al., 2020).

El GD abarca desde el septum hasta el lóbulo temporal, y se organiza en tres capas: molecular, granular y la capa de células polimórficas. Las células que predominan en el GD son las granulares, las cuales poseen axones amielínicos que generan las denominadas fibras musgosas y que hacen sinapsis con CA3 (Andersen et al., 2007).

Dentro del hipocampo, el GD sirve como puerta de entrada principal y recibe la mayor parte de información aferente de la corteza entorrinal. Podemos considerar al GD como el primer paso de relevo en el procesamiento de la información, pues recoge la información cortical antes que las demás regiones hipocámpales. El importante rol del GD en la plasticidad cerebral, la génesis neuronal y el procesamiento de información lo convierten en una zona susceptible a alteraciones funcionales que se desconocían pero que la reciente investigación señala a potenciales modificaciones epigenéticas que median no solo la actividad del GD, sino del hipocampo en general (Zhang et al., 2018).

2.2.4 Hipocampo dorsal y ventral

El hipocampo parece tener un papel fundamental en ligar la información sensorial para consolidar la memoria, pero desde que Moser y Moser (1998) sugirieron que el hipocampo puede no actuar como una estructura unitaria, sino que está segregada en una porción dorsal y ventral, se ha indagado en las funciones que coordinan cada una de éstas.

Según el consenso actual, el segmento dorsal del hipocampo tiene un papel fundamental en operaciones cognitivas como la memoria espacial, mientras que la porción ventral asume las funciones de conductas emocionales y motivadas (Trompoukis et al., 2020).

Estudios (Meléndez et al., 2020, Pothuizen et al., 2004) confirman que el hipocampo dorsal (HD) modula la memoria espacial, ya que las lesiones

específicas en dicho segmento suprimen la recuperación de la memoria espacial evaluada en pruebas de conductuales como el laberinto acuático de Morris y el laberinto de brazos radiales, mientras que las lesiones en hipocampo ventral (HV) alteran las respuestas al estrés y comportamiento emocional.

Las diferencias funcionales de ambas regiones del hipocampo se basan en que las conexiones aferentes y eferentes son distintas; el complejo subículo-hipocampo dorsal forma una red con la corteza cingulada (anterior y retrosplenial), estructura que media procesos de exploración y navegación espacial (Fanselow y Dong, 2010); mientras que las cortezas infralímbica, prelímbica, la amígdala dorsal y los núcleos del hipotálamo, alcanzan principalmente a la región ventral del hipocampo, lo que sustenta su rol en las respuestas emocionales (Strange et al., 2014).

Hay evidencia (Thompson et al., 2008) que remarca diferentes patrones de expresión génica a lo largo del eje dorsoventral del hipocampo, por ejemplo, se informa que el gen que codifica para los HNC (canales catiónicos activados por hiperpolarización y modulados por nucleótidos cíclicos), que median las corrientes activadas por hiperpolarización y en general la expresión de receptores neuronales, se expresan diferencialmente a lo largo del eje dorsoventral (Strange et al., 2014).

Probablemente, los patrones diferenciales de expresión génica aportan a cada región características particulares que se traducen en propiedades funcionales específicas, que hacen aún más complejo el entendimiento de la fisiología hipocampal.

2.3 Epigenética

Antes de introducirnos en el campo de la epigenética es necesario detallar algunos conceptos clave.

Definimos el genoma como el conjunto completo de ADN (ácido desoxirribonucleico) presente en una célula. El ADN se organiza dentro del núcleo de manera compacta, primero, las moléculas de ADN se envuelven alrededor de las proteínas histonas, formando una estructura de cuerdas llamadas nucleosomas, estos se condensan formando un material fibroso

denominado cromatina, la cual puede desenrollarse para la replicación y transcripción del ADN (Levenson y Sweatt, 2005).

El término epigenética proviene del prefijo griego “*epi*”, que significa “sobre”, y genética, que hace referencia al estudio de los genes y la herencia. La epigenética se define como el estudio de los cambios bioquímicos heredables de la expresión génica que ocurren sin alterar la secuencia de ADN (Kovács et al., 2020). Los patrones alterados de expresión génica pueden ocurrir a través de varios mecanismos que se basan en metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de histonas (acetilación, metilación, fosforilación) y la regulación del RNA (ácido ribonucleico) no codificante. La interacción entre estas transformaciones regula la manifestación del genoma en los distintos tipos celulares, estadios del desarrollo y enfermedades, por lo tanto, mientras que el código genético proporciona la información de los elementos celulares, el código epigenético controla la expresión de dicha información (Menéndez et al., 2012).

2.3.1 Tipos de cromatina

Tal como se mencionó anteriormente, el material genético está organizado en una estructura compleja compuesta de ADN y proteínas que se localiza en el núcleo, denominada cromatina. La estructura de la cromatina define el estado en el que la información genética se organiza en la célula.

De acuerdo con el estado de compactación, existen dos tipos de cromatina: 1) la eucromatina, que corresponde a una conformación de cromatina relajada y transcripcionalmente activa y 2) la heterocromatina, que se caracteriza por una organización condensada y transcripcionalmente silenciosa. A su vez, la heterocromatina se clasifica en facultativa y constitutiva; la primera comprende regiones que contiene genes que se expresan diferencialmente a lo largo del desarrollo y que luego se silencian; por otro lado, la heterocromatina constitutiva se forma en los pericentrómeros y telómeros, que son regiones con secuencias repetitivas dispuestas en tándem (Jury et al., 2020).

Aunque la remodelación de la cromatina generalmente no se hereda, influye en la transcripción de genes al cambiar la accesibilidad de la cromatina a los complejos de transcripción, lo que resulta en cambios en el fenotipo de las células (Kovács et al., 2020).

2.3.2 Metilación de histonas

Las histonas son proteínas alcalinas que constituyen la parte proteica del nucleosoma y desempeñan un papel fundamental en la regulación de la transcripción génica. La modificación de histonas puede ocurrir en consecuencia de la metilación del ADN, o puede estar mediada por mecanismos independientes controlados por la señalización intracelular, implicando una marca de activación o represión para los factores de transcripción (Kovács et al., 2020).

La metilación de histonas implica la adición de uno, dos o tres grupos metilo en las colas N-terminales, donde la lisina reemplaza cada hidrógeno de su grupo NH_3^+ por un grupo metilo (CH_3). Este proceso es llevado a cabo por enzimas denominadas histonas metiltransferasas (HMT) que usan S-adenosil-metionina como donante de grupos metilo, y generalmente actúan en los residuos de lisina (K) o arginina (R) de la histona 3 (H3) y la histona 4 (H4) (Werner et al., 2019).

El efecto de la metilación de las histonas en la transcripción del ADN depende de cuántos grupos metilo se agreguen y a qué residuos estén unidos. Por ejemplo, la metilación de H3K4, H3K36 y H3K79 está asociada con la formación de eucromatina transcripcionalmente activa, mientras que la metilación de H3K9, H3K27 y H4K20 está asociada a la cromatina condensada, con baja o nula tasa de transcripción (Streifer y Gore, 2021). La metilación de histonas juega un papel integral en la regulación de la transcripción de ADN en la célula.

2.3.3 H3K9me3 como inhibidor de la activación neuronal

Recientemente se ha sugerido que en el hipocampo ocurren mecanismos epigenéticos implicados tanto en la función como en la disfunción de la memoria (Lee et al., 2020, Jaeger et al., 2018).

Una de las modificaciones epigenéticas que ha llamado la atención en la investigación en los últimos años es la trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3), la cual está involucrada en la formación y mantenimiento de un estado de heterocromatina con baja o nula tasa de transcripción (Andrew et al., 2002). Se ha documentado que los niveles de expresión de esta marca epigenética están alterados en cerebros de pacientes de la enfermedad de Huntington (Ryu et al., 2006) y síndrome de Rett (Linhoff et al., 2015).

También existe evidencia de que la condensación de heterocromatina mediada por H3K9me3 está elevada en neuronas de la corteza temporal de cerebros *postmortem* de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Lee et al., 2020; Mansuroglu et al., 2016) (Fig. 2a). Además, de acuerdo con Snigdha et al., (2016), los niveles de H3K9me3 están elevados en el hipocampo de ratones viejos en comparación con ratones jóvenes (Fig. 2b). También, Kushwaha y col. (2020) informan que el nivel de H3K9me3 en el hipocampo y en el promotor de Arc, EGR1, Homer1 y Narp, aumentó en ratones macho adultos y viejos en comparación con los jóvenes (Fig. 2c), destacando que la enzima SUV39H1 (histona-lisina N-metiltransferasa) que cataliza la trimetilación de H3K9 aumenta significativamente con la edad. Otro estudio revela que hay un nivel significativamente más alto de acumulación de H3K9me3 en el promotor de Shank1 en ratones salvajes que en ratones SUV39H1 KO (Chen et al., 2022).

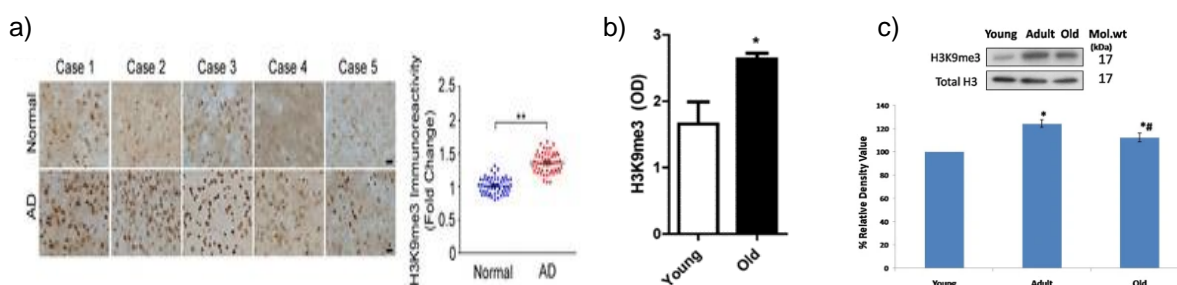


Figura 2. Niveles de H3K9me3 en **a)** neuronas corticales de cerebros humanos *postmortem* con EA en comparación con sujetos sanos (Lee et. al., 2020). **b)** Comparación de los niveles de H3K9me3 en el extracto de hipocampo de ratones jóvenes y viejos (Snigdha et. al., 2016). **c)** Análisis y cuantificación de la expresión de H3K9me3 a nivel de proteína en el hipocampo de ratones jóvenes, adultos y viejos (Kushwaha et. Al., 2020).

Se ha reportado que la inhibición farmacológica de la enzima SUV39H1 en cultivos neuronales aumenta el nivel de proteínas sinápticas como PSD95 (Tong et al., 2019), y mejora el rendimiento de ratones viejos en la tarea de memoria de ubicación de objetos (OLM) y en la prueba de aprendizaje no supervisado (USL), además de que disminuye los niveles de H3K9me3 en el hipocampo (Snigdha et al., 2016), lo que apoya la relación entre los niveles altos de H3K9me3 y el deterioro de la memoria.

Los resultados de Lee et al., (2020) indican que la expresión de H3K9me3 es predominante en neuronas en comparación con astrocitos y microglía. Como

revisamos anteriormente, en el hipocampo hay diferentes regiones y cada una se caracteriza por la presencia de diferentes tipos neuronales, lo que nos lleva a cuestionarnos si la expresión de H3K9me3 es homogénea en las distintas regiones del hipocampo, tomando en cuenta que el tipo celular aporta a la diferencia de roles en el relevo de la entrada de información.

Es importante señalar que los estudios citados anteriormente evalúan los niveles y el efecto de H3K9me3 en el hipocampo de ratones macho, sin embargo, aún no se ha explorado la influencia del sexo o de las hormonas esteroideas en las modificaciones epigenéticas en el hipocampo.

2.3.4 Ambiente novedoso como modulador epigenético

El paradigma de exposición a un ambiente novedoso (NE, del inglés *Novel Environment*) en roedores, consiste en la exploración libre de grandes jaulas equipadas con juguetes u objetos que promueven la estimulación física, cognitiva y sensorial. El NE promueve la activación de neuronas existentes y la neurogénesis adulta en el hipocampo (Zocher et al., 2021), la cual está involucrada en la mediación de conductas dependientes del sexo (Trova et al., 2021). También, promueve la expresión de genes de respuesta temprana (IEGs, *early response genes*), que participan en procesos de plasticidad sináptica, tal como Arc, C-Fos, EGr1, EGr4 y Homer1 (Ramírez et al., 2005, 2013).

Gracias a la presencia de enzimas desmetilasas, los patrones de metilación neuronal son plásticos y sensibles a experiencias ambientales, entonces, las intervenciones conductuales podrían modificar los patrones epigenéticos (Zhang et al., 2020).

Algunos estudios sugieren que el NE contrarresta los cambios de metilación del ADN inducidos por el envejecimiento en genes relacionados con la plasticidad neuronal y la neurogénesis del hipocampo adulto (Morse et al., 2015; Zhang et al., 2018; Zocher et al., 2021). Otras investigaciones han reportado cambios en los niveles de H3K9me3 en ratones viejos machos, pero no en jóvenes, después de emplear tareas como OLM (Snigdha et al., 2016) y ejercicio aeróbico (Ionescu et al., 2021).

