

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PAPEL DEL MARCADOR EPIGENÉTICO H3K9me3
EN LA ACTIVACIÓN DE LAS NEURONAS DEL GIRO
DENTADO”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

CITLALI ANAHI SUÁREZ RANGEL

DIRIGIDA POR

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE

CO-DIRIGIDA POR

Dr. GILBERTO ALEPH PRIETO MORENO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PAPEL DEL MARCADOR EPIGENÉTICO H3K9me3
EN LA ACTIVACIÓN DE LAS NEURONAS DEL GIRO
DENTADO”**

**TESIS INDIVIDUAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

CITLALI ANAHI SUÁREZ RANGEL

DIRIGIDA POR

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE

CO-DIRIGIDA POR

Dr. GILBERTO ALEPH PRIETO MORENO

SINODALES

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE

DIRECTOR

Dr. GILBERTO ALEPH PRIETO MORENO

CODIRECTOR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SINODAL

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODAL

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Aleph por su conocimiento, dedicación y paciencia el desarrollo de mi tesis. Por brindarme un espacio en donde pudiera explotar y desarrollar nuevas habilidades, y por darme la confianza de elaborar mis experimentos de manera autónoma, generando así seguridad en mis propios conocimientos y habilidades.

A la bióloga María Eugenia Ramos por transmitirme todo su saber e instruirme en cada etapa de mi trabajo. Gracias por todos los consejos desde el primer día, por las enseñanzas y apoyo dentro y fuera del laboratorio. Gracias por tu cariño y amistad.

Agradezco también a la M. en C. Alma Delia, a la Dra. Laura Berumen y a la Dra. Angelina Rodríguez por sus revisiones y correcciones en el texto.

A los buenos amigos y excelentes compañeros que hice durante esta etapa; Aris, Daniel, Moni y Fer. Gracias por compartir su conocimiento, por responder mis dudas, por aconsejarme y sobre todo por hacer de este proceso más ligero y divertido. Aprendimos y crecimos juntos, los quiero.

También quiero agradecer a mis dos grandes amigos QFB's Rodrigo y Pau, a mis amigas químicas Ale y Paloma, que durante toda la licenciatura fueron un gran soporte para culminar mis estudios, gracias por todas las aventuras.

En general, gracias a todos aquellos que formaron parte de este proceso, cada granito aportado fue importante. Gracias por estar (o haber estado) en el momento indicado.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento del proyecto con clave IA203421.

A mis padres, de no ser por su apoyo incondicional no lo habría logrado.
Gracias por enseñarme a dar siempre lo mejor de mí,
por no dejarme caer nunca, por los regaños y las lecciones,
y ver siempre por mi bienestar.

A mis hermanos Toño y Hugo,
que siempre me incitaron e inspiraron a salir de mi zona de confort
y nunca dudaron de mis
capacidades(No lo decían, pero sé que
lo pensaban).

Esto es de ustedes y para ustedes.
Los amo.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Memoria	1
1.1.1 Clasificación de los diferentes sistemas de memoria	3
1.1.2 Deterioro de la memoria	4
1.2 Hipocampo y memoria	5
1.2.1 Anatomía básica del hipocampo	6
1.2.2 Giro dentado, estructura esencial para la memoria	7
1.3 Genes de Expresión Inmediata como marcadores de activación neuronal.	8
1.3.1 Activación neuronal	8
1.3.2 IEG en memoria	10
1.3.3 Arc	11
1.4 Mecanismos epigenéticos que modulan la activación neuronal	12
1.4.1 Epigenética	12
1.4.2 Metilación en la histona 3	13
1.4.3 H3K9me3 en la memoria y el envejecimiento	14
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. METODOLOGÍA	19

4.1 Material Biológico	19
4.2 Métodos	20
4.2.1 Ambiente Novedoso (AN) como prueba para activar neuronas	20
4.2.2 Cirugía y perfusión intraventricular	20
4.2.3 Extracción de cerebro	21
4.2.4 Cortes coronales del cerebro	22
4.2.5 Titulación de anticuerpos	22
4.2.6 Inmunohistoquímica	23
4.2.7 Microscopía Confocal	24
4.2.8 Linear Unmixing	24
4.2.9 Medición de intensidad de célula única	24
4.2.10 Análisis Estadístico	25
4.3 Diseño Experimental	25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
5.1 Titulación de anticuerpos	27
5.2 El ambiente novedoso (AN) induce activación neuronal en el GD.	30
5.3 Las neuronas de la capa infrapiramidal del GD expresan niveles más altos de H3K9me3 en comparación con las neuronas de la capa suprapiramidal.	32
5.4 El AN induce la activación de un número mayor de neuronas en la capa SP en comparación con la capa IP del GD.	33
5.5 Las neuronas infrapiramidales activadas por el AN contienen niveles bajos de la marca H3K9me3	35
5.6 Los niveles de H3K9me3 no se modifican después de 1hr de exposición a un AN.	37
6. CONCLUSIÓN	40
7. REFERENCIAS	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Concentraciones empleados para la titulación de anticuerpos secundarios.	23
2	Clasificación de las neuronas Arc positivas.	25
3	Concentraciones óptimas de los anticuerpos primarios y secundarios en las que obtiene la mejor relación S/R.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Procesos involucrados en el almacenamiento de la memoria.	2
2	Clasificación de los diferentes sistemas de la memoria.	3
3	Corte sagital del hipocampo con proyecciones de la corteza entorrinal al hipocampo.	7
4	Principales pasos moleculares implicados en la formación de la memoria a largo plazo.	10
5	Metilación del residuo N-terminal de la lisina mediante la donación de los grupos metilo por la S-adenosil-metionina.	13
6	Ambiente Novedoso usado para la activación neuronal.	20
7	Diseño Experimental	26
8	Titulación de anticuerpos secundarios.	29
9	Activación neuronal en el giro dentado por estimulación en ambiente novedoso.	31
10	En el GD las neuronas de la capa infrapiramidal expresan niveles más altos de H3K9me3 en comparación con las neuronas de la capa suprapiramidal.	33
11	El AN induce la activación de una mayor proporción de neuronas medianamente activadas en la capa SP en comparación con la capa IP.	34
12	Las neuronas infrapiramidales activadas por el AN contienen niveles bajos de la marca H3K9me3.	37
13	La exposición al AN no modifica <i>per se</i> los niveles de H3K9me3. Niveles de H3K9me3 en las capas SP e IP del GD en ratones HC y AN.	38

RESUMEN

El giro dentado es una región del hipocampo fundamental para el procesamiento y almacenamiento de la memoria. La consolidación de la memoria y su posterior evocación dependen de la activación de múltiples cascadas de señalización en las neuronas, lo que lleva a modificaciones postraduccionales, expresión génica y síntesis de nuevas proteínas. Dado que el control de la expresión génica responde principalmente a mecanismos epigenéticos, investigaciones recientes se centran en entender el papel de la metilación de histonas en la regulación de la estructura de la cromatina y su impacto en el aprendizaje y la memoria. En particular, se ha reportado que un aumento en los niveles de la marca epigenética H3K9me3 (trimetilación de la lisina-9 de la histona-3) en el hipocampo tiene un papel esencial en el deterioro de la memoria en ratones viejos. Datos recientes de nuestro laboratorio indican que el aumento de H3K9me3 en los ratones viejos ocurre principalmente en la región dorsal del giro dentado. De ahí que el objetivo de este trabajo fue evaluar mediante inmunohistoquímica la influencia que tiene la marca H3K9me3 en la activación neuronal en el giro dentado dorsal en ratones que han sido estimulados por un ambiente novedoso. Primero, y de manera sorprendente, encontramos que los niveles de H3K9me3 no son homogéneos en el giro dentado: la capa infrapiramidal expresa mayores niveles que la capa la suprapiramidal, y esta diferencia coincide con un mayor porcentaje de neuronas activadas en la capa suprapiramidal, lo que sugiere un papel inhibitor de H3K9me3 en la activación neuronal. De acuerdo con esta idea, el análisis a nivel de célula única mostró que las neuronas activadas de la capa infrapiramidal contienen una menor cantidad de H3K9me3, en comparación con las neuronas no activadas. En conjunto, nuestros datos apoyan la hipótesis de que las modificaciones epigenéticas -en particular la H3K9me3- modulan la activación neuronal en el giro dentado y, en consecuencia, tienen un impacto en los procesos de aprendizaje y memoria.