2.4 Dimorfismo sexual en el cerebro

En los mamíferos, las diferencias sexuales no se limitan solo al control de la reproducción, sino que involucran una variedad de funciones fisiológicas, neuroanatómicas y conductuales que se desarrollan a través de factores hormonales y genéticos. Durante los periodos críticos del desarrollo, las hormonas regulan la formación de circuitos neuronales característicos del género y activan patrones de comportamiento innato que permanecen hasta la edad adulta (Gegenhuber et al., 2022).

De manera general, las hormonas sexuales se clasifican en estrógenos, progestágenos y andrógenos, que se encuentran tanto en hombres como en mujeres, pero en diferentes concentraciones. En las mujeres predominan los estrógenos y la progesterona, siendo el estradiol (E2) la principal hormona estrogénica; mientras que en los hombres abunda la testosterona, el andrógeno más común.

Tal diferencia de concentraciones hormonales resulta en variaciones tanto neuroanatómicas como neurofisiológicas, por ejemplo, se han reportado diferencias discretas en el volumen total del cerebro, así como de materia gris y materia blanca (Jäncke L, 2018). Luders y colaboradores (2004) reportan mayor girificación en la región frontal y parietal femenina, esto implica más área de superficie cortical, lo que podría justificar las diferencias de volumen cerebral entre sexos.

Los estudios en términos de activación cerebral han demostrado respuestas emocionales diferentes entre sexos, evidenciando que las hembras presentan más activación en la amígdala izquierda, el tálamo izquierdo, los cuerpos mamilares y el núcleo caudado izquierdo en respuesta a estímulos emocionales negativos, en comparación con los machos (Stevens y Hamann, 2012).

Dado que la investigación en neurociencias se ha centrado en gran medida en la función y comportamiento del cerebro masculino, el cerebro femenino se ha dejado sin explorar debido a que las fluctuaciones hormonales participan como variables que podrían alterar el diseño del estudio o entorpecer la interpretación de resultados, sin embargo, dichas oscilaciones hormonales son lo que marcan las diferencias de comportamiento y le brindan identidad única no solo al cerebro femenino, sino también al masculino.

2.4.1 Dimorfismo sexual en hipocampo y memoria

Se han observado diferencias sexuales en la memoria en humanos, primates no humanos y roedores. En particular, el sexo masculino ha mostrado tener una mayor capacidad para recordar patrones espaciales, mientras que las hembras se desempeñan mejor en tareas que requieren de la memoria semántica (Andreano y Cahill, 2009). Específicamente, los ratones que usamos en este estudio, C57BL/6J, exhiben un dimorfismo sexual en áreas de aprendizaje y memoria: mientras que las hembras tienen un mejor desempeño en reconocimiento de objetos, los machos muestran ventaja en tareas espaciales, consistente con resultados de ratas de laboratorio y humanos (Bettis y Jacobs, 2009).

El dimorfismo sexual en los comportamientos dependientes del hipocampo sugiere que podría haber diferencias en la organización anatómica hipocámpal en hombres y mujeres, por ejemplo, se ha informado un hipocampo más grande en mujeres que en hombres (Giedd et al., 1996; Murphy et al., 1996). Cuando la región anterior y posterior del hipocampo se consideran por separado, las mujeres exhiben un hipocampo posterior más grande que los hombres (Persson et al., 2014).

Otro supuesto, es que existen diferencias dependientes del sexo en la inducción o expresión de LTP en el hipocampo. La evidencia inicial que sugiere un papel de las hormonas esteroides sexuales en la memoria surgió a finales de la década de 1980, cuando se localizaron receptores de estrógeno (RE) en el hipocampo dorsal y la corteza entorrinal (Loy et al., 1988; Maggi et al., 1989). Además, se ha demostrado que las neuronas del hipocampo sintetizan E2, el cual favorece el mantenimiento de la LTP y las sinapsis, en las hembras, pero no ocurre lo mismo en machos (Lars y Gabriele, 2015), apoyando la idea del papel crítico de las hormonas sexuales y sus efectos organizacionales en las funciones del hipocampo dependientes de actividad.

La literatura sugiere que los esteroides ováricos, modulan la densidad de las espinas dendríticas del hipocampo, la actividad y la plasticidad sináptica a lo largo del ciclo estral, sin embargo, las conclusiones todavía son controversiales y manifiestan la falta de indagación en el tema.

2.4.2 Regulación génica específica del ciclo estral y del sexo

Retomando el rol de las hormonas sexuales como factores moduladores, los roedores fungen como un buen modelo para estudiar los efectos de las fluctuaciones hormonales en el cerebro y comportamiento. El ciclo estral de los roedores se caracteriza por ser de corta duración (entre 4 y 5 días) y se divide en cuatro etapas: diestro, proestro, estro y metaestro. La fase folicular y lútea humanas son imitadas por el proestro de los roedores (alto nivel de estrógenos y nivel bajo de progesterona) y el diestro (nivel bajo de estrógeno y nivel alto de progesterona), respectivamente (Tapia et al., 2016). Los cambios en los niveles de hormonas sexuales a lo largo del ciclo constituyen un modelo para analizar el papel de los efectos de activación neuronal de estos esteroides en el cerebro adulto.

Al respecto, en su trabajo, Jaric y colaboradores (2019) caracterizaron el efecto del ciclo estral y el sexo sobre la accesibilidad a la cromatina neuronal y la expresión génica en el hipocampo ventral, notando que el 32.1% de las regiones de cromatina abierta muestran accesibilidad diferencial entre hembras en diestro y proestro, lo que significa que la cromatina neuronal del hipocampo sufre una reorganización significativa durante los niveles oscilantes de E2 en el ciclo estral. Esta variabilidad es de un grado similar a la variación entre sexos. Los autores argumentan que los cambios en la cromatina son inducidos por los receptores de estrógeno de membrana, aunque se esperaría que los efectos genómicos de las hormonas sexuales estén mediados por receptores nucleares, sin embargo, los receptores de estrógeno de membrana tienen un papel destacado en la señalización rápida de estrógeno en el hipocampo.

También, los trabajos en diferentes líneas celulares indican que el tratamiento con E2 exógeno cambia la accesibilidad de la cromatina y regula la expresión génica (Chen et al., 2021; Mourad et al., 2014).

Los perfiles hormonales de las etapas del ciclo estral son complejos, y es probable que otras hormonas, además de los estrógenos, incluidos la progesterona y las gonadotropinas, también contribuyan a los mecanismos de regulación epigenética y remodelación de la cromatina.

En este estudio aprovechamos el poder de cuantificación a nivel de evento único que brinda la citometría de flujo para medir y comparar los niveles de H3K9me3

en distintos tipos celulares y regiones del hipocampo dorsal de ratones macho y hembras, para determinar si el sexo y el ciclo estral influyen en los patrones de metilación de la H3K9 en el cerebro.

3. HIPÓTESIS

La actividad neuronal, el sexo y el ciclo estral influyen en la acumulación de la marca epigenética H3K9me3 en los distintos tipos celulares del hipocampo dorsal en ratones adultos jóvenes.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar mediante citometría de flujo los niveles de la marca epigenética H3K9me3 en células del hipocampo dorsal de ratones macho y hembras en estas últimas en las etapas diestro y proestro del ciclo estral.

4.2 Específicos

- Comparar los niveles de H3K9me3 en los dos principales tipos celulares del hipocampo dorsal: neuronas vs. glía.
- Indagar en qué región del hipocampo dorsal hay mayor acumulación de H3K9me3.
- Evaluar si la exposición a un ambiente novedoso modifica los niveles de H3K9me3 en las células del hipocampo dorsal.
- Determinar si el sexo y el ciclo estral influyen en la acumulación de H3K9me3.

5. MÉTODOS

5.1 Animales

Se utilizaron ratones macho (n =12) y hembras (n = 24) de la cepa C57BL/6J de 4-5 meses de edad, procedentes del bioterio del Instituto de Neurobiología, UNAM. Antes de iniciar el procedimiento experimental, los animales se habituaron durante al menos 5 días en un cuarto con ciclo de luz/oscuridad

(12:12h) con las luces encendidas de 07:00 am a 07:00 pm, temperatura de 22 ± 2 °C, con agua y alimento *ad libitum*, acorde a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999.

Los animales fueron seleccionados aleatoriamente al grupo control o experimental; la prueba de comportamiento, exploración en un ambiente novedoso, se realizó durante la fase de luz del ciclo (10-11 am), respetando las normas de uso y manejo de animales de laboratorio del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, y los criterios éticos para el uso de animales de investigación según los estándares internacionales de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH).

5.2 Determinación del ciclo estral

La etapa del ciclo estral en las hembras se evaluó diariamente entre 9:00 y 11:00 a. m., durante tres ciclos ± 2 días; cada ciclo de ratón suele durar de 4 a 5 días, incluidos el proestro, estro, metaestro y diestro. La evaluación se llevó a cabo mediante análisis citológico de frotis vaginales. Brevemente, la punta

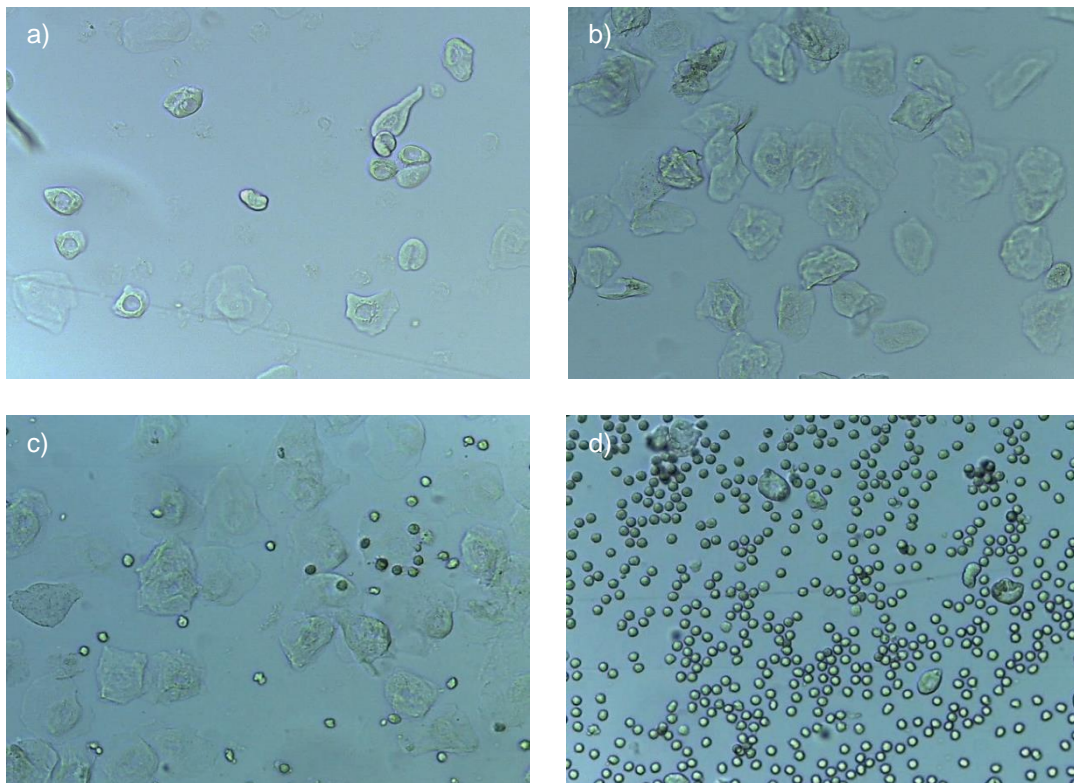


Figura 3. Imágenes de microscopía (aumento 20x) que ejemplifican el tipo celular característico de cada etapa del ciclo estral; **a)** Proestro, células epiteliales nucleadas; **b)** Estro, células epiteliales cornificadas; **c)** Metaestro, células epiteliales cornificadas y leucocitos; **d)** Diestro, leucocitos.

redondeada de una pipeta de transferencia desechable con solución salina estéril se colocó suavemente en la abertura del canal vaginal y se recogieron células mediante lavado. Las muestras se colocaron en un portaobjetos de vidrio y se examinaron bajo el objetivo 20x del microscopio óptico (Leica DM750). Se registraron fotografías con el sistema de cámara Leica ICC50 HD y se clasificaron en función de la proporción relativa de células epiteliales nucleadas, células epiteliales cornificadas y leucocitos presentes (Fig. 3).

En el estudio incluimos hembras con ciclos regulares. Los experimentos se realizaron el día en el que estuvieran en la fase de proestro o diestro, ya que imitan la fase folicular y lútea del ciclo menstrual en humanos, respectivamente.

5.3 Exposición a ambiente novedoso

Los sujetos del grupo experimental (n=18) fueron sometidos a 15 minutos de estimulación en un ambiente novedoso (NE, del inglés *Novel Environment*), el cual consistió en una caja de acrílico de 44cm x 34 cm x 19 cm, con una capa de aserrín limpio y juguetes de varios colores, formas y tamaños con los que el animal podrá interactuar y explorar (Fig. 4). Pasado el tiempo de exploración, los animales fueron regresados a su caja de alojamiento durante 1 hora, hasta la decapitación.