1. ANTECEDENTES

1.1 Memoria

Los recuerdos que formamos sobre nosotros mismos y las interacciones que tenemos con el medio ambiente son fundamentales. Para que estos recuerdos puedan ser evocados y sean útiles para otros procesos cognitivos es necesario que primero sean codificados con un rastro permanente que les permita mantenerse y por último consolidarse a lo largo del tiempo. La memoria es la capacidad de almacenar, recordar y recuperar eventos. Fundamental para la supervivencia de numerosos organismos, la memoria permite el mantenimiento de comportamientos que resultan de nuevos aprendizajes y experiencias pasadas. En el proceso de la memoria, el almacenamiento de la información se lleva a cabo en varias etapas: primero se codifica la información en sistemas de circuitos sinápticos y neuronales, seguido del almacenamiento a corto plazo, y por último la consolidación de una memoria a largo plazo. Una vez que la memoria ha sido consolidada esta puede ser recuperada (evocada) rápidamente cuando sea necesaria (Figura 1) (Brem y col., 2013).

Después de la adquisición inicial, la memoria se transforma de un estado transitorio a un estado estable durante la consolidación de la memoria. Durante la codificación de la memoria, el cerebro combina cantidades masivas de información sensorial y las une en un evento cohesivo, que contiene información de lo que ocurrió, de dónde y cuándo, en una forma que está disponible libremente para recordar en un momento posterior si es que esta memoria se guarda a largo plazo. Los cambios estructurales a nivel celular y de circuito apoyan el almacenamiento de la memoria a largo plazo e involucran diferentes regiones y redes del cerebro. De acuerdo con modelos actuales, la consolidación de la memoria requiere tiempo, ya que depende de la activación de cascadas de señalización intracelular, que resultan en modificaciones postraduccionales, modulación de expresión génica y síntesis de nuevas proteínas, esto último es fundamental para los cambios estructurales en las neuronas y para las modificaciones de la eficacia sináptica que finalmente estabilizan los circuitos neuronales que subyacen los recuerdos (Tonegawa y col., 2018).

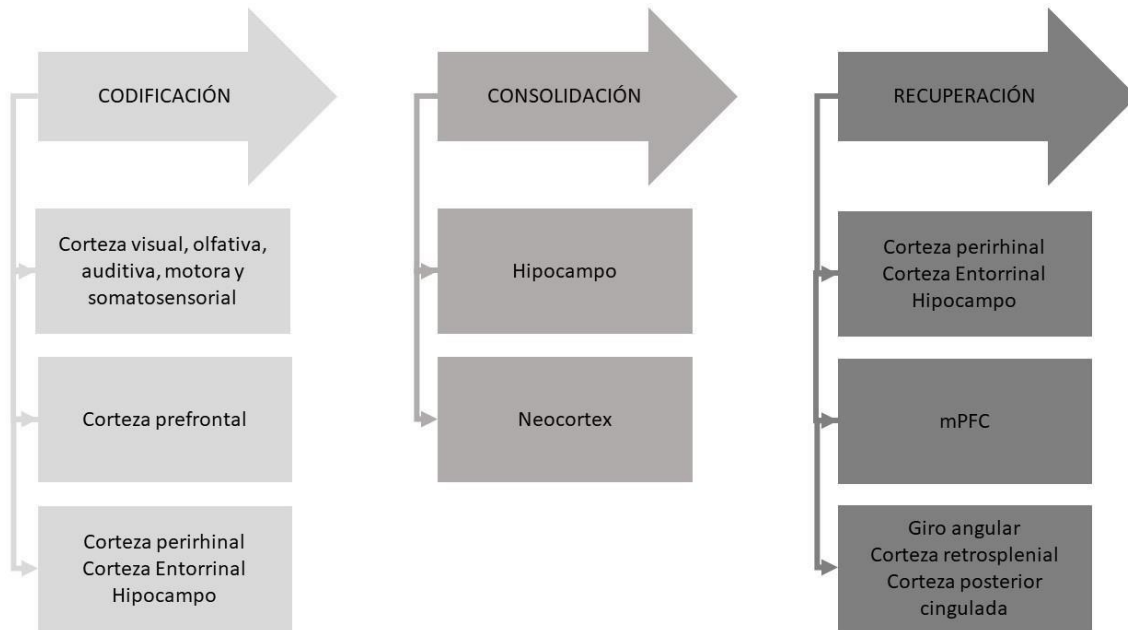


Figura 1. Procesos involucrados en el almacenamiento de la memoria (Asok y col., 2019).

El estudio de los códigos moleculares de la memoria comenzó en la década de 1940 con la teoría de Donal Hebb, la cual indica que la memoria de largo plazo requiere la activación y el fortalecimiento concomitantes de las neuronas presinápticas y postsinápticas. Posteriormente, Milner en 1950 junto con sus colaboradores, afirmaron que el hipocampo es fundamental para la formación de memoria episódica de largo plazo. Por último, Bliss y Lomo en 1970 descubren la potenciación a largo plazo, y cómo ésta es necesaria para la memoria de largo plazo. Aunque los mecanismos aún no son completamente entendidos, el consenso entre la comunidad científica es que la consolidación de una memoria de largo plazo necesita la síntesis de nuevas proteínas (Asok y col., 2019).

En el hipocampo, una experiencia vivida se codifica a través de la formación de nuevas conexiones sinápticas y la reorganización de las existentes, esto se conoce como plasticidad sináptica. En los circuitos activados durante una experiencia, el glutamato es liberado de la neurona presináptica a la postsináptica, lo cual provoca despolarización en esta última, la posterior entrada de iones de calcio y la activación de varias vías de señalización de quinasas, las cuales pueden translocarse al núcleo

para activar genes de expresión inmediata (IEG, immediate early genes) (Figura 2). Algunos IEG son factores de transcripción que promueven la expresión génica y la síntesis de proteína requerida para el crecimiento sináptico. Todo este proceso da como resultado el fortalecimiento de la sinapsis y el mantenimiento de la potenciación de largo plazo. Este proceso inicial genera los circuitos necesarios para almacenar y recuperar la información en el futuro (Bruehl-Jungerman y col., 2007).

1.1.1 Clasificación de los diferentes sistemas de memoria

Se ha demostrado que no tenemos una memoria unitaria, ésta funciona a través de diferentes impulsos e interacciones lo que da lugar a diferentes tipos de memoria (Dudai y col., 2015). De manera general, la memoria puede dividirse en memoria a corto plazo, memoria a largo plazo y memoria de trabajo (Figura 2). La primera se refiere al mantenimiento pasivo de la información en la mente durante un periodo de tiempo corto. Por el contrario, la memoria a largo plazo mantiene la información durante un tiempo más prolongado. Por último, la memoria de trabajo se basa en desarrollar habilidades a través de la ejecución y repetición de una tarea de forma inconsciente o no intencionada (Tromp, 2015).

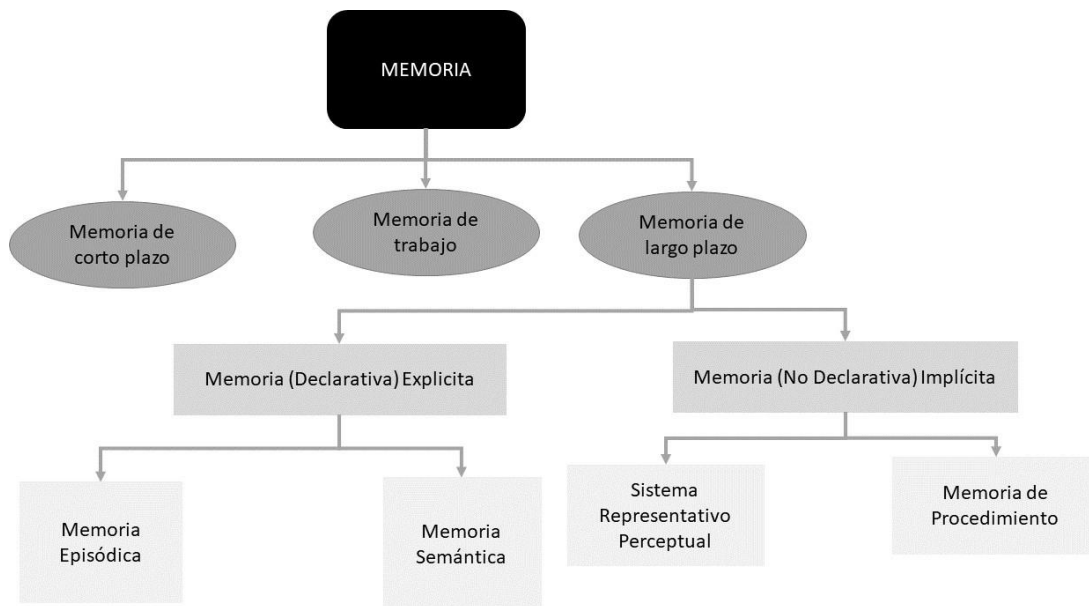


Figura 2. Clasificación de los diferentes sistemas de la memoria (Tromp, 2015).

La memoria a largo plazo tiene dos clases: la memoria explícita o declarativa y la memoria implícita o no declarativa. La memoria declarativa se subdivide a su vez en memoria semántica y memoria episódica. La primera está compuesta por hechos y conocimientos generales, mientras que la memoria episódica está relacionada con información sobre experiencias personales y contextos temporales y espaciales de esas experiencias (Tromp, 2015).

1.1.2 Deterioro de la memoria

El impacto de la edad en el rendimiento cognitivo representa una importante preocupación social y de calidad de vida, especialmente dada nuestra esperanza de vida prolongada. Si bien a menudo se discute en el contexto de la enfermedad, son comunes las disminuciones en la función ejecutiva, así como las disminuciones en el aprendizaje y la memoria en personas mayores sanas (Sen y col., 2016).

El deterioro cognitivo se define como una disminución en el rendimiento de al menos una de las capacidades mentales o intelectuales, que incluyen memoria, orientación, pensamiento abstracto, lenguaje, capacidad de juicio y razonamiento, capacidad para el cálculo y la habilidad constructiva, capacidad de aprendizaje y habilidad visual-espacial. El deterioro cognitivo está asociado con diversos factores como el envejecimiento, la genética o las enfermedades neurodegenerativas (Dahan, 2020).

Normalmente el envejecimiento se acompaña de un grado ligero de disminución de las capacidades cognitivas. En general, la memoria es menos eficiente en personas de edad avanzada, en comparación con personas más jóvenes. Las personas mayores exhiben cambios en la calidad de sus recuerdos y presentan también dificultades para recordar (Clarys y col., 2002). Sin embargo, no todas las formas de la memoria se ven afectadas por igual, sino que muestran vulnerabilidades diferenciales a los efectos del envejecimiento. Algunos sistemas como la memoria de procedimiento y de corto plazo, no parecen afectarse por el envejecimiento normal; del mismo modo, la memoria semántica se ve poco alterada por el envejecimiento. Por el contrario, el envejecimiento se acompaña de una disminución significativa de la memoria episódica, la cual es uno de los primeros sistemas en

fallar con la edad y, de manera similar ocurre incluso en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) (Isingrini y Tacconat, 2008).

1.2 Hipocampo y memoria

El hipocampo es una región del cerebro clave para la formación de recuerdos episódicos, la navegación espacial, la emoción y la representación de una amplia gama de otros estados internos y externos (Lisman y col., 2017). Existe una extensa evidencia de la importancia del hipocampo en la memoria episódica en humanos y roedores (Hainmueller y Bartos, 2020). De los primeros en ser estudiados fue el caso de Henry Molaison (Caso H.M.), un paciente que sufría de epilepsia intratable y se sometió a una cirugía experimental que implicaba la extirpación bilateral del lóbulo temporal medial, que incluyó gran parte de ambos hipocampos. La intervención dejó a H.M. con una incapacidad para formar nuevos recuerdos episódicos (amnesia anterógrada), junto con una pérdida parcial de antiguos recuerdos (amnesia retrograda) (Opitz, 2014). El caso H.M. es paradigmático, y estudios posteriores -principalmente en modelos animales- han confirmado que el hipocampo es esencial para la formación de nuevos recuerdos episódicos y también su papel en el almacenamiento de información a largo plazo. Los estudios en animales han mostrado que las lesiones controladas, la inactivación farmacológica o la deficiencia de genes involucrados en plasticidad sináptica (ratones knockout) limitados al hipocampo afectan negativamente el aprendizaje o la memoria espacial. También, registros electrofisiológicos y estudios de imagen molecular en animales, así como estudios de imágenes por resonancia magnética en humanos, han proporcionado evidencia correlativa de que el aprendizaje y la memoria episódica implican actividad en el hipocampo (Neves y col., 2008).

También se ha investigado el procesamiento en las diferentes regiones a lo largo del hipocampo, y existe una amplia evidencia de que, desde el punto de vista funcional, el hipocampo dorsal es fundamental para el aprendizaje y el rendimiento de la memoria, mientras que el hipocampo ventral está involucrado en la ansiedad y la inhibición del comportamiento (Strange y col., 2014).

1.2.1 Anatomía básica del hipocampo

El hipocampo es una estructura alargada ubicada dentro del lóbulo temporal medial, en donde interactúa con otras estructuras anatómicas, como la corteza entorrinal que, con sus proyecciones más fuertes hacia el giro dentado, CA3 y CA1 proporciona la principal vía de entrada cortical al hipocampo (Knierim, 2015). El circuito del hipocampo es tradicionalmente conocido como “Bucle trisináptico”, concepto que ha servido por mucho tiempo para explicar la conectividad neuronal; sin embargo, la conectividad hipocampal es más compleja, ya que existen múltiples circuitos de procesamiento paralelo y de retroalimentación dentro del hipocampo y en sus núcleos de entrada.

El hipocampo tiene entrada cortical de dos zonas diferentes de la corteza entorrinal. La corteza entorrinal medial a través de las capas II, III y V inerva hacia el giro dentado, CA3 y CA1. Por otro lado, las capas II y III de la corteza entorrinal lateral proyectan a CA3. Ambas regiones de la corteza entorrinal reciben retroalimentación del hipocampo, del mismo modo ocurre dentro de la propia corteza entorrinal, que contiene conexiones neuronales entre sus diferentes capas (Figura 3). Esto permite que la salida de información del hipocampo actúe directamente sobre la misma vía de entrada de información hacia este núcleo cerebral (Knierim, 2015; Neves, y col., 2008; Amaral, y col., 2007)

En cuanto al eje longitudinal del hipocampo, desde 1998 Moser y Moser sugirieron que el hipocampo no funciona como una estructura única, por lo que propusieron que este debía ser dividido en porción dorsal (dirigido hacia el polo septal) y la porción ventral (dirigida hacia el polo temporal), indicando así que tenían roles diferentes. Esta diferenciación se hizo con base en algunas afirmaciones: 1) Anatómicamente las conexiones de entrada y salida entre ambas regiones son diferentes (Fanselow y Dong, 2010), 2) La memoria espacial depende del hipocampo dorsal y no del hipocampo ventral y 3) Si existen lesiones en el hipocampo ventral pero no en el dorsal, hay una alteración en la respuesta a estrés y en el comportamiento emocional (Strange y col., 2014).