La prueba de comportamiento fue grabada con una cámara colocada en la parte superior de la caja, el video registrado fue procesado mediante el software *EthoVision XT*, el cual se configuró para calcular la distancia recorrida (cm) durante 5 minutos de la exploración espacial, registrando el movimiento a partir del centro del cuerpo del ratón. La estimulación en el NE se hizo por pares de animales del mismo sexo, los cuales cohabitaron originalmente su caja de alojamiento desde el nacimiento. Los sujetos control permanecieron todo el tiempo en su caja de alojamiento.

Mediante la detección de un aumento en la expresión de Arc y c-Fos, el grupo de Gage (Jaeger et al., 2018), mostró que 1 hora después de 15 min. de exposición a un NE son suficientes para producir un incremento en el número de neuronas activas en el DG, así como para la remodelación de programas genéticos.



Figura 4. Contenedor de ambiente novedoso.

5.4 Disección de hipocampo dorsal

Los ratones fueron sedados en una cámara de CO₂ durante 1.5 minutos, una vez que quedaron inmóviles, se procedió a la dislocación cervical, para posteriormente realizar la decapitación. Se realizó un corte a cada lado del foramen magnum, otro en el hueso nasal y finalmente un corte a lo largo de la cisura central interhemisférica, se retiró cada fragmento del cráneo, dejando expuesto el tejido cerebral que fue retirado de la base del cráneo y se depositó en PBS a 4°C.

Para facilitar la manipulación, el tejido se colocó sobre una base metálica fría; se retiró el cerebelo y se realizó un corte en la división interhemisférica, separando los dos hemisferios, se trabajó con uno a la vez, mientras la otra mitad se mantuvo en PBS a 4°C. Se separó el tejido que cubre al hipocampo (tálamo, hipotálamo, etc.) y una vez descubierto el hipocampo, se separó cuidadosamente de la corteza y se partió por la mitad, dividiendo la parte dorsal y ventral. La parte dorsal fue depositada en PBS a 4°C mientras se repetía el mismo procedimiento con el otro lado del hemisferio.

5.5 Aislamiento de núcleos celulares

Los núcleos celulares se aislaron usando el kit True-Nuclear Transcription Factor Staining (Biolegend), de acuerdo con los siguientes pasos:

5.5.1 Fijación

El tejido de hipocampo dorsal fue cortado en rebanadas coronales de 500 μ m (rebanador de tejido McILWAIN Tissue Chopper) que se depositaron en un tubo

Eppendorf con 1.2 ml de solución de fijación (True-Nuclear™), el tubo fue invertido hasta que las rebanadas se separaran una de otra y se incubaron en un rotador durante 15 min. a TA, protegido de la luz, para llevar a cabo el proceso de entrecruzamiento y preservación del tejido. Pasado el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante y el tejido se resuspendió en 1.5 ml de NIB (Nuclei Isolation Buffer, 50 mM sacarosa, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM NH₄Cl, 120 mM TrisHCl, pH 7.4) para neutralizar la reacción de fijado y remover los restos de solución fijadora; una vez más se retiró el sobrenadante y se añadió 1 ml de NIB.

5.5.2 Homogeneización

Las rebanadas de hipocampo fueron transferidas a un mortero de vidrio Dounce junto con 1 ml de NIB y se homogeneizaron dando 20 golpes con el émbolo de menor tamaño (A), seguido de 20 golpes con el émbolo de mayor tamaño (B); los pasos se llevaron a cabo a 4°C.

El homogenizado se transfirió a un filtro de 30 µm (Fisher Scientific) prehumedecido con NIB colocado sobre un tubo Falcon de 15 ml; el filtro se lavó 2 veces con 1 ml de NIB, consiguiendo así un volumen final de 3 ml de solución filtrada y enriquecida de núcleos celulares. El tubo fue invertido completamente 3 veces e inmediatamente se tomaron 10 µl para el ensayo de BCA.

5.5.3 Permeabilización

La solución de núcleos se repartió en dos tubos Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 2000 g durante 5 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 ml de buffer de permeabilización True-Nuclear™ 1x; se dejó incubar durante 30 minutos en agitación a TA.

5.6 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas totales fue cuantificada mediante el ensayo BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit-Thermo Fisher Scientific). La curva patrón se preparó usando estándares de albúmina sérica bovina (BSA) con las siguientes concentraciones: 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml y 1000 µg/ml. En una microplaca de 96 pocillos se adicionaron 10 µl de cada estándar y 10 µl

de solución enriquecida en núcleos. Dependiendo de la cantidad de pocillos, se preparó la solución de trabajo BCA mezclando el reactivo A con el reactivo B (50:1) y se agregaron 200 µl de la solución de trabajo a cada pocillo; la placa se mantuvo en agitación durante 30 s y posteriormente se incubó durante 45 minutos a 39°C. Pasado el tiempo de incubación, la placa se mantuvo 3 min. a TA y se cuantificó en el lector de absorbancia de microplacas iMark™.

5.7 Tinción para citometría de flujo

Las poblaciones de núcleos celulares se pueden separar en función de los parámetros FSC (Forward Scatter) y SSC (Side Scatter), pero también se pueden separar por la expresión de una proteína específica. En este caso, utilizamos anticuerpos primarios que distinguen NeuN, proteína presente específicamente en neuronas (Gusel y Korzhevskiy 2015); Prox1, que se expresa en células granulares maduras del giro dentado durante el desarrollo y en el cerebro adulto, y H3K9me3, dirigido a la marca epigenética de interés. Añadimos anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos que detectan el anticuerpo primario. La conjugación de anticuerpos y la dilución usada se describe en la Tabla 1.

A partir de la concentración obtenida en la cuantificación por BCA, se calculó el volumen necesario que contenía 100 µg de núcleos. En cada tubo para citómetro se colocaron 100 µg de núcleos y 2 ml de buffer de permeabilización 1x, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min. a 20°C, se decantó el sobrenadante y se añadieron los anticuerpos primarios diluidos en 250 µl de buffer de permeabilización 1x, se resuspendió el pellet y se incubaron durante 1 h en agitación a TA, protegidos de la luz.

Después, se realizó un lavado, añadiendo 2 ml de buffer de permeabilización 1x y centrifugando a 2000 rpm durante 5 min. a 20°C, se decantó el sobrenadante y se añadieron los anticuerpos secundarios diluidos en 250 µl de buffer de permeabilización 1x, se resuspendió el pellet y se incubaron durante 30 min. en agitación a TA y protegidos de la luz.

Finalmente, se realizó un lavado con 4 ml de Tritón 0.1%, se decantó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido y almacenado en 350 µl de PBS a 4°C, protegidos de la luz hasta su lectura en el citómetro de flujo.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Marcador celular
α -NeuN IgG1- ratón (1:5000)	PerCP- Vio700 α -IgG1- ratón (1:125)	Neuronas
α - Prox1 IgG2b- ratón (1:300)	Alexa Fluor 488 α -IgG2b ratón (1:250)	Células granulares del giro dentado
α -H3K9me3 IgG- conejo (1:1000)	Alexa Fluor 647 α -IgG conejo (1:250)	Marca epigenética H3K9me3

Tabla 1. Combinación de anticuerpos y entre paréntesis la dilución utilizada.

5.8 Adquisición de datos por citometría de flujo

Las muestras se analizaron en el citómetro Attune NxT Acoustic Focusing (Laboratorio Internacional de Investigación sobre el Genoma Humano, UNAM). Los fluorocromos utilizados para la detección de proteínas diana emiten luz después de ser excitados por un láser de longitud de onda compatible, cada fluorocromo posee su propio espectro de excitación y emisión característico. Los datos de cada evento representan la intensidad de la señal de la luz detectada en cada canal para cada evento. Los canales y láseres utilizados para la adquisición de datos se describen en la tabla 2.

Se adquirieron datos de tinciones únicas (SS, del inglés *Single Stain*), usadas como control de compensación que permitieron aislar el espectro de cada color para después calcular y eliminar el traslape de señal emitidas por los distintos fluorocromos. También se emplearon controles de fondo de fluorescencia (FMO, del inglés *Fluorescence Minus One*) para cada animal, los cuales permitieron definir el límite entre tinción positiva y negativa para cada fluorocromo.

En cada lectura se estableció un límite de adquisición de hasta 100,000 eventos en 250 μ l de muestra y un umbral de tamaño de valor 25.

Fluorocromo	Laser de excitación	Longitud de onda de emisión max.	Detector
PerCP-Vio700	Azul 488 nm	704 nm	BL3- far red
Alexa Fluor 488	Azul 488 nm	521 nm	BL1-green
Alexa Fluor 647	Rojo 638 nm	671 nm	RL1- far red

Tabla 2. Canales y láseres utilizados para la lectura y adquisición de datos.

5.9 Análisis de citometría

Los datos de citometría de flujo se analizaron con el software *FlowJo*TM v10.8 (*BD Life Sciences*). Los archivos con menos de 60,000 eventos fueron excluidos del análisis (n=7). Se usaron gráficos FSC-SSC para seleccionar la población principal de eventos (Fig. 5a). Después, la discriminación de eventos dobles se realizó graficando la altura FSC (FSC-H) contra el área FCS (FSC-A) (Fig. 5b). Los eventos dobles se caracterizan por tener el valor de área al doble que un evento único, mientras que la altura permanece similar.

En la primera sección del análisis, a partir de la población identificada como eventos únicos (*Singlets*), diferenciamos dos grupos con base en la expresión de NeuN (proteína específica de neuronas): los eventos con tinción NeuN+ corresponden a núcleos neuronales, mientras que los núcleos con tinción NeuN- pertenecen a los demás tipos celulares del cerebro, aludiendo a la glía (Fig. 5c). Después, seleccionamos la población positiva a la marca epigenética (H3K9me3+) en glía (Fig. 5d) y neuronas (Fig.5e), en el segmento H3K9me3+ de NeuN+ se aplicó un valor de corte en 59,000 unidades arbitrarias (a.u.) para dividir subpoblaciones con alta (High) y baja (Low) intensidad de fluorescencia (Fig. 5f). Dicho valor de corte, que diferencia las subpoblaciones High y Low, fue aplicado de manera idéntica a los datos de todos los sujetos, controles y estimulados (NE).

En la segunda sección del análisis, a partir de la población NeuN+, diferenciamos dos grupos con base en la expresión de Prox1 (marcador de neuronas del GD): los núcleos Prox1+ corresponden a células granulares del GD, mientras que los núcleos con tinción negativa para Prox1 (Prox1-) corresponden a todos los demás tipos neuronales del hipocampo, principalmente localizados en la región CA (Prox1-, Fig. 6d). Similar a la primera parte del análisis, identificamos la población H3K9me3+ y posteriormente la dividimos en subpoblaciones High y Low, tanto en CA (Fig. 6e) como en GD (Fig. 6f).

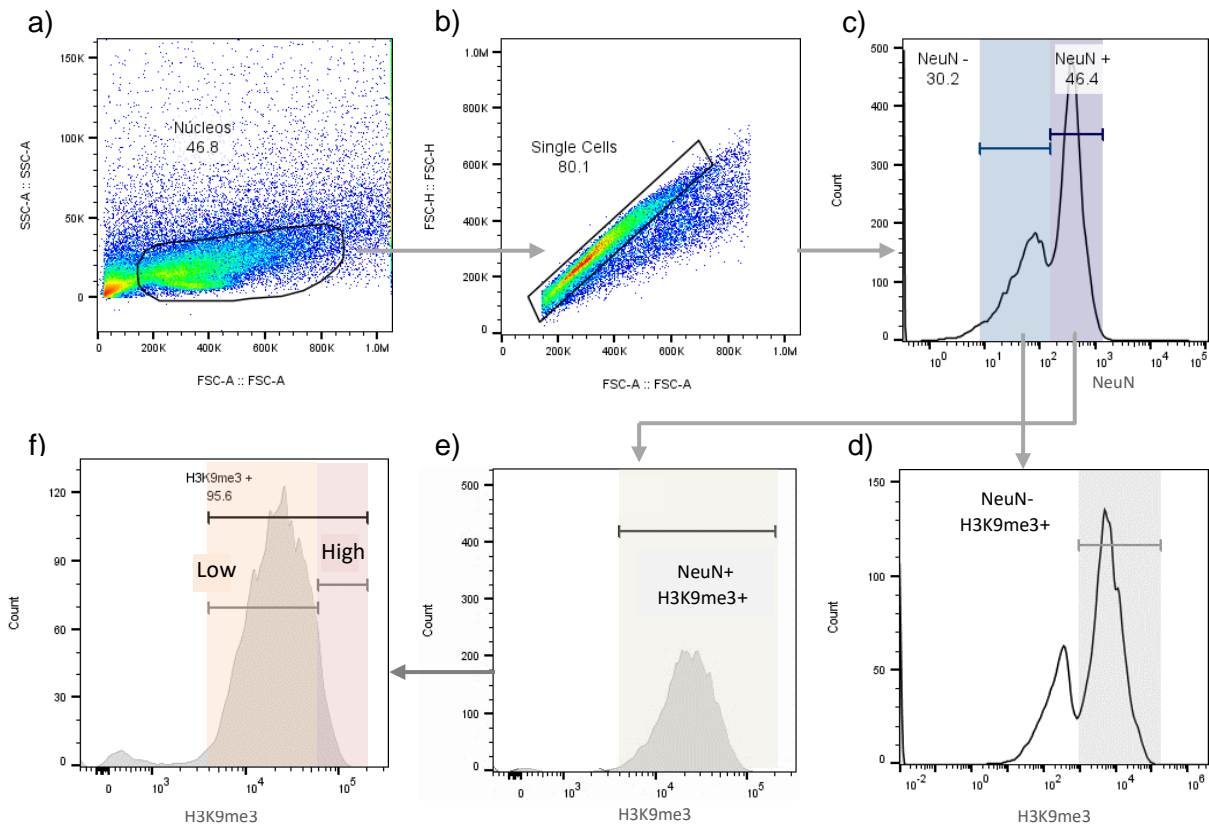


Figura 5. Secuencia del análisis de los datos (*gating strategy*). **a)** Gráfico de puntos con los parámetros FCS y SSC que muestra el total de eventos, a partir del cual se seleccionó la población enriquecida en núcleos celulares. **b)** Discriminación de eventos dobles graficando el área (FSC-A) y la altura (FSC-H) del parámetro FSC. **c)** Histograma representativo de la tinción de NeuN que permitió distinguir subpoblaciones de neuronas (NeuN+) y no neuronas (NeuN-). En las poblaciones NeuN- (**d**) y NeuN+ (**e**) seleccionamos los núcleos con tinción positiva a la marca epigenética (H3K9me3+). **f)** La población neuronal se dividió en subpoblaciones con baja (Low) o alta (High) intensidad de fluorescencia.