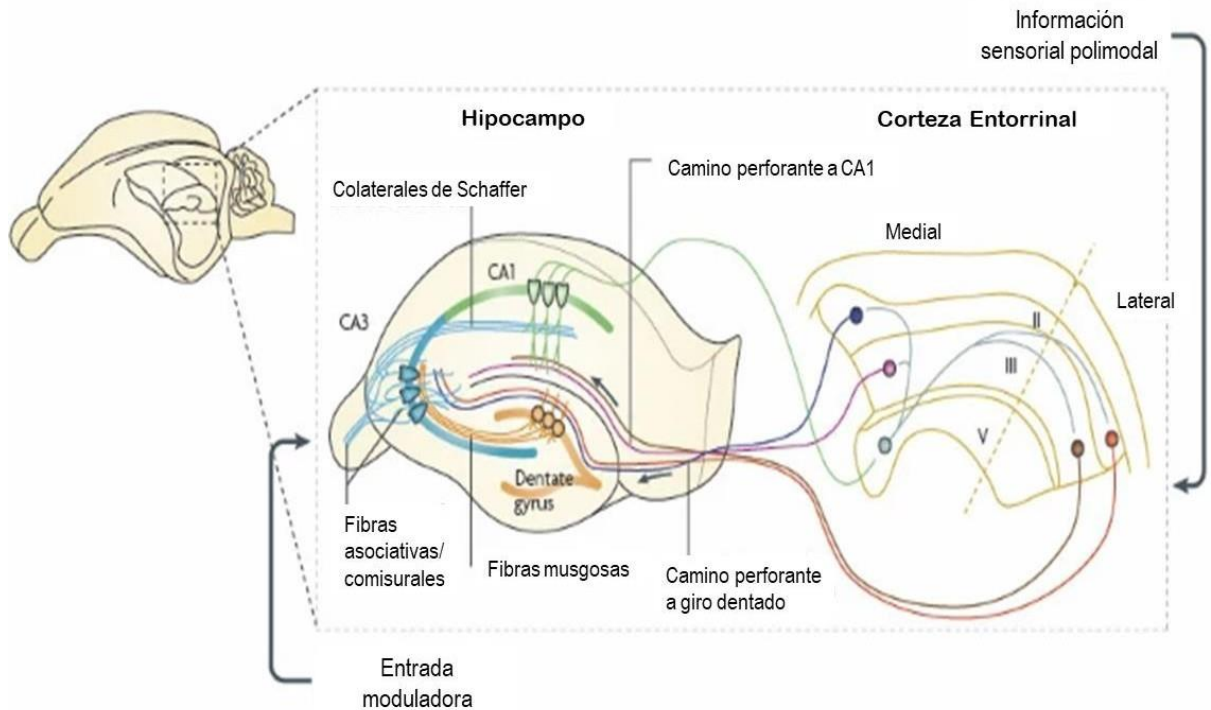


Figura 3. Corte sagital del hipocampo con proyecciones de la corteza entorrinal al hipocampo (Neves y col., 2008).

1.2.2 Giro dentado, estructura esencial para la memoria

El giro dentado (GD) es la única región del hipocampo que contiene dos tipos de neuronas excitadoras, las células granulares y las células musgosas, además de que en el GD ocurre la neurogénesis en la edad adulta, tanto en modelos de laboratorio como en humanos (Amaral y col., 2007). Estudios previos han demostrado que el GD es una subregión del hipocampo esencial para mantener la potenciación a largo plazo (LTP) entre GD y CA3, ya que las células que se mantienen activas por un periodo largo de tiempo para lograr la LTP son las células granulares, las cuales se encuentran exclusivamente en el giro dentado y no en las otras regiones del hipocampo (Messaoudi y col., 2007).

Mediante el estudio de la transcripción sostenida del ARNm de Arc (un IEG), se ha observado que solo ~2% de las células granulares se activan (muestran expresión

de Arc) ante la respuesta a un estímulo (Ramírez-Amaya y col., 2013). Inclusive se ha demostrado que el número de neuronas activadas por un ambiente novedoso es poca en el giro dentado en comparación con otras subregiones del hipocampo, estas neuronas activadas en el GD muestran una regulación única de muchos genes, algunos de los cuales son importantes en supervivencia neuronas, plasticidad sináptica y neurogénesis adulta. También se ha destacado a otro grupo de genes, los cuales son importantes para facilitar cambios nucleares a través de la desmetilación de ADN, desmetilación de histonas y transcripción. Esta evidencia indica que la actividad neuronal está asociada a cambios epigenéticos importantes para modular la supervivencia de las neuronas dependientes de la actividad (Jaeger y col., 2018).

Por último, pero no menos importante, el giro dentado es la principal entrada de las señales provenientes de la corteza entorrinal, la cual es la fuente de gran parte de la información sensorial que el hipocampo usa para llevar a cabo sus funciones (Amaral y col., 2007).

1.3 Genes de Expresión Inmediata como marcadores de activación neuronal.

Los genes de expresión inmediata (IEG) se expresan de manera rápida y transitoria, y codifican para una serie de enzimas citoplasmáticas, proteínas secretadas o factores de transcripción, los cuales contribuyen en la diferenciación, metabolismo y proliferación de células (Healy y col., 2013). Se han descrito más de 100 IEG, pero sólo un pequeño grupo se ha localizado en neuronas, siendo los más destacados c-fos y zif268 que actúan como factores de transcripción; así como Homer1a, Arc y Npas4 que actúan como efectores en las funciones celulares (Gallo y col., 2018).

1.3.1 Activación neuronal

Los mecanismos subyacentes a las diferentes tareas de procesamiento de información utilizan básicamente los mismos principios celulares de red e incluso pueden utilizar vías de transducción de señales similares (Robinson y col., 2020).

Las características del entorno son detectadas por nuestros receptores sensoriales que traducen estos fragmentos de estímulos físicos en patrones de actividad

neuronal. Las neuronas activadas llevan a cabo cambios físicos y químicos duraderos que facilitan su reactivación selectiva para evocar una memoria y de esta manera recuperar una experiencia. Los avances tecnológicos han permitido a los investigadores etiquetar a las neuronas de hipocampo que se activan durante una experiencia (Nomoto y col., 2018), lo que permite estudiar *in vivo* y *ex vivo* los cambios celulares y moleculares que subyacen al aprendizaje y la memoria.

La formación de la memoria se basa en la iniciación y el mantenimiento de la plasticidad sináptica a largo plazo, para la cual la síntesis de proteínas *de novo* es un requisito vital. La síntesis de proteínas *de novo* en sí misma es secundaria a los cambios dependientes de la actividad en las sinapsis que ocurren durante los procesos de aprendizaje. Todo comienza con la liberación de neurotransmisores inducida por el aprendizaje (p. ej., glutamato) y de factores de crecimiento neuronal (p. ej., BDNF), quienes activan diferentes familias de receptores, lo que permite el reclutamiento de varias vías de señalización intracelular que involucran segundos mensajeros y proteínas quinasas. Estas vías de señalización regulan modificaciones postraduccionales y la activación de una cascada de genes regulados principalmente por CREB que conduce a la expresión de genes de expresión inmediata (IEG), que a su vez regulan la expresión de genes de respuesta tardía críticos para la funcionalidad duradera y cambios neuronales estructurales. Es de destacarse que la expresión génica es regulada principalmente por mecanismos epigenéticos, así como por varios mecanismos postranscripcionales y de traducción (Figura 4) (Alberini y col., 2018).

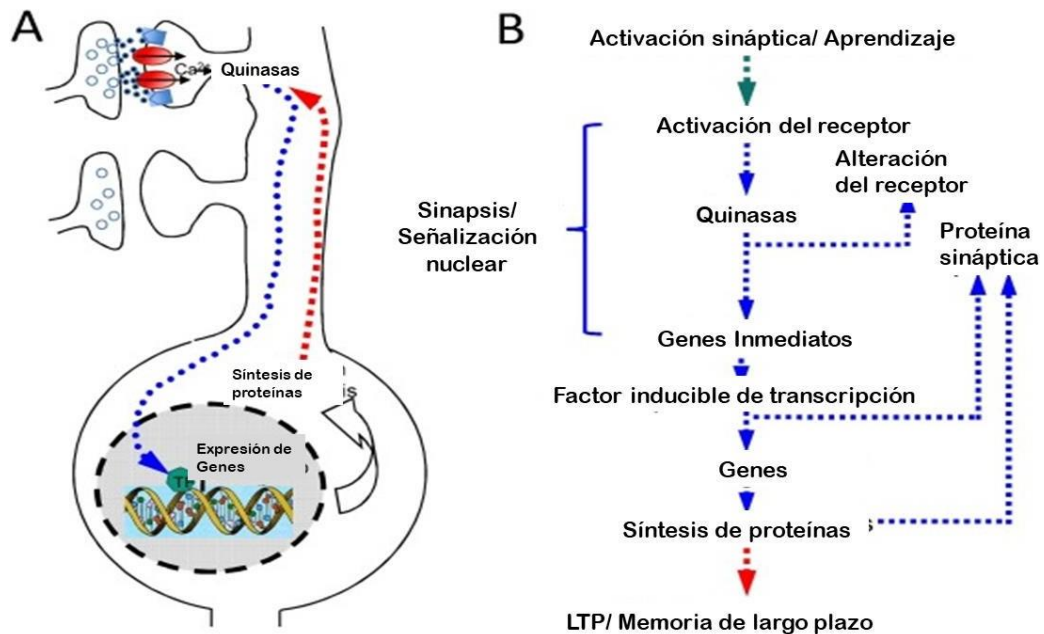


Figura 4. Principales pasos moleculares implicados en la formación de la memoria a largo plazo (Bruehl-Junggerman y col., 2007).

1.3.2 IEG en memoria

Los primeros estudios de comportamiento que usaron inhibidores de la síntesis de proteínas descubrieron que las proteínas recién sintetizadas durante el aprendizaje son necesarias para la memoria de largo plazo, pero no para la de corto plazo. Este conocimiento se ha ampliado también a que la plasticidad sináptica y la potenciación de largo plazo necesitan de ARNm y proteínas de recién sintetizadas, lo cual indica que la expresión génica que ocurre unos instantes después de un paradigma conductual de aprendizaje (entrenamiento) desempeña un factor clave para la activación neuronal y para los cambios celulares que subyacen la formación de memoria (Okuno, 2011).

Desde el descubrimiento de los IEG en las neuronas, estos se han utilizado principalmente como marcadores de actividad neuronal vinculada con aprendizaje y memoria. La expresión de IEG aumenta con la actividad neuronal, y es un indicador de procesos moleculares en las neuronas que favorecen la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria (Sauvage y col., 2019). Diferentes tareas de comportamiento inducen la expresión de IEG en neuronas del hipocampo; por

ejemplo, se ha demostrado la expresión de IEG en neuronas activadas durante pruebas de aprendizaje para la formación de la memoria declarativa como el laberinto de agua de Morris, la exposición a contextos novedosos, el condicionamiento aversivo de tipo contextual, entre otros (Erwin y col., 2020).

1.3.3 Arc

El gen *Arc* es un IEG neuronal que codifica para la proteína efectora Arc (proteína asociada con el citoesqueleto y regulada por actividad), también conocido como *arg3.1*. Arc fue descrita por primera vez por Diermar Kuhl y Paul Worley en 1995, y desde entonces se ha investigado de manera extensiva, demostrándose su papel fundamental en la consolidación de diferentes tipos de recuerdos, además de ser uno de los IEG neuronales que se regula al alza rápidamente después de la activación neuronal y participa en la plasticidad neuronal. Estas características hacen de Arc un excelente marcador de actividad neuronal (Bramha y col., 2008).

El ARNm de *Arc* se acumula en el núcleo en ~5 min después de una fuerte actividad neuronal; 30 minutos más tarde se transloca al citoplasma y puede degradarse rápidamente o traducirse a proteína, la cual puede permanecer en la neurona hasta por 1 hora o más dependiendo de la región del cerebro en la que se analice (Chawla y col., 2018). De acuerdo con Ramírez-Amaya y colaboradores en 2013, la exploración en un ambiente enriquecido favorece la activación neuronal en el GD dorsal, detectada por la expresión de *Arc* que se mantiene hasta por 8 horas después de la exploración.

La expresión de *Arc* en el hipocampo no es homogénea, y el tiempo en el que Arc se mantiene en la neurona depende de la subregión del hipocampo que se analice. En el GD, la expresión de Arc persiste hasta por 8 horas después de la activación neuronal, a diferencia de otros IEG como c-fos cuya expresión disminuye a partir de las 3 horas. El grupo de Chawla en 2018, ha reportado que en CA1 se observa un mayor número de neuronas activadas por ambiente enriquecido que en el GD, pero en las neuronas del GD la transcripción de *Arc* se mantiene por más tiempo y subyace la estabilización de la potenciación a largo plazo, lo que sugiere que la síntesis sostenida de Arc en células granulares es importante para la plasticidad

sináptica y la consolidación de la memoria (Ramirez-Amaya y col., 2013). De manera similar, la expresión de *Arc* a lo largo del eje dorsal-ventral del hipocampo ante una tarea conductual (exploración) muestra una reducción de 2 a 3 veces en la proporción ventral de células que expresan *Arc* en las tres subregiones del hipocampo: CA1, CA3 y DG (Chawla y col., 2018).

Existe evidencia que indica que la transcripción de *Arc* dependiente de la experiencia se reduce en el hipocampo de rata envejecida, lo podría contribuir con el deterioro de la memoria durante el envejecimiento. Estudios previos han sugerido que la regulación de *Arc* en el hipocampo y su relación con el deterioro de la memoria vinculado con la edad depende de diferentes niveles de control, que van desde la transcripción y traducción, así como la degradación de la proteína (Shandilya y Gautam, 2020).

Aunque el control epigenético de los IEG está relacionado con el deterioro cognitivo, aun no es claro el papel de los mecanismos epigenéticos en la expresión de estos genes, y tampoco se entiende con claridad cómo influyen en la activación neuronal (Myrum y col., 2020).

1.4 Mecanismos epigenéticos que modulan la activación neuronal

1.4.1 Epigenética

La epigenética estudia los mecanismos que controlan la expresión de los genes sin que estos o sus regiones promotoras hayan sufrido cambios en la secuencia de ADN. Los mecanismos moleculares para la regulación epigenética incluyen la metilación y desmetilación del ADN, modificaciones de las histonas (metilación, acetilación y fosforilación) y asociación de microARN. Entre los mecanismos epigenéticos, la metilación del ADN o de las histonas es una modificación que ha recibido gran atención en los estudios de formación de la memoria (Lu y col., 2013).

Las histonas son proteínas con afinidad por el ADN y son fundamentales para el empaquetamiento del ADN en nucleosomas. Las colas N- y C-terminales de las histonas se extienden hacia fuera del nucleosoma y pueden ser modificadas covalentemente mediante acetilaciones, metilaciones y fosforilaciones,

principalmente. Estas modificaciones postraduccionales afectan directamente las interacciones histona-ADN, y alterarán la accesibilidad de los factores de transcripción a los genes, y por consiguiente afectan la compactación de la cromatina y la expresión génica, lo que impacta una multitud de procesos celulares (Stefanelli y col., 2018).

Descrita por primera vez en 1960, la metilación de histonas es una marca química que resulta de la agregación de un grupo metilo (-CH₃) en un residuo de lisina o arginina. Las metilaciones de histonas son catalizadas por enzimas de tipo histona metiltransferasa (HMT), capaces de transferir un grupo metilo de la S-adenosil-metionina hacia su residuo objetivo. La metilación puede resultar en modificaciones de tipo mono- (me), di- (me₂) o tri-metil (me₃) en el grupo amino de la lisina (Figura 5) (Gupta y col., 2010).

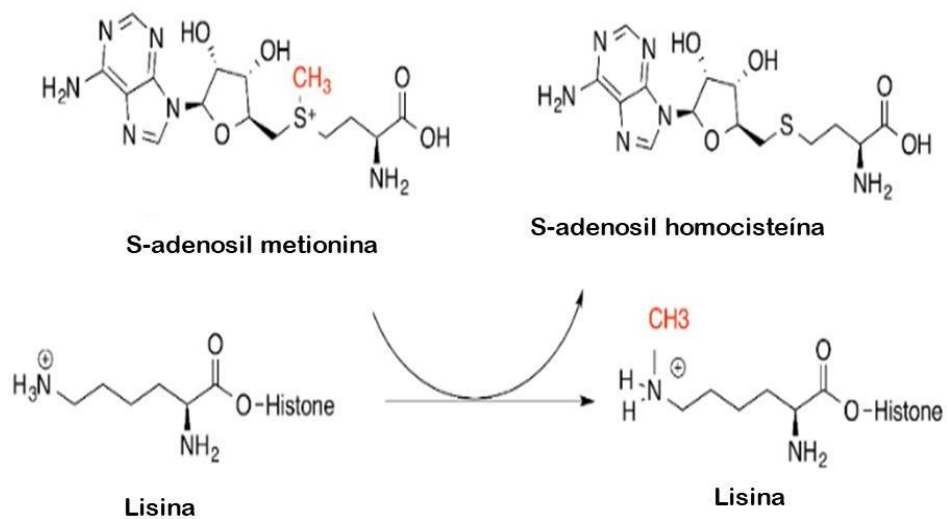


Figura 5. Metilación del residuo N-terminal de la lisina mediante la donación de los grupos metilo por la S-adenosil-metionina (Gupta y col., 2010).