A los datos de todos los sujetos fueron aplicados los mismos valores de corte que dividían cada población, en las cuales, el límite entre tinción positiva y negativa fue definida tomando en cuenta el FMO de cada fluorocromo. Además, a cada grupo (machos y hembras) le fue asignado la matriz de compensación correspondiente, definida a partir de tinciones únicas para cada fluorocromo, lo que permitió eliminar el traslape de señal entre los diferentes detectores. Una vez concluido el análisis de citometría los datos fueron agrupados para proceder al análisis estadístico.

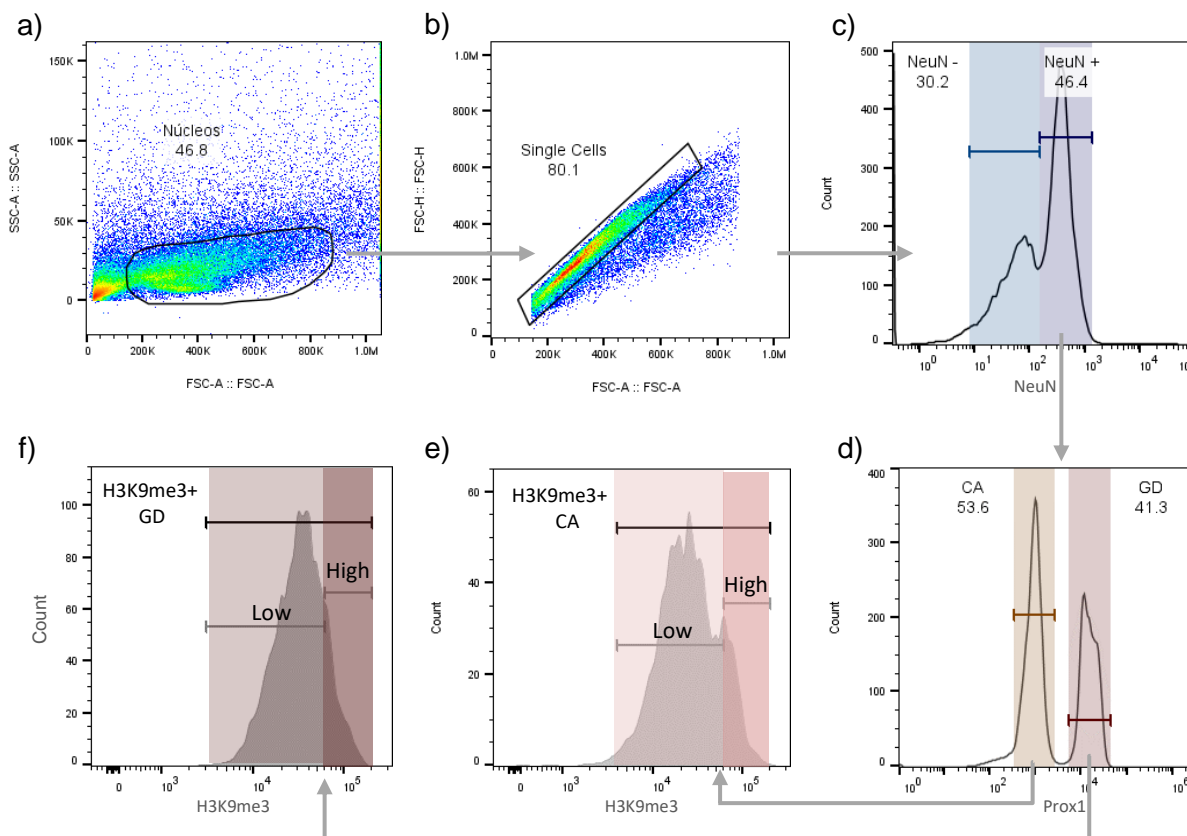


Figura 6. Secuencia del análisis de los datos. **a)** Gráfico de puntos con los parámetros FCS y SSC que muestra el total de eventos, a partir del cual se seleccionó la población enriquecida en núcleos celulares. **b)** Discriminación de eventos dobles graficando el área (FSC-A) y la altura (FSC-H) del parámetro FSC. **c)** Histograma representativo de la tinción de NeuN que permitió distinguir subpoblaciones de neuronas (NeuN+) y no neuronas (NeuN-). **d)** En núcleos identificados como NeuN+, la tinción de Prox1 permitió separar células granulares del GD (Prox1+) y los demás tipos neuronales del hipocampo, aludiendo a CA (Prox1-). En la población de CA **(e)** se identificaron los núcleos con tinción positiva a la marca epigenética (H3K9me3+) y se dividieron en subpoblaciones con baja (Low) o alta (High) intensidad de fluorescencia.

5.10 Análisis estadístico

Los datos de citometría se analizaron mediante el análisis de varianza de dos vías (ANOVA DV), con la estimulación y el sexo-fase del ciclo estral como factores. Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron significativos; los valores de $p \leq 0.05$ determinados por ANOVA fueron seguidos por la prueba *post hoc* de Tukey, mientras que los datos de la distancia recorrida se analizaron con ANOVA de una vía. Los resultados se presentan como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM). Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa *GraphPad Prism 8.0.1*.

6. RESULTADOS

6.1 La marca epigenética H3K9me3 predomina en las neuronas y no en la glía del hipocampo dorsal

Para identificar a la población celular (neuronas o glía) con un mayor porcentaje de eventos positivos para la tinción de la marca epigenética H3K9me3 (eventos H3K9me3+), realizamos una inmunotinción para el marcador NeuN (proteína específica de neuronas), lo cual permitió distinguir subpoblaciones de células no neuronales (NeuN-, Fig. 7a) y neuronales (NeuN+, Fig. 7b). Lo anterior a partir de núcleos celulares aislados del hipocampo dorsal de ratones jóvenes (4-5 meses) machos y hembras, en estas últimas tanto en diestro (hembras-di) como en proestro (hembras-pro).

Primero comparamos el porcentaje de células NeuN+ y NeuN- con tinción H3K9me3+ en condición basal, es decir, en animales que permanecieron siempre en su hábitat control (HC) y por lo tanto no recibieron ningún tipo de estimulación. En ambas poblaciones, NeuN+ y NeuN-, encontramos porcentajes detectables de H3K9me3; sin embargo, cerca del 100% de las neuronas del hipocampo dorsal muestran positividad a H3K9me3, mientras que la proporción de glía que expresa H3K9me3 es significativamente menor (%H3K9me3+: 95.6% \pm 0.7% neuronas vs 61.8% \pm 2.03% glía). Esta diferencia es independiente del sexo y de la etapa del ciclo estral, siendo el tipo celular el factor determinante en la acumulación de H3K9me3 (ANOVA DV, $p < 0.0001$, Fig. 7c). La prueba post hoc de Tukey confirmó que el porcentaje de eventos H3K9me3+ es significativamente mayor en núcleos neuronales en comparación con núcleos NeuN-, tanto de ratones macho, como de hembras-pro y hembras-di ($p < 0.0001$). Después, determinamos si la exposición a un NE (15 min.) modifica los niveles de la marca epigenética, evaluados 1h después de la estimulación. La comparación entre los animales sometidos al NE y su respectivo control (HC) no mostró diferencias significativas en la tinción para H3K9me3 en neuronas ($p=0.69$, ANOVA DV, Fig. 7d) ni tampoco en glía ($p=0.83$, ANOVA DV, Fig. 7e), lo que sugiere que en las células del hipocampo dorsal los niveles de H3K9me3 no cambian de manera temprana (1h) en respuesta a estimulación sensorial.

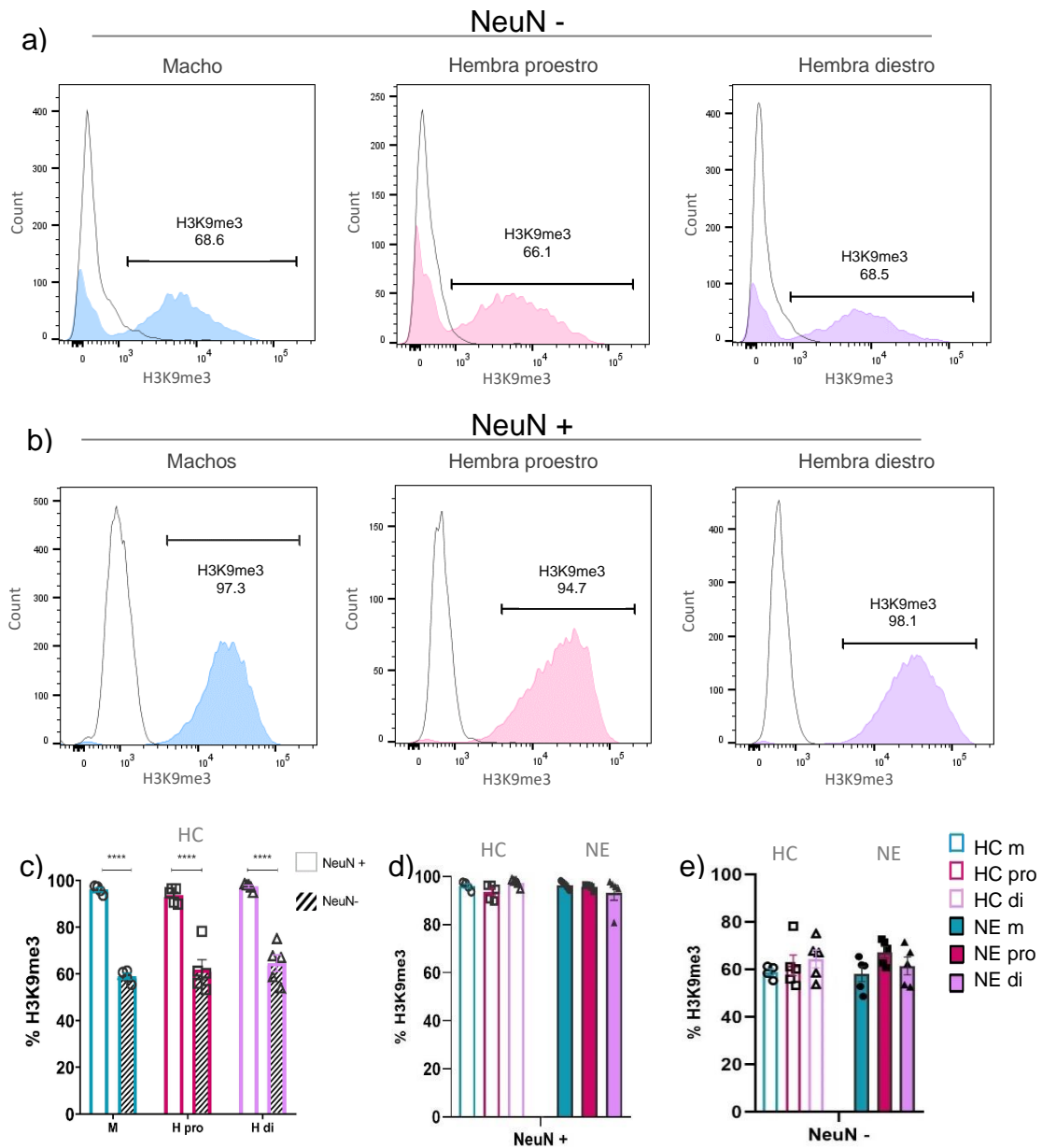


Figura 7. Histogramas representativos de la tinción para H3K9me3 en núcleos de células NeuN- (**a**) y NeuN+ (**b**) de hipocampo dorsal en ratones macho, hembra en proestro y hembra en diestro. En cada gráfico se muestra el control FMO (línea negra), a partir del cual se definieron las poblaciones positivas. **c)** Porcentaje de H3K9me3 en las poblaciones NeuN+ y NeuN- de ratones HC. **d)** Porcentaje de neuronas positivas a la tinción H3K9me3 en animales HC y NE. **e)** Porcentaje de células no neuronales positivas a la tinción H3K9me3 en los grupos HC y NE. Los valores de $p \leq 0.05$ determinados por ANOVA DV fueron seguidos por la prueba *post hoc* de Tukey (**** $p < 0.0001$).