1.4.2 Metilación en la histona 3

La metilación de la cola de histona que ocurre típicamente en residuos de lisina (K), como H3K4, H3K36, H3K79 y H4K20, está vinculada a un estado abierto de la cromatina y a la transcripción activa. Por otro lado, la metilación de H3K9, H3K27 y H4K20 están asociadas al silenciamiento de genes. La trimetilación de H3K9

(H3K9me3) es una marca de histona represiva importante, involucrada principalmente en la formación y mantenimiento del estado de heterocromatina silencioso. Esta marca es generada principalmente por la HTM SUV39H1 (Homologo 1 del supresor de variegación 3-9). H3K9me3 tiene un papel esencial en el envejecimiento, la inflamación vascular, la diabetes, el aprendizaje y la memoria (Kushwaha y col., 2020).

1.4.3 H3K9me3 en la memoria y el envejecimiento

La modificación de histonas juega un papel fundamental en la regulación de la plasticidad sináptica y la estabilidad de la memoria. Investigaciones recientes se centran en entender el papel de la metilación de histonas en la regulación de la estructura de la cromatina en células del sistema nervioso, principalmente en neuronas (Sen y col., 2016).

Existe amplia evidencia que indica que ocurren aberraciones moleculares en el cerebro durante el envejecimiento, una de ellas es la desregulación de mecanismos epigenéticos. Varios genes relacionados con la plasticidad y la estructura sináptica están regulados a la baja en el hipocampo como consecuencia de alteraciones epigenéticas. Se ha reportado que durante el envejecimiento hay un aumento en la expresión de la enzima SUV39H1, lo cual conlleva al aumento del nivel de H3K9me3 en el promotor de varios IEG neuronales y disminuye su expresión, así como la memoria en ratones viejos (Kushwaha y col., 2020). Específicamente, en animales viejos H3K9me3 aumenta en los promotores de IEG como Arc, EGR1, Homer 1 y Narp, BDNF, GABBR1, GABRA2 y gprasp1 (Dahan y col., 2020; Kushwaha y col., 2020). De acuerdo con estos resultados, también se ha informado que la inhibición farmacológica de la SUV39H1 disminuye los niveles de la marca H3K9me3 en el hipocampo de ratones envejecidos, y mejora la memoria de ubicación de objetos (Snigdha y col., 2016). Aunado a este resultado, se ha observado que la marca epigenética H3K9me3 reprime la expresión de BDNF, el cual tiene diversas funciones en el mejoramiento de la memoria incrementado el crecimiento de las espinas dendríticas. BDNF es uno de los reguladores clave de la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria, y múltiples estudios indican que este

factor neurotrófico es deficiente en cerebros con EA o envejecidos (Snigdha y col., 2016; Ionescu-Tucker y col., 2021).

Un estudio con ratones SAMP8, un modelo animal de senescencia acelerada, mostró mayores niveles de modificaciones de histonas asociadas a heterocromatina (H3K27me3 y H3K9me3) y una reducción de las marcas de activación. Inclusive mostraron déficits pronunciados de aprendizaje y memoria asociados a la pérdida cerebral de marcas transcripcionales activas y aumento de marcas transcripcionales silenciadas (Butterfield y Poon, 2005).

También, recientemente se ha sugerido que las modificaciones epigenéticas median la influencia de patologías relacionadas con la demencia. Se ha reportado que existen niveles altos de H3K9me3 en neuronas de cerebros humanos de pacientes con Enfermedad de Alzheimer (EA), y el perfil de genes reprimidos por H3K9me3 están involucrados principalmente en EA (Lee y col., 2020). Además, evidencia reciente muestra que la metilación de H3K9 puede aumentar por el estrés oxidativo normal durante el envejecimiento y que la inhibición de esta metilación previene el envejecimiento cognitivo y reduce la patología de la EA (Ionescu-Tucker y Cotman, 2021). Todos estos antecedentes han sugerido que la manipulación farmacológica de enzimas que regulan la metilación de histonas puede alterar el estado de la cromatina y así restaurar la función de la memoria envejecida.

En cuanto a las subregiones del hipocampo, se ha reportado que el GD y CA1 son las que más expresan H3K9me3 a partir de los 12 meses de edad en ratones, obteniendo un pico de severidad a los 18 meses que se mantuvo hasta los 22 meses, y esto correlacionó positivamente con el deterioro del aprendizaje espacial y la memoria (Wu y col., 2019; Kushwaha y col., 2020). Datos no publicados de nuestro laboratorio indican que la región más afectada por el incremento de la marca H3K9me3 en el hipocampo durante el envejecimiento en ratones es el GD dorsal, por lo que el presente estudio se enfoca en esta región del cerebro.

Dentro de este marco, los procesos de memoria y plasticidad sináptica requieren de la síntesis de nuevas proteínas, la cual se induce por la actividad neuronal. Las modificaciones epigenéticas, como la metilación de histonas permiten cambios en

la estructura de la cromatina y de esta manera regulan la expresión génica, de lo cual depende la síntesis de nuevas proteínas. Así, los mecanismos epigenéticos en las neuronas son fundamentales para las funciones cerebrales.

Líneas de investigación recientes sugieren que un aumento en los niveles de la marca epigenética H3K9me3 en el hipocampo afecta negativamente el aprendizaje y la memoria; sin embargo, aún se desconoce si esta modificación postraduccional afecta la activación neuronal inducida por experiencias ligadas a un proceso de aprendizaje. La respuesta a esta incógnita ayudaría a comprender cómo las modificaciones epigenéticas en el hipocampo modulan el aprendizaje y la memoria, así como su deterioro en la vejez, lo cual podría impactar de manera importante el desarrollo de estrategias terapéuticas para prevenir o revertir la demencia.

2. HIPÓTESIS

La acumulación de la marca epigenética H3K9me3 en neuronas del giro dentado dorsal afecta negativamente su activación en respuesta a la estimulación por la exposición a un ambiente novedoso.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar mediante inmunohistoquímica los niveles del marcador epigenético H3K9me3 en neuronas activadas y no activadas del giro dentado en respuesta a estimulación por un ambiente novedoso.

3.2 Objetivos Específicos

- Implementar un modelo de estimulación sensorial mediante exposición de ratones a un ambiente novedoso.
- Validar la estimulación de los ratones en el ambiente novedoso mediante la detección de neuronas activadas, identificadas por el marcaje de la proteína Arc mediante inmunohistoquímica.
- Estandarizar y validar el análisis a nivel de célula única en rebanadas de hipocampo mediante el uso del programa CellProfiler.
- Comparar los niveles de H3K9me3 en neuronas del giro dentado activadas y no activadas en animales control (no estimulados) y expuestos a un ambiente novedoso (AN).

4. METODOLOGÍA

4.1 Material Biológico

Se usaron ratones C57BL/6 machos de 4 meses de edad, proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los ratones se habituaron en el laboratorio durante 5 días antes del experimento, alojados en cajas de polipropileno de 19 x 29 x 12 cm con aserrín estéril. Cada caja tenía un par de ratones para proporcionar el espacio suficiente para moverse. A los ratones se les proporcionó agua y alimento tipo pellet (marca LabDiet, Laboratory Rodent Diet 5001) *ad libitum*, la composición nutrimental del alimento se muestra en el Anexo 1.

Las cajas (etiquetadas con la información correspondiente a los animales) se mantuvieron en un cuarto destinado para el alojamiento de ratones y de las pruebas de conducta, el cual tenía un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, un rango de temperatura de 20- 25°C y humedad relativa entre 40-70%. Los animales fueron manipulados respetando los lineamientos éticos para el cuidado y manejo de animales indicados en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-199, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y siguiendo los Principios Rectores Internacionales para la Investigación Biomédica con Animales publicados por el Consejo Internacional para la Ciencia de los Animales de Laboratorio (ICLAS, por sus siglas en ingles) y por el Consejo de Organizaciones Internacionales para la Ciencia Médica (CIOMS, por sus siglas en ingles).

El protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Química, UAQ con el No. De oficio CBQ22/001 (Anexo 2).

El uso de una prueba conductual con animales de experimentación es preciso para responder la hipótesis planteada, el modelo animal que se eligió nos permite observar la activación neuronal ya que los ratones por naturaleza exploran constantemente su ambiente, los elementos conocidos, objetos nuevos, ya sea olfateando, degustando o investigando; de esta manera se aprovecha la curiosidad innata de los roedores. El resultado de esta exploración es la activación neuronal que induce la expresión de IEG, como Arc.

no se observa alguna respuesta de movimiento reflejo ante el pellizco es indicativo de que el animal está anestesiado por completo.

A continuación, se describe el proceso de fijación de tipo químico, que permite inmovilizar los antígenos y mantener la estructura celular en el cerebro. El animal profundamente anestesiado se colocó en la zona limpia para realizar una cirugía que precede la perfusión intraventricular de una solución de paraformaldehído (PFA) al 4%; así, el PFA al 4% se inyectó al sistema circulatorio vía el corazón. La cirugía inicia con una incisión lateral a través de la pared abdominal y la piel, justo debajo de la caja torácica. El corte sigue hacia diafragma y a lo largo de la caja torácica. Se cortan los laterales de las costillas hasta la clavícula con el objetivo de poder levantar el esternón y observar el corazón. Una aguja conectada a una bomba de perfusión se inserta en el ventrículo derecho, se corta la aurícula izquierda, y se deja pasar 40 ml aproximadamente de solución salina en un tiempo de 15-18 min. El aclaramiento de color del hígado indica que la perfusión se ha llevado de manera correcta y que los vasos sanguíneos se están limpiando. Finalmente se dejan pasar aproximadamente 40 mL de solución de PFA 4% durante 20 min. Se tiene que observar como las extremidades del animal se ponen rígidas indicando que el tejido está siendo fijado. Una vez fijado el tejido, se puede extraer con facilidad el cerebro.

4.2.3 Extracción de cerebro

Una vez fijado el tejido, utilizando tijeras quirúrgicas, se retiró la cabeza animal, después se hizo una incisión en la línea media del tegumento desde el cuello hasta la nariz para exponer el cráneo. Se realizaron cortes en los laterales del *foramen magnum*, de los huesos propios nasales y de la superficie interna del cráneo con el objetivo de poder abrir el cráneo. Con una espátula se retiró cuidadosamente el cerebro y se mantuvo por 24 horas en solución de PFA al 4%. Una vez transcurrido este tiempo el cerebro se traspasó a una solución de sacarosa al 30% hasta que el cerebro ya no flotaba en la solución, indicando su deshidratación.

Los cadáveres de los animales y los restos de tejido que no se utilizaron fueron considerados, manejados y eliminados como residuos peligrosos biológico-

infecciosos por personal capacitado del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

La cirugía y extracción fue realizada bajo la supervisión de la Técnico Académico del laboratorio C-03 Códigos Moleculares de la Memoria.

4.2.4 Cortes coronales del cerebro

Se obtuvieron cortes coronales del cerebro con un grosor de 30 μm , usando un Criostato LEICA CM1510 a una temperatura de -23 a -20 $^{\circ}\text{C}$. Primero se retiró el cerebro de la solución de sacarosa y con una cuchilla se cortó el bulbo olfatorio y una pequeña parte del cerebelo, con el fin de tener una superficie lisa que facilite el montaje. Se usó el medio de montaje de tejidos TissueTek para mantener el tejido en el porta muestras y realizar los cortes. Únicamente se recolectaron los cortes en donde se observa el hipocampo dorsal y se mantuvieron a -20°C en solución anticongelante.

4.2.5 Titulación de anticuerpos

Se titularon los anticuerpos secundarios para obtener la concentración con la mejor relación intensidad/ruido, la cual refleja la relación de unión específico/inespecífico.

Para la titulación de anticuerpos, se realizó una inmunohistoquímica en donde las rebanadas se tiñeron con NeuN o con Yoduro de propidio, los cuales fueron útiles para identificación de neuronas o células y como control de tinción positiva. También se tiñeron con los anticuerpos secundarios a titular anti-IgG1 de ratón Alexa Fluor 488 (AF488), anti-IgG2a de ratón Ficoeritrina (PE) y anti-IgG de conejo Alexa Fluor 647 (AF647) a diferentes concentraciones. Las concentraciones de los anticuerpos primarios y secundarios empleados para la tinción se resumen en el Cuadro 1.

Se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (MIF, por sus siglas en inglés) de cada célula o neurona identificada por el marcador positivo (Yoduro de propidio o NeuN) y se realizó una relación con la intensidad media del ruido de fondo, que se obtuvo a partir de 10 regiones aleatorias del fondo la imagen que no contenía células.

Se graficó la relación Señal/Ruido (S/R) de cada concentración de los anticuerpos y se escogió la concentración en la que se obtenía la mejor relación S/R.

Cuadro 1. Concentraciones empleadas para la titulación de anticuerpos secundarios.

	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
TITULACIÓN	Anti-NeuN IgG1	Anti-IgG1 AF488	Anti-H3K9me3 IgG (conejo)	Anti-IgG (conejo) AF647	Anti- Arc IgG2a	Anti-IgG2a PE
	1:2000	1:1000	1:500	1:500	1:1000	1:500
		1:3000		1:1000		1:1000
		1:500		1:300		1:3000
CONTROL DE TINCIÓN POSITIVA	Yoduro de propidio 2 µg/mL		Anti-NeuN IgG1 1:2000	Anti-IgG1 488 1:3000	Anti-NeuN IgG1 1:2000	Anti-IgG1 647 1:1000

4.2.6 Inmunohistoquímica

Se tomaron 3 rebanadas de cada cerebro donde se distinguiera el hipocampo dorsal. Las rebanadas se lavaron tres veces durante 10 minutos en KPBS (Buffer de fosfatos de potasio), después se les aplicó un pretratamiento; primero con H₂O₂ al 0.3% en KPBS por 10 minutos, luego con NaBH₄ al 0.1% en KPBS por 15 minutos y por último con tritón al 1% por 30 minutos. Entre cada uno de estos procedimientos se lavaron las rebanadas con KPBS. Una vez realizado el pretratamiento se incubaron las rebanadas con una mezcla de anticuerpos que contienen anti-NeuN-IgG1 1:2000, anti-Arc-IgG2a 1:1000, anti- H3K9me3-Rabbit 1:500. La incubación se realizó por 48 horas a 4°C en agitación constante.

Transcurridas las 48 horas, las rebanadas se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente en una mezcla de anticuerpos secundarios que contiene anti-IgG1- AF488 1:3000, anti-IgG2a- PE 1:1000, anti-IgG rabbit AF6471:500.

Por último, las rebanadas se montaron en portaobjetos cargados positivamente, se usó el medio de montaje Vectashield y se cubrieron con cubreobjetos.

4.2.7 Microscopía Confocal

Para observar las rebanadas se utilizó un microscopio confocal Zeiss LSM 780 Dúo proporcionado por la Unidad de Microscopia del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Se usó el objetivo 40X con aceite de inmersión para observar las neuronas del giro dentado, además se utilizó la herramienta “TileScan” para capturar la estructura completa. La adquisición de las imágenes fue sucesiva en tres canales diferentes.

4.2.8 Linear Unmixing

Después de la adquisición de la imagen se empleó la herramienta “Linear Unmixing” para disminuir al mínimo el solapamiento de señales de cada canal de fluorescencia. Para esto, primero se obtuvieron los espectros de referencia de cada fluoróforo mediante la herramienta “Lambda Mode” usando rebanadas que fueron marcadas con un solo fluoróforo. El Linear Unmixing relaciona cada píxel de la imagen con uno de los espectros de referencia, lo que permite que el solapamiento de señales disminuya.