6.2 El nivel de H3K9me3 en neuronas depende del sexo y del ciclo estral

Durante el análisis de los datos notamos que la curva de intensidad de la señal de H3K9me3 en neuronas de las hembras-di mostraba un sesgo hacia la derecha con respecto a las curvas de machos y hembras-pro, lo que sugería la presencia de una población de neuronas con alta expresión de H3K9me3 principalmente en hembras-di (Fig. 8a). Esta idea se comprobó al comparar la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI, del inglés *Mean Fluorescence Intensity*) para la marca H3K9me3 en los núcleos NeuN+: el análisis estadístico mostró una diferencia significativa entre sexos ($p=0.04$, ANOVA DV), la MFI de neuronas de las hembras-di es mayor en comparación con hembras-pro ($p=0.01$, *post hoc* de Tukey) y con machos ($p=0.02$, *post hoc* de Tukey, Fig. 8b), confirmando que en las hembras-di existe una población neuronal con alta expresión de H3K9me3; lo cual no ocurre en la población NeuN- (Fig. 8 c, d).

En conjunto, nuestros datos indican que la acumulación de H3K9me3 en el hipocampo dorsal predomina en las neuronas, tanto en hembras como en machos. Sin embargo, principalmente las hembras-di poseen un grupo de neuronas con alta expresión de dicha marca epigenética, sugiriendo que la trimetilación de H3K9 incrementa en respuesta a las condiciones características de la etapa diestro del ciclo estral.

Con base en los resultados descritos, definimos un valor de corte para dividir la población total de neuronas H3K9me3+ en función de la intensidad de la marca H3K9me3, clasificando así neuronas con niveles bajos (H3K9me3^{Low}) y altos (H3K9me3^{High}) de la marca epigenética. Establecimos el valor de corte en 59,000 (a.u.), valor en el que el porcentaje de neuronas H3K9me3^{High} es menor al 10% en machos y en hembras-pro (HC).

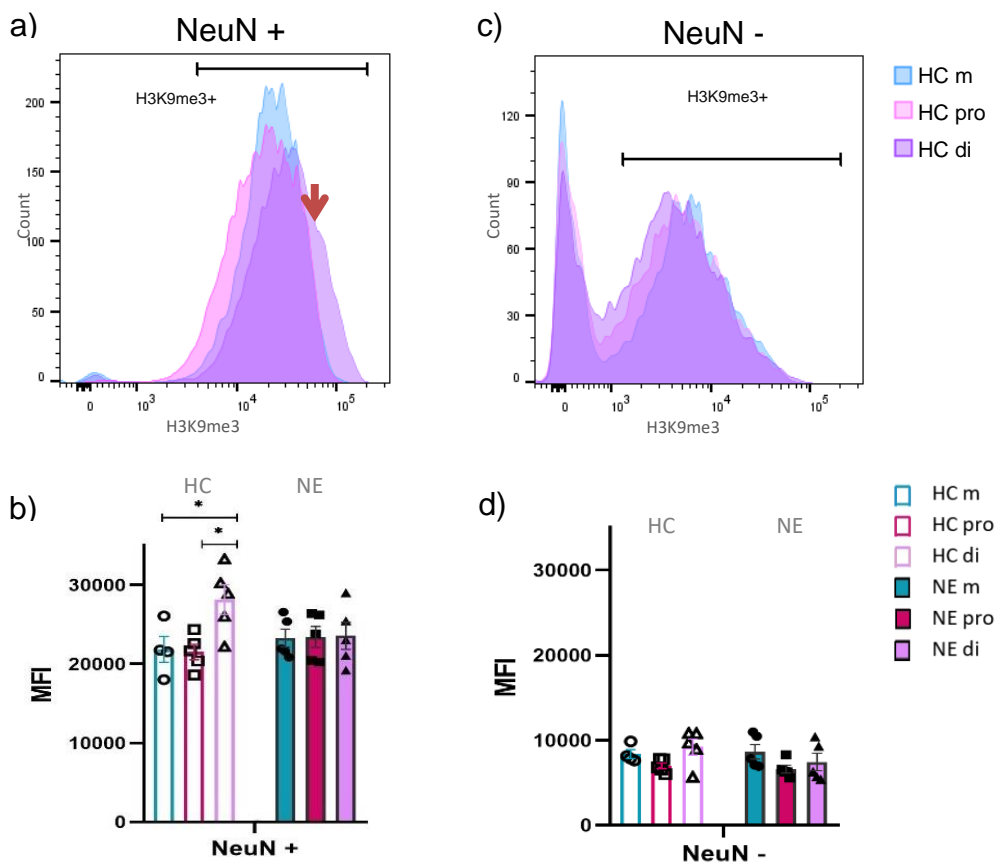


Figura 8. Histogramas representativos que muestran el sobrelape de poblaciones H3K9me3+ en (a) NeuN+ (la flecha gris señala el sesgo hacia la derecha de la curva de la intensidad de la señal H3K9me3+ en hembras-di) y (b) NeuN-. Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de la tinción H3K9me3 en células NeuN+ (c) y NeuN- (d). La diferencia estadística entre grupos se determinó mediante ANOVA DV y prueba de comparaciones múltiple de Tukey (* $p < 0.05$), cada grupo con $n = 4-5$ ratones de 4-5 meses de edad.

6.3 Las hembras en diestro poseen más neuronas con H3K9me3^{high}

Con las poblaciones *low* y *high* definidas de manera idéntica en los tres grupos (Fig. 9a), encontramos que el sexo tiene un efecto principal en la proporción de neuronas con H3K9me3^{High} ($p = 0.01$, ANOVA DV), pues la acumulación es aproximadamente tres veces mayor en las hembras-di HC, en comparación con los machos (%H3K9me3+: $15\% \pm 2.5\%$ hembras-di vs $6.2\% \pm 1.3\%$ machos, $p = 0.02$ *post hoc* de Tukey) y con las hembras-pro (%H3K9me3+: $15\% \pm 2.5\%$ hembras-di vs $5.8\% \pm 1.2\%$ hembras-pro, $p = 0.01$, *post hoc* de Tukey) (Fig. 9b). De manera interesante, la diferencia en el número de neuronas H3K9me3^{High} (mayor en hembras-di respecto a machos y a hembras-pro) sólo se observa en animales control (HC), y no en aquellos expuestos al NE (Fig. 9b). Lo anterior

nos lleva a considerar que la estimulación sensorial *per se* disminuye la cantidad de neuronas que acumulan altos niveles de H3K9me3 durante el diestro. Respecto a la subpoblación de neuronas con H3K9me3^{Low}, no detectamos diferencias entre sexos y sujetos HC y NE ($p > 0.05$, ANOVA DV, Fig. 9c). Nuestros datos apoyan la hipótesis de que la actividad neuronal, el sexo y el ciclo estral influyen en la acumulación de H3K9me3 en neuronas del hipocampo dorsal, sugiriendo que los niveles oscilantes de E2 y progesterona a lo largo del ciclo estral intervienen en procesos de reorganización epigenética.

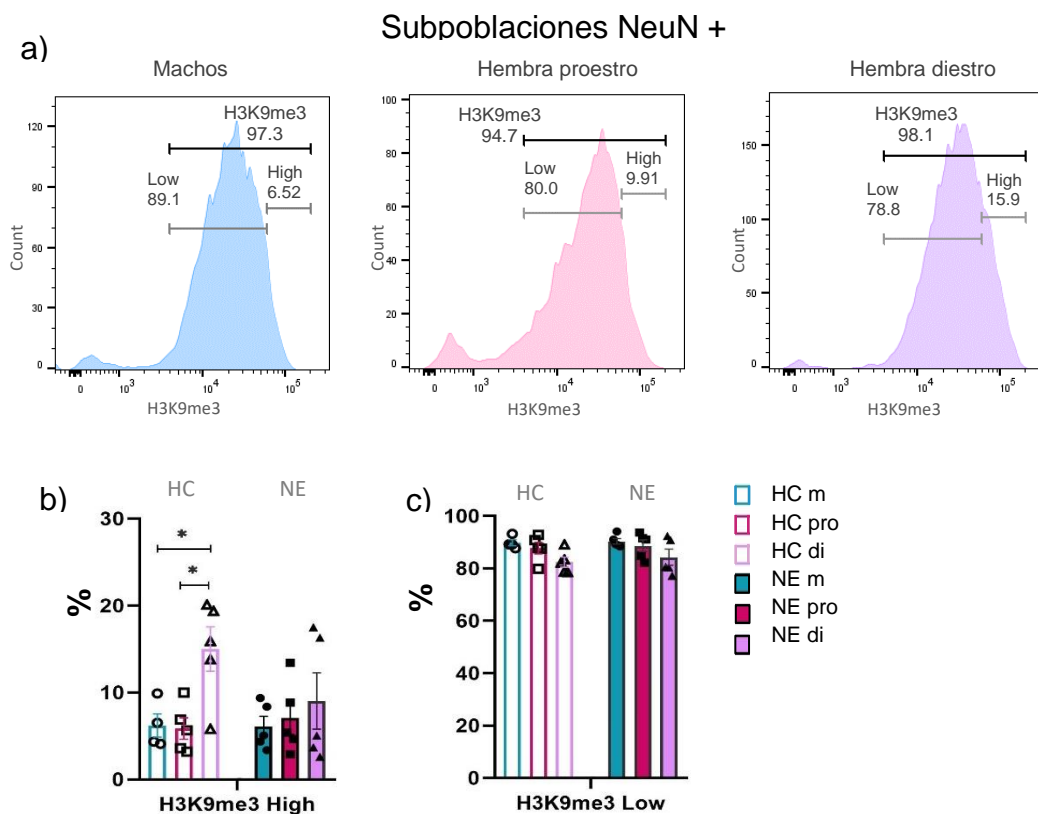


Figura 9. a) Histogramas representativos de la tinción H3K9me3 y subpoblaciones Low y High en neuronas de hipocampo dorsal en ratones macho y hembra proestro y diestro. En **b) y c)** se grafica el porcentaje de neuronas H3K9me3^{High} y H3K9me3^{Low} de los sujetos HC y NE. La diferencia estadística entre grupos se determinó mediante ANOVA DV y prueba de comparaciones múltiple de Tukey (* $p < 0.05$).

6.4 El nivel de H3K9me3 en neuronas de GD es mayor en las hembras en diestro.

A partir de la población NeuN+, diferenciamos dos grupos con base en la expresión de Prox1 (marcador de neuronas del GD, Lavado y Oliver, 2007): los núcleos Prox1+ corresponden a células granulares del GD (Fig. 10a), mientras que los núcleos con tinción negativa para Prox1 (Prox1-) corresponden a todos los demás tipos neuronales del hipocampo, principalmente localizados en la región CA (Prox1-, Fig. 10b).

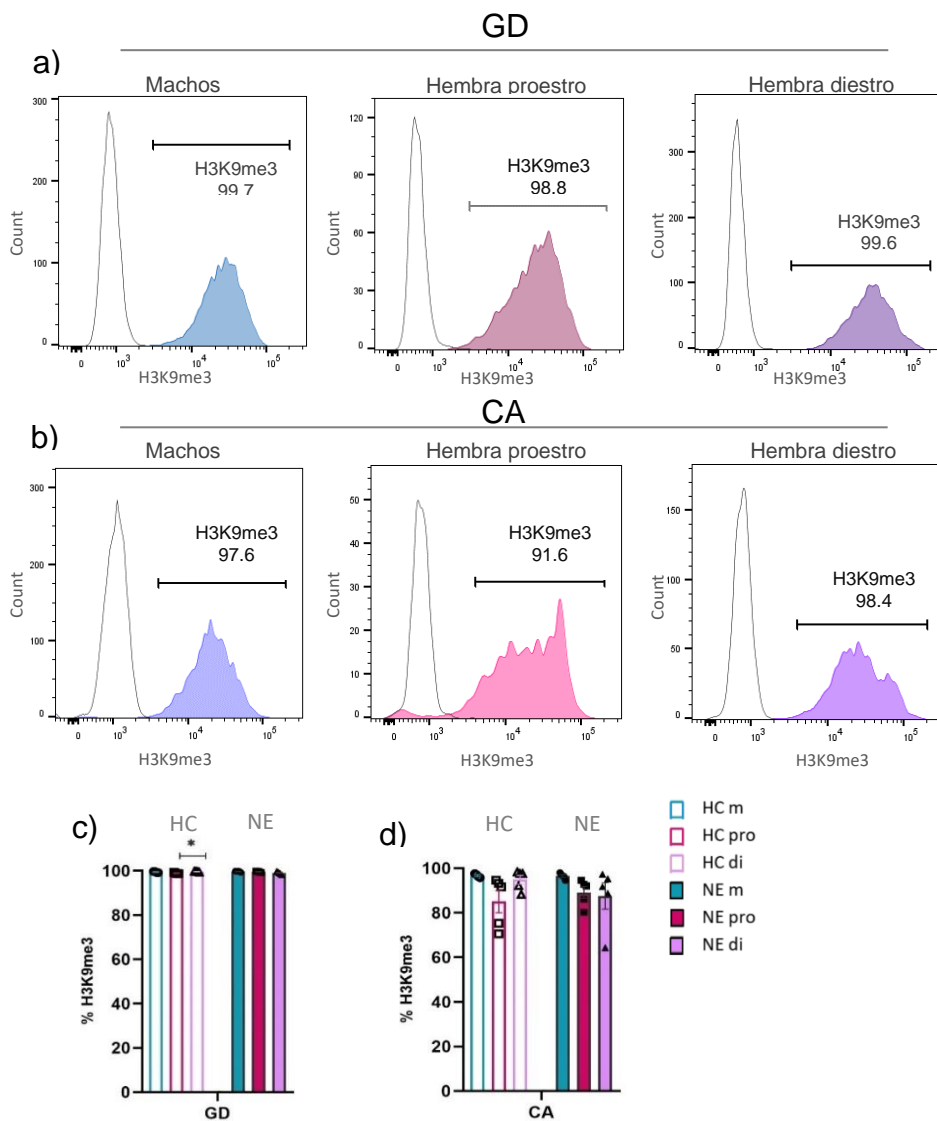


Figura 10. Histogramas de H3K9me3+ en células granulares de GD **(a)** y CA **(b)** de ratones macho y hembras en proestro y diestro. Porcentaje de neuronas positivas a la tinción H3K9me3 en GD **(c)** y CA **(d)** del grupo HC y NE. La diferencia estadística entre grupos se determinó mediante ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiple de Tukey (* $p < 0.05$).

Alrededor del 100% de los núcleos de las células granulares del GD muestran señal de fluorescencia positiva a la tinción para H3K9me3; en el grupo de las hembras-di HC hay un ligero pero significativo aumento de 0.7% en el porcentaje de H3K9me3+ con respecto a las hembras-pro (%H3K9me3+: 99.6% ± 0.06 hembras-di vs 98.9% ± 0.1 hembras-pro, $p=0.03$, ANOVA DV-Tukey, Fig. 10c). En las células Prox1-, la mayoría los grupos poseen más del 97% de H3K9me3+, y no se observaron diferencias significativas entre machos y hembras HC y NE (Fig. 10d).

De manera relevante, el sesgo hacia la derecha observado en la curva de fluorescencia de H3K9me3 en NeuN+ de hembras-di, se mantiene en las subpoblaciones Prox1+ (Fig. 11a) y Prox1- (Fig. 11b), siendo mayor el valor de la MFI en las células del GD de hembras-di HC en comparación con las hembras-pro HC (MFI: 28,504 ± 2031 a.u. hembras-di vs 20,880 ± 844 a.u. hembras-pro, $p=0.02$, *post hoc* de Tukey, Fig. 11c). En la subpoblación Prox1-, nuevamente se observa que las hembras-di HC tienen valores más altos de MFI que las hembras-pro y machos HC, sin embargo, el análisis estadístico no reveló efectos

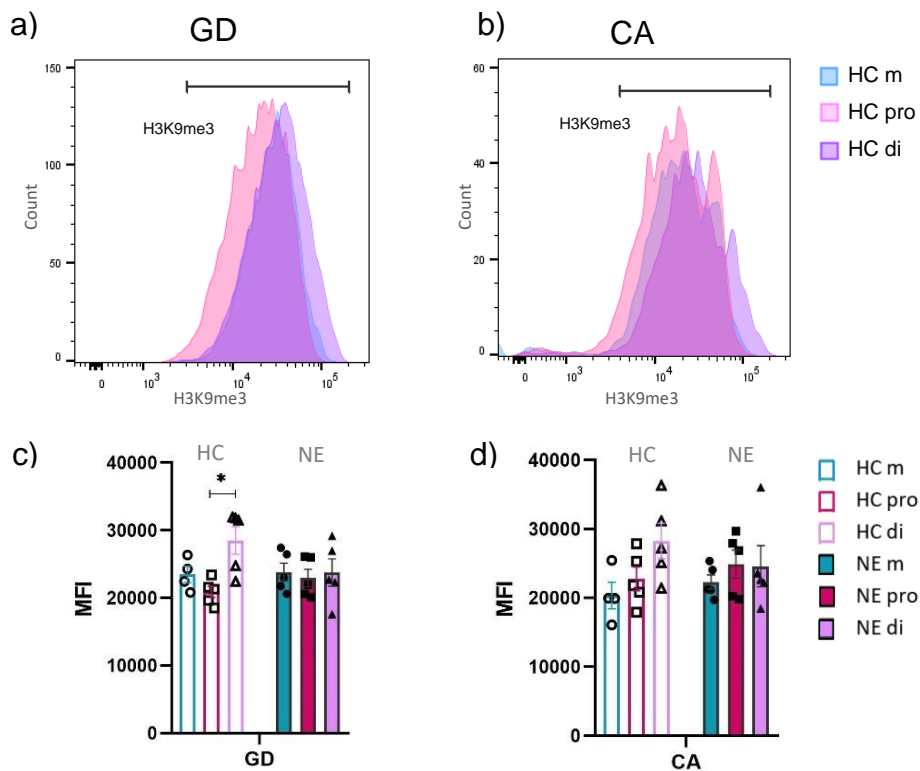


Figura 11. Histogramas representativos que muestran el sobrelape de poblaciones H3K9me3+ en GD (a) y CA (b) entre los diferentes grupos estudiados. Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de la tinción H3K9me3 en células Prox1+ (GD) (c) y Prox1- (CA) (d). La diferencia estadística entre grupos se determinó mediante ANOVA DV-Tukey (* $p < 0.05$).

significativos del factor sexo y tampoco de la estimulación en NE ($p=0.9$ y $p=0.08$, respectivamente, ANOVA DV, Fig. 11d).

6.5 Subpoblaciones de neuronas H3K9me3^{Low} y H3K9me3^{High} en GD y CA

La población H3K9me3⁺ en GD y CA también fue dividida en subpoblaciones de células con H3K9me3^{Low} y H3K9me3^{High}, aplicando el mismo valor de corte que en la población NeuN⁺ (59,000 a.u.) (Fig. 12 a, b).

En el GD, el sexo continua siendo la variable con efecto principal en la acumulación de la marca epigenética ($p=0.02$, ANOVA DV); las hembras-di tienen un menor porcentaje de neuronas H3K9me3^{Low} que las hembras-pro ($86.1\% \pm 2.6$ hembras-di vs $94.1\% \pm 1.2$ hembras-pro, $p=0.01$, *post hoc* de Tukey, Fig. 12c) mientras que, de manera correspondiente, la abundancia de la población H3K9me3^{High} es significativamente mayor en hembras-di respecto al grupo de hembras-pro (%H3K9me3: $13.5\% \pm 2.6$ hembras-di vs $4.7\% \pm 1.2$ hembras-pro, $p=0.01$, *post hoc* de Tukey). Una vez más, se observa que estas diferencias no se presentan en los animales expuestos al NE, sugiriendo que la estimulación en el NE reduce el número de neuronas H3K9me3^{High} en las hembras-di. La misma tendencia se observa en las neuronas de CA, es decir, las hembras-di HC tienen un alto porcentaje de H3K9me3^{High}, y esto no se observa en las hembras-di que se sometieron al NE (Fig.12f).

En general, los datos muestran que las diferencias entre sexos se observan principalmente en animales en estado basal (HC), tanto en neuronas del GD como de CA, en donde se distingue un mayor porcentaje de células H3K9me3^{High} en hembras-di (%H3K9me3^{High} GD: $13.5\% \pm 2.6$ hembras-di vs $4.7\% \pm 1.2$ hembras pro y $6.2\% \pm 0.9$ machos) (%H3K9me3^{High} CA: $17.1\% \pm 2.9$ hembras-di vs $6.9\% \pm 1.2$ hembras pro y $5.4\% \pm 1.6$ machos) (Fig. 12 d y f).

También, en GD (HC) y CA (NE) se observa una pequeña pero significativa disminución en el número de neuronas con H3K9me3^{Low} de las hembras-di (%H3K9me3: $76.5\% \pm 5.4$, hembras-di vs $90.7\% \pm 0.8$, machos, $p=0.04$, Tukey, Fig. 12 e).

A lo largo del estudio, las hembras-pro mostraron patrones similares a los machos, las principales diferencias son entre los dos grupos de hembras, lo que indica que la diferencia en los niveles hormonales que caracterizan cada etapa

del ciclo estral repercute en la acumulación de H3K9me3 en el hipocampo dorsal, algo nunca antes reportado.

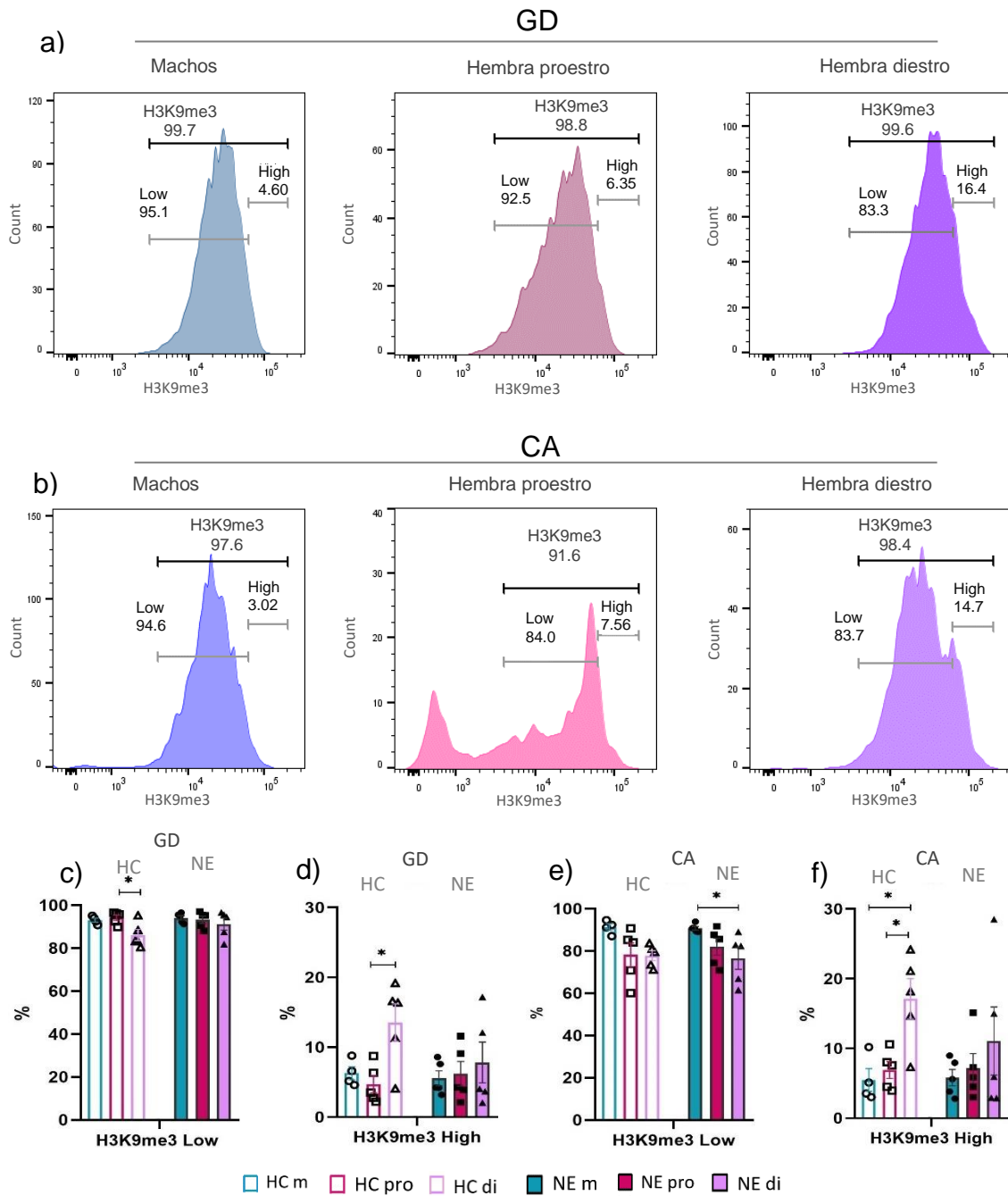


Figura 12. Histogramas representativos de la tinción H3K9me3 y subpoblaciones Low y High en células granulares de GD **(a)** y CA **(b)** de ratones macho y hembras en proestro y diestro. Porcentaje de células H3K9me3^{Low} **(c)** y H3K9me3^{High} **(d)** en GD. Porcentaje de células H3K9me3^{Low} **(e)** y H3K9me3^{High} **(f)** en CA. La diferencia estadística entre grupos se determinó mediante ANOVA de dos vías y prueba de comparaciones múltiple de Tukey (* $p < 0.05$).

6.6 Distancia recorrida durante la exploración en el NE

Finalmente, para validar que todos los sujetos expuestos al NE se desplazaron dentro de la arena, reunimos los registros de videograbación (Fig. 12 a) y comparamos los datos de la distancia recorrida durante 5 minutos (Fig.13 b).

En promedio, las distancias de recorrido (cm) fueron similares; no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de sujetos expuestos al NE ($1622\text{cm} \pm 86$ machos, $2041\text{cm} \pm 211$ hembras-pro, $1836\text{cm} \pm 139$ hembras-di, $p=0.2$, ANOVA de una vía).

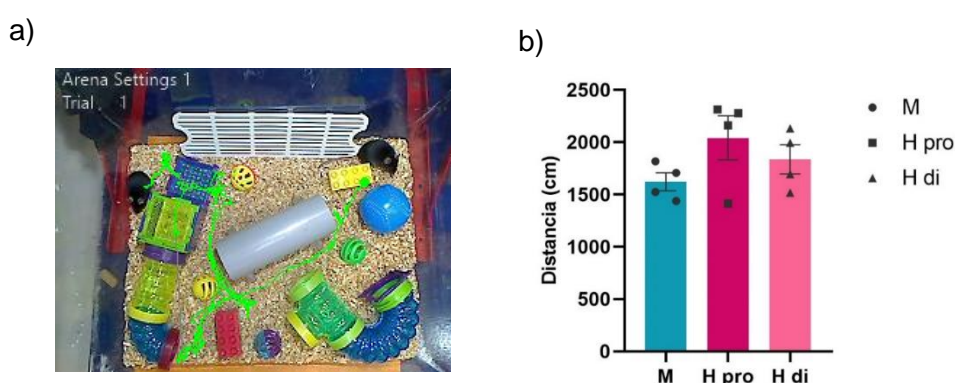


Figura 13. a) Fotografía representativa del análisis de la exploración en el ambiente novedoso. b) Distancia recorrida durante 5 min. en el ambiente novedoso, prueba ANOVA de una vía (n=4-6).

7. DISCUSIÓN

Previamente, se ha demostrado que el nivel de H3K9me3 aumenta en el hipocampo de ratones macho viejos, en comparación con ratones macho jóvenes (Snigdha et al., 2016; Kushwaha et al., 2020). Aquí, mostramos que la acumulación de H3K9me3 es heterogénea al comparar los diferentes tipos celulares y regiones del hipocampo dorsal. Además, los datos sugieren que la fluctuación natural de las hormonas durante las fases del ciclo estral influye en la acumulación de la marca H3K9me3 en el cerebro femenino.

Las modificaciones epigenéticas regulan la transcripción y juegan un papel crucial en el cerebro, con implicaciones en las funciones neuronales. Sin embargo, el estudio del panorama epigenético cerebral se complica por la especialización funcional de las diferentes regiones y tipos de células en el

cerebro. Las células del sistema nervioso se agrupan primordialmente en neuronas y glía; a diferencia de las neuronas, la glía no genera potenciales de acción, pero funciona como soporte estructural, asimismo, mantiene y regula la homeostasis (Noah et al., 2016). En este trabajo utilizamos una aproximación de frontera para analizar de manera diferencial la marca epigenética H3K9me3 en subtipos de neuronas y en glía del hipocampo dorsal.

Nuestros resultados muestran que H3K9me3, una marca epigenética involucrada en la formación y mantenimiento de heterocromatina (caracterizada por una baja o nula tasa de transcripción), se expresa diferencialmente en células neuronales y gliales; la acumulación de H3K9me3 es predominante en las neuronas, las cuales funcionan como mediadoras de los procesos de aprendizaje y memoria espacial. De manera consistente con nuestros hallazgos, está reportado (Lee et al., 2020) que, en la corteza temporal de pacientes con EA, la marca H3K9me3 se expresa preferentemente en neuronas, en comparación con la glía. En conjunto, estos datos sugieren que en el hipocampo dorsal, la actividad de las neuronas puede ser perturbada por la acumulación de H3K9me3. Dichas alteraciones podrían ser mediadas por cambios en los patrones de expresión de IEGs necesarios en el proceso de memoria y plasticidad sináptica en el hipocampo. Por ejemplo, Arc, EGR1, Homer1 y Narp, en los cuales, se han reportado (Kushwaha et. Al., 2020) altos niveles de H3K9me3 en la región promotora, lo que correlaciona con el deterioro de la memoria en ratones viejos.

El cerebro femenino ha sido poco estudiado en el campo de la neuroepigenética, una de las razones principales para excluir a las hembras de los estudios es que son intrínsecamente más variables que los machos (Kundakovic, 2017). A lo largo de nuestra investigación, comparamos un grupo de ratones macho y dos de hembras, tomando en cuenta la etapa del ciclo estral, que tiene un perfil hormonal similar al del ciclo menstrual humano. Nuestros resultados muestran que el grupo de hembras en diestro posee un conjunto de neuronas con alta MFI para H3K9me3, que interpretamos como una mayor acumulación de H3K9me3. Después de un análisis de subpoblaciones, estas neuronas fueron denominadas H3K9me3^{High}; las cuales mantuvieron una tendencia al alza en las hembras-di, por encima del grupo de machos y hembras-pro. Notamos que dicho aumento se mantiene en las células granulares del GD y también en aquellas que

consideramos parte de CA. El E2 endógeno y exógeno aumenta la densidad de espinas dendríticas en CA1, la neurogénesis, la plasticidad sináptica y la expresión génica, lo cual, se relaciona con la mejora de la memoria espacial dependiente de hipocampo durante el proestro (Fester y Rune, 2015). Nuestros resultados sugieren fuertemente que durante el diestro, cuando el nivel de E2 desciende, hay mayor probabilidad de acumular marca epigenética represiva; sospechamos el aumento de los niveles de E2 durante el proestro podría funcionar como agente neuroprotector. Anteriormente, se había reportado que la edad es el factor principal que contribuye a la acumulación de H3K9me3 en el hipocampo (Snigdha et al., 2016; Kushwaha et al., 2020), aquí mostramos que la etapa del ciclo estral también es un elemento por considerar.

Los efectos del ciclo estral en la fisiología del hipocampo dependen de la unión de las hormonas ováricas a sus receptores, y se sabe que en el hipocampo se expresa gran variedad de receptores a hormonas esteroideas, tal como los receptores de estrógeno alfa ($ER\alpha$) y beta ($ER\beta$) e isoformas del receptor de progesterona (PRA y PRB). Al unirse al estrógeno o la progesterona, estos receptores intracelulares actúan como factores de transcripción, regulando la expresión de genes (Rocks y Kundakovic, 2022). Interesantemente, el $ER\alpha$ forma un complejo con la enzima KDM1A para desmetilar a H3K9 en promotores específicos (Luca y Mathieu, 2014), esta regulación sugiere que el grupo de hembras en proestro que analizamos, tiene una menor cantidad de células hipocámpales con alta expresión de H3K9me3. Se sabe que los represores y cofactores reclutados por H3K9me3 para el silenciamiento de genes incluyen a la HDAC (Histona deacetilasa) y HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) (Lund y Van, 2004), y que la HDAC1 interactúa con el $ER\alpha$ suprimiendo su actividad transcripcional (Roper y Esteller, 2007), sin embargo, aún no está clara la relación entre H3K9me3 y las hormonas sexuales.

De acuerdo con los resultados obtenidos, es razonable considerar que las marcas epigenéticas, su acumulación y la organización de la cromatina sea susceptible a la señalización producida por las hormonas esteroideas sexuales. El grupo de Jaric y colaboradores (2019) reportaron una diferencia de 32.1% en las regiones de cromatina abierta entre las hembras en diestro y proestro, y que los genes regulados por la accesibilidad diferencial de la cromatina están involucrados en la regulación de la transmisión sináptica, el potencial de

membrana, organización de neuritas, etc. Lo que sugiere que las diferencias en la organización de la cromatina dependiente de la etapa del ciclo estral tienen un papel funcional importante en el cerebro, ya que las modificaciones epigenéticas se vinculan con cambios en la cromatina y a su vez, cambios en la expresión génica neuronal.

La estructura de la cromatina es dinámica y se ha propuesto que el epigenoma puede ser influenciado por factores ambientales. Esto reportado (Snigdha et al., 2016) que los niveles de H3K9me3 en ratones macho jóvenes no cambian en respuesta a la inhibición farmacológica de la SUV39H1 (enzima catalizadora de H3K9me3), mientras que, en ratones de edad avanzada, el ejercicio y la inhibición de SUV39H1 reducen significativamente el nivel de H3K9me3 en el promotor de BDNF, proteína fundamental para la memoria y plasticidad cerebral (Ionescu et al., 2021). En nuestros grupos de ratones macho y hembras jóvenes en proestro, la proporción de células H3K9me3+ no cambiaron después de 15 min. de exploración en un ambiente novedoso, sin embargo, el alto porcentaje de células H3K9me3^{High} presente en las hembras diestro, disminuyó, sugiriendo que la activación neuronal en respuesta a la estimulación en el NE modifica la estabilidad de H3K9me3 durante el diestro únicamente. Lo anterior nos lleva a considerar que la estimulación sensorial *per se*, contribuye a la disminución de la cantidad de neuronas que acumulan altos niveles de H3K9me3 durante el diestro, ya que el NE no se suma los efectos de E2 durante el proestro.

A partir de nuestros resultados, sugerimos que la marca epigenética represiva H3K9me3 es modulable en respuesta a la inducción de activación neuronal y a las hormonas ováricas, sin embargo, aún queda por explorar directamente cómo ejercen efecto en la remodelación epigenética las diferentes hormonas, incluidos los estrógenos, la progesterona y las gonadotropinas.

8.CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En conclusión, descubrimos que en el hipocampo dorsal la acumulación de H3K9me3 predomina en las neuronas, y en mayor medida en hembras en diestro. Estos resultados proveen evidencias que podrían contribuir a mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con déficits de

memoria que son de alta prevalencia en mujeres durante la edad adulta, como en la enfermedad de Alzheimer.

Es importante mencionar que si hubiéramos elegido estudiar solo el sexo como variable, sin tener en cuenta la etapa del ciclo estral, probablemente no habríamos encontrado diferencias significativas a lo largo de nuestros análisis. Nuestro enfoque nos permitió dilucidar que el sexo y particularmente la etapa del ciclo estral influyen en la cantidad de neuronas del hipocampo dorsal que acumulan H3K9me3. Los datos sugieren que esta marca epigenética a nivel del hipocampo dorsal es particularmente sensible a las acciones activacionales de las hormonas sexuales. Dado que las modificaciones epigenéticas se vinculan con cambios en la expresión de genes involucrados en procesos moleculares que regulan la actividad neuronal, es necesario ampliar los estudios en el campo de la neuroepigenética específica del sexo.

REFERENCIAS

- Alaniz, G. F., Durán, P., Quijano, O., Salas, V., Cisneros, H., Guzmán, D. (2022). Memoria: Revisión conceptual. *Boletín Científico De La Escuela Superior Atotonilco De Tula*, 9(17), 45-52. <https://doi.org/10.29057/esat.v9i17.8156>
- Amantea, D., Rossella, R., Giacinto, B., Maria, T., Corasaniti. (2005). From clinical evidence to molecular mechanisms underlying neuroprotection afforded by estrogens. *Pharmacological Research*, 52(2), 119-132. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.03.002>
- Andersen, P., Richard, M., David, A., Tim, B., John, O. (2007). Hippocampal Neuroanatomy. *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Andreano, J. M., Cahill, L., (2009). Sex influences on the neurobiology of learning and memory. *Learn Mem*, 16(4). doi:10.1101/lm.918309
- Asok, A., Leroy, F., Rayman, J. B., Kandel, E. R. (2019). Molecular Mechanisms of the Memory Trace. *Trends in neurosciences*, 42(1), 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.10.005>
- Bear, M. F., Barry W., Connors, Michael, A., Paradiso. (2016), Neuroscience: Exploring the Brain. Philadelphia: Wolters Kluwer.
- Bettis T., Jacobs L. (2009). Sex-specific strategies in spatial orientation in C57BL/6J mice. *Behavioural Processes*, 82(3), 249-255.
- Billig, J. A., Meher, L., William, S., Timothy, D., Griffiths. (2022). The hearing hippocampus. *Progress in Neurobiology*, 218(102326). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2022.102326>
- Bliss, TV., Lømo, T. (1973). Long- lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol* 232, 331–356.
- Camacho, U., Bastida, C., Agatha, Zarate, Sandra, G. (2020). Estudio anatómico del hipocampo como una de las regiones de neurogénesis más relevante. *Revista Científica Ciencia Médica*, 23(2), 221-230.
- Chen, D., Parker, T.M., Bhat-Nakshatri, P. (2021). Nonlinear relationship between chromatin accessibility and estradiol-regulated gene expression. *Oncogene* 40, 1332–1346.
- Chen, Q. N., Ding, X. L., Guo, X. X., Zhou, G., Guan, J. S. (2022). Suv39h1 regulates memory stability by inhibiting the expression of Shank1 in hippocampal newborn neurons. *European Journal of Neuroscience*, 55(6), 1424– 1441. <https://doi.org/10.1111/ejn.15626>

Creighton, Samantha, D., Gilda, S., Anas, R., Iva, B. Z. (2020). Epigenetic Mechanisms of Learning and Memory: Implications for Aging. *International Journal of Molecular Sciences* 21(18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186918>

Díaz, J. L. (2009). Persona, mente y memoria. *Salud mental*, 32(6), 513-526.

Fanselow, M. S., Dong, H.-W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65, 7-19.

Fester, L., Rune, G. (2015). Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Research* 1621, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.033>.

Gegenhuber, B., Wu, M.V., Bronstein, R. (2022). Gene regulation by gonadal hormone receptors underlies brain sex differences. *Nature* 606, 153-159. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04686-1>

Giedd, J. N., Vaituzis, A. C., Hamburger, S. D., Lange, N., Rajapakse, J. C. (1996). Quantitative MRI of the temporal lobe, amygdala, and hippocampus in normal human development: ages 4–18 years. *J Comp Neurol* 366, 223–230.

Gusel Nikova, V. V., Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42-7.

Hebb, D. O. (1949). *The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*. John Wiley, New York.

Idoia, B. L., Blanca, A., Amaya, U. C., Javier, S., Janire, V. U., Miren, R., Alberto, L., María, V. Z., Carolina, C., Iván, M. L., Maite, M. (2020). Early epigenetic changes of Alzheimer's disease in the human hippocampus. *Epigenetics*, 15(10), 1083-1092. DOI:10.1080/15592294.2020.1748917

Ionescu, T. A., Butler, C. W., Berchtold, N. C., Matheos, D. P., Wood, M. A., Cotman, C. W. (2021). Exercise Reduces H3K9me3 and Regulates Brain Derived Neurotrophic Factor and GABRA2 in an Age Dependent Manner. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13. DOI:10.3389/fnagi.2021.798297

Jaeger, B. N., Linker, S. B., Parylak, S. L., Barron, J. J., Gallina, I. S., Saavedra, C. D., Fitzpatrick, C., Lim, C. K., Schafer, S. T., Lacar, B., Jessberger, S., Gage, F. (2018). A novel environment-evoked transcriptional signature predicts reactivity in single dentate granule neurons. *Nat Commun* 9(3084). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05418-8>

Jäncke, L. (2018). Sex/gender differences in cognition, neurophysiology, and neuroanatomy. *F1000 Research*, 7(805).

Jaric, I., Rocks, D., Grealley, J. M., Suzuki, M., Kundakovic, M. (2019). Chromatin organization in the female mouse brain fluctuates across the oestrous cycle. *Nature communications*, 10(1), 2851. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10704-0>

Jordan, M., Bruce S. (2016). Sex in the brain: hormones and sex differences. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(4), 373-383. DOI:10.31887/DCNS.2016.18.4/jmarrocco

Jury, N., Abarzua, S., Diaz, I. (2020). Widespread loss of the silencing epigenetic mark H3K9me3 in astrocytes and neurons along with hippocampal-dependent cognitive impairment in C9orf72 BAC transgenic mice. *Clin Epigenet* 12(32). <https://doi.org/10.1186/s13148-020-0816-9>

Kandel, E. R. (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030–1038.

Kandel, E.R. (2009). The biology of memory: a forty-year perspective. *J. Neurosci.*, 29, 12748-12756.

Kovács, Tamás, Edina, S. M., István, M., Ábrahám. (2020). Estradiol-Induced Epigenetically Mediated Mechanisms and Regulation of Gene Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3177. <https://doi.org/10.3390/ijms21093177>

Kundakovic, M. (2017). Sex-Specific Epigenetics: Implications for Environmental Studies of Brain and Behavior. *Curr Envir Health*, 4, 385-391. <https://doi.org/10.1007/s40572-017-0172-x>

Kushwaha, A., Thakur, M.K. (2020). Increase in hippocampal histone H3K9me3 is negatively correlated with memory in old male mice. *Biogerontology* 21, 175–189. <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09850-1>

Lars, F., Gabriele M. Rune. (2015). Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Research*, 1621. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.033>

Lavado, A., Oliver, G. (2007). Prox1 expression patterns in the developing and adult murine brain. *Dev. Dyn.*, 236: 518-524. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21024>

Lee, M. Y., Lee, J., Hyeon, S. J. (2020). Epigenome signatures landscaped by histone H3K9me3 are associated with the synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 19. <https://doi.org/10.1111/accel.13153>

Levenson, J. M., O'Riordan, K. J., Brown, K. D., Trinh, M. A., Molfese, D. L., Sweatt, J. D. (2004). Regulation of Histone Acetylation during Memory Formation in the Hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*, 279(39).

Levenson, J., Sweatt, J. (2005). Epigenetic mechanisms in memory formation. *Nat Rev Neurosci* 6, 108–118. <https://doi.org/10.1038/nrn1604>

Linhoff, M. W., Garg, S. K., Mandel, G. (2015). A high-resolution imaging approach to investigate chromatin architecture in complex tissues. *Cell*, 163(1):246–55.

López, H. E., Solís, H. (2012). Epilepsia del lóbulo temporal y las neuronas hipocámpales de las áreas CA1 y CA3. *Revista de la Facultad de Medicina*, 55(5), 16-25.

- Loubon, O. C., Franco, C. J. (2010). Neurofisiología del aprendizaje y la memoria. Plasticidad Neuronal. *iMedPub Journals*, 6. doi:10.3823/048
- Loy, R., Gerlach, J. L., McEwen, B. S. (1988). Autoradiographic localization of oestradiol binding neurons in the hippocampal formation and the entorhinal cortex. *Dev. Brain Res.*, 39, 245-251.
- Luca, M., Mathieu, L. (2014). Chromatin and epigenetic determinants of estrogen receptor alpha (ESR1) signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 633-641. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.026>
- Luders, E., Narr, K. L., Thompson, P. M. (2004). Gender differences in cortical complexity. *Nat Neurosci*, 7(2), 799–800.
- Lund, A. H., Van, L. M. (2004) Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 18, 2315-2335. doi:10.1101/gad.1232504, pmid:15466484
- MacLean, P. D. (1952). Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 4(4), 407-418. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(52\)90073-4](https://doi.org/10.1016/0013-4694(52)90073-4)
- Maggi A., Susanna, L., Bettini, E., Mantero, G., Zucchi, I. (1989). Hippocampus: a target for estrogen action in mammalian brain. *Mol. Endocrinol.*, 3, 1165-1170.
- Mansuroglu, Z., Benhelli-Mokrani, H., Marcato, V. (2016). Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin. *Sci Rep* 6, 33047. <https://doi.org/10.1038/srep33047>
- Mayford, M., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R. (2012). Synapses and memory storage. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005751>
- Menéndez, P., Villarejo, P., Padilla, D., Menéndez, J. M., Rodríguez, M. (2012). Epigenética y cáncer colorrectal. *Cirugía Española*, 90(5), 277-283. <https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2011.11.006>
- Meléndez, D. M., Nordquist, R. E., Vanderschuren, L. J., Van der Staay, F. J. (2020). Spatial memory deficits after vincristine-induced lesions to the dorsal hippocampus. *PLoS ONE* 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231941>
- Morse, S. J., Anderson, A. B., Robin, L. D., Soller, I. J., Farah, D. L. (2015). Environmental Enrichment Reverses Histone Methylation Changes in the Aged Hippocampus and Restores Age-Related Memory Deficits. *Biology*, 4(2), 298-313. <https://doi.org/10.3390/biology4020298>
- Moser, M. B., Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8, 608–619.
- Mourad, R., Hsu, P. Y., Shen, C., Koneru, P., Lin, H. (2014). Estrogen Induces Global Reorganization of Chromatin Structure in Human Breast Cancer Cells. *PLoS ONE* 9(12).

- Murphy, D. G., DeCarli, C., McIntosh, A. R., Daly, E., Mentis, M. J. (1996). Sex differences in human brain morphometry and metabolism: an in vivo quantitative magnetic resonance imaging and positron emission tomography study on the effect of aging. *Arch Gen Psychiatry*, 53, 585–594.
- Noah, J. K., Van Baak, T. E., Baker, M. S., Laritsky, E., Coarfa, C., Waterland, R. A. (2016). CpG methylation differences between neurons and glia are highly conserved from mouse to human. *Human Molecular Genetics*, 25(2), 223–232. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv459>
- Papaleonidopoulos, V., Kouvaros, S., Papatheodoropoulos, C. (2018). Effects of endogenous and exogenous D1/D5 dopamine receptor activation on LTP in ventral and dorsal CA1 hippocampal synapses. *Synapse*, 72. doi:10.1002/syn.22033
- Papez, J. W. (1995). A proposed mechanism of emotion. 1937. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neuroscience*, 7(1), 103-112. <http://europepmc.org/abstract/med/7711480>
- Penfield, W., Milner, B. (1958). Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *AMA Arch. Neurol. Psychiatry* 79, 475–497.
- Persson, J., Spreng, R. N., Turner, G., Herlitz, A., Morell, A. (2014). Sex differences in volume and structural covariance of the anterior and posterior hippocampus. *Neuroimage*, 9, 215–225.
- Pothuizen, H. Zhang, A. L., Jongen, R., Feldon, B. (2004). Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur. J. Neurosci.*, 19, 705-712.
- Ramirez, A. V., Vazdarjanova, A., Mikhael, D., Rosi, S., Worley, P. F., Barnes, C. A. (2005). Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: Evidence for selective, network-specific reactivation. *Journal of Neuroscience*, 25(7), 1761-1768.
- Ramirez, A. V., Angulo, P. A., Chawla, M. K., Barnes, C. A., Rosi, S. (2013). Sustained transcription of the immediate early gene Arc in the dentate gyrus after spatial exploration. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(4), 1631–1639. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2916-12.2013>
- Rocks, D., Kundakovic, M. (2022). Hippocampus-based behavioral, structural, and molecular dynamics across the estrous cycle. *J Neuroendocrinol*, 13216. doi:10.1111/jne.13216
- Ropero, S., Esteller, M. (2007). The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol*, 1(1), 19-25. doi: 10.1016/j.molonc.2007.01.001.
- Ryu, H., Lee, J., Hagerty, S. W., Soh, B. Y., McAlpin, S. E., Cormier, K. A. (2006). ESET/SETDB1 gene expression and histone H3 (K9) trimethylation in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(50), 19176–81.

Scoville, W. B., Milner, B. (1957), Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 20.

Snigdha, S., Prieto, G., Petrosyan, A., Loertscher, B. M., Dieskau, A., Overman, L., Cotman, C. (2016). H3K9me3 Inhibition Improves Memory, Promotes Spine Formation, and Increases BDNF Levels in the Aged Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 36(12), 3611-3622. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2693-15.2016

Stevens, J. S., Hamann, S. (2012). Sex differences in brain activation to emotional stimuli: a meta-analysis of neuroimaging studies. *Neuropsychologia*, 50(7), 1578–93.

Strange, B., Witter, M., Lein, E. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci.*, 15, 655–669. <https://doi.org/10.1038/nrn3785>

Streifer, M., Gore, A. C. (2021). Chapter Three - Epigenetics, estrogenic endocrine-disrupting chemicals (EDCs), and the brain. *Advances in Pharmacology*, Academic Press.

Tapia, J., Rocío, C., Miranda, A. M. (2016). El reloj circadiano ovárico: un segundero en la fisiología de la reproducción. *Entre ciencias: Diálogos en la Sociedad del Conocimiento*, 4(10),147-163.

Thomas, A. X., Brooks, A. R. (2013). Neural Circuit Development and Function in the Brain. *Academic Press*, 709-730. DOI: [//doi.org/10.1016/B978-0-12-397267-5.00042-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397267-5.00042-X)

Thompson, C. L. (2008). Genomic anatomy of the hippocampus. *Neuron*, 60, 1010–1021.

Tong, L., Butler, C., Tucker, A., Prieto, G., Cotman, C. (2019). P2-179: Modulation of histone H3 lysine 9 trimethylation regulates synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Alzheimer's & Dementia*, 15(7), 645-P645. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.06.2586>

Trompoukis, G., Papatheodoropoulos, C. (2020). Dorsal-Ventral Differences in Modulation of Synaptic Transmission in the Hippocampus. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12, 1663-3563. DOI:10.3389/fnsyn.2020.00024

Trova S., Bovetti S., Bonzano S., De Marchis S., Peretto P. (2021). Sex Steroids and the Shaping of the Peripubertal Brain: The Sexual-Dimorphic Set-Up of Adult Neurogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15):7984. <https://doi.org/10.3390/ijms22157984>

Werner, C. T., Gancarz, A. M., Dietz, D. M. (2019). Chapter 10 - Mechanisms Regulating Compulsive Drug Behaviors, Neural Mechanisms of Addiction. *Academic Press*, 92, 73-99. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2021.03.006>

Zhang, T. Y., Keown, C. L., Wen, X. (2018). Environmental enrichment increases transcriptional and epigenetic differentiation between mouse dorsal and ventral dentate gyrus. *Nat Commun* 9, 298. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02748-x>

Zhang, W., Qu, J., Liu, G. H., Belmonte, J. C. (2020). The ageing epigenome and its rejuvenation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 137–150.

Zlotnik, G., Vansintjan, A. (2019). Memory: An Extended Definition. *Frontiers in Psychology*, 10. DOI:10.3389/fpsyg.2019.02523

Zocher, S., Overall, R. W., Lesche, M. (2021). Environmental enrichment preserves a young DNA methylation landscape in the aged mouse hippocampus. *Nat Commun*, 12, 3892. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23993-1>