4.2.9 Medición de intensidad de célula única

Para medir la intensidad de cada célula en las imágenes de fluorescencia se hizo uso del software CellProfiler versión 4.2.1. A través del apartado de IdentifyPrimaryObjects se identificó cada célula marcada con fluorescencia, y junto con la herramienta de MeasureIntensity se obtuvieron los valores de intensidad de cada célula detectada en la imagen. Obtuvimos la intensidad de NeuN, Arc y H3K9me3 de cada célula. El procedimiento se describe con más detalle en el Anexo 3.

Se realizó una normalización de la intensidad obtenida de Arc y H3K9me3 en relación con la intensidad de NeuN. Con estos datos se realizó una clasificación de las neuronas Arc positivas, se obtuvo la media de la intensidad normalizada de Arc y los datos se clasificaron como se observa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación de las neuronas Arc positivas (DE= Desviación Estándar).

Clasificación	Valor de intensidad de Arc normalizada con NeuN (MIF Arc)
Neuronas altamente activadas (Arc ++)	MIF Arc > Media + 4DE
Neuronas medianamente activadas (Arc +)	Media + 4 DE > MIF Arc > Media + 3DE
Neuronas no activadas	MIF Arc < Media + 3DE

4.2.10 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el programa GraphPad Prism 8.0. Antes de cada análisis, se realizó prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson con los datos de intensidad de fluorescencia. También se detectaron valores atípicos en las poblaciones con la prueba de Grubb.

Para comparación de dos grupos que tiene una distribución normal se utilizó la prueba t no pareada con corrección de Welch, la cual no asume que las desviaciones estándar de ambas poblaciones son iguales. Para comparación de dos poblaciones que sean pareadas y que sigan una distribución normal se usó una prueba de t pareada. En el caso de comparaciones múltiples se usó una prueba de ANOVA de dos vías seguido de una prueba *post hoc* de comparación múltiple de Tukey. Las diferencias significativas se consideraron con un nivel de significancia de $p < 0.05$, y los datos se presentan como media \pm SEM.

4.3 Diseño Experimental

El diseño experimental considera un total de 6 ratones de 4 meses de edad, 3 ratones serán usados como control, y 3 como experimentales, de los cuales se tomarán 3 cortes coronales de cada ratón. Se consideró necesario este número de animales para obtener resultados estadísticamente significativos.

El experimento permite evaluar el marcador epigenético H3K9me3 en las neuronas activadas y determinar qué papel tiene la represión génica en la activación neuronal.

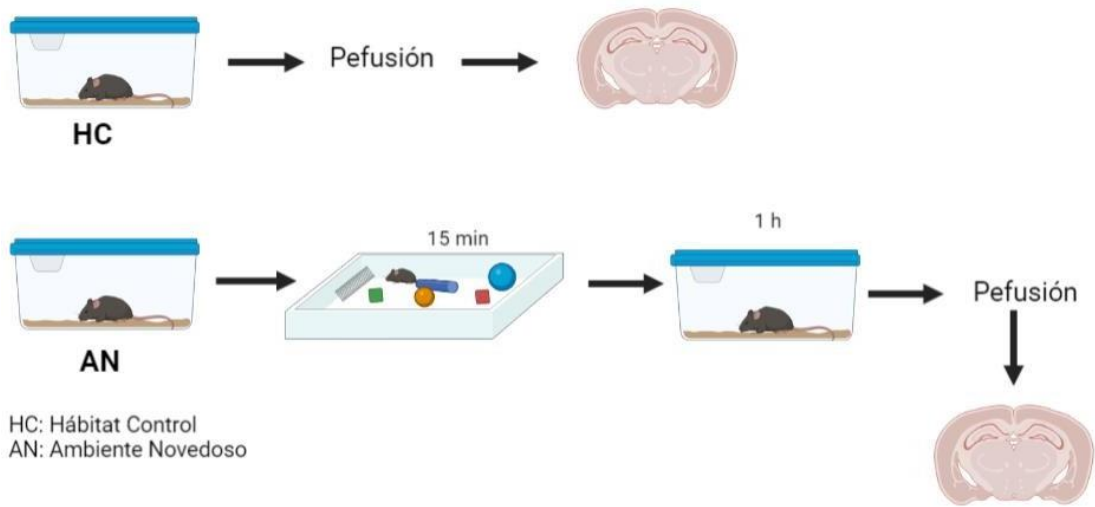


Figura 7. Diseño Experimental

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Titulación de anticuerpos

La inmunohistoquímica (IHQ) se ha vuelto común en el área de las neurociencias ya que permite visualizar la presencia de biomarcadores en el contexto de la anatomía del Sistema Nervioso Central (Chlipala y col., 2020). En los últimos años, y cada vez con mayor frecuencia, en el análisis de imágenes de IHQ se realizan mediciones cuantitativas de numerosos parámetros. Lo anterior gracias al uso de programas de cómputo para el análisis de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, en las cuales la intensidad de fluorescencia se utiliza como parámetro para la cuantificación de los niveles de marcadores moleculares (Shihan y col., 2021).

Idealmente, debería obtenerse una tinción negativa de IHQ cuando el tejido analizado no contiene el antígeno objetivo reconocido por el anticuerpo utilizado. Sin embargo, en la práctica las inmunoglobulinas (IgG) se unen con baja afinidad a numerosos constituyentes tisulares, dando así una tinción de fondo que incrementa de manera lineal en función de la concentración de anticuerpo. En consecuencia, los anticuerpos producen una tinción específica cuando su epítipo está presente (unión específica a través de su dominio Fab), pero pueden también unirse de manera inespecífica (principalmente a través de su dominio Fc) a componentes tisulares que tienen cargas recíprocas como el colágeno u otros componentes tisulares, y generar señal en tejidos desprovistos de su blanco molecular (Fritschy, 2008). Por lo tanto, un paso importante para la optimización de cualquier método de inmunodetección es la titulación de los anticuerpos empleados. El objetivo de la titulación es conocer la concentración de anticuerpo a la cual se obtiene la señal óptima de la unión específica, mientras que la tinción de fondo (inespecífica) es mínima; es decir, en donde la relación señal/ruido (S/R) es máxima. Por lo general, la titulación se inicia con la dilución recomendada por el fabricante o publicada en la literatura para el tejido de interés, se prueba una dilución más concentrada y una menos concentrada que acompaña a la dilución recomendada. De ahí se hace la relación S/R y se busca la mejor entre las diluciones elegidas. Este proceso se debe realizar para cada anticuerpo, incluso si cambia de fabricante.

Si el anticuerpo se aplica a una concentración demasiado baja, la señal de fluorescencia de unión específica será demasiado débil para distinguirla del ruido de fondo. Por otro lado, una concentración excesivamente alta contribuirá a la tinción de fondo, disminuyendo la relación S/R (Eisen, 2008). Para obtener la concentración óptima a la que deben ser utilizados los anticuerpos secundarios para la técnica de IHQ se comparó la relación S/R en tres concentraciones distintas. En cada imagen de microscopía confocal se obtuvo la relación S/R de cada célula o neurona, identificadas por la tinción con yoduro de propidio o NeuN (marcador neuronal), respectivamente (Figura 7). Para calcular la relación S/R se obtuvo la intensidad media de fluorescencia (IMF) en cada célula de la capa granular del GD y se dividió entre el valor de la fluorescencia del fondo de la imagen, que no contienen células (ruido de fondo). Las concentraciones óptimas para cada anticuerpo secundario se determinaron graficando la relación S/R y observando cual tenía la máxima relación señal /ruido, las concentraciones elegidas se muestran en el Cuadro 3.

La gráfica de la relación S/R del anticuerpo anti-IgG2a PE muestra que la mejor dilución es 1:3000, sin embargo, a esta concentración las neuronas no se identificaban con facilidad, por lo que se seleccionó la concentración con la segunda mejor relación S/R, la cual fue 1:1000.

Cuadro 3. Concentraciones de los anticuerpos primarios y secundarios en las que se obtiene la mejor relación S/R.

Anticuerpo primario	Anti- NeuN IgG1	Anti- Arc IgG2a	Anti- H3K9me3 IgG (conejo)
Concentración óptima	1:2000	1:1000	1:500
Anticuerpo secundario	Anti- IgG1 AF488	Anti-IgG2a PE	Anti-IgG (conejo) AF647
Concentración óptima	1:3000	1:1000	1:500

*Las figuras representativas de las titulaciones de los anticuerpos primarios no se muestran.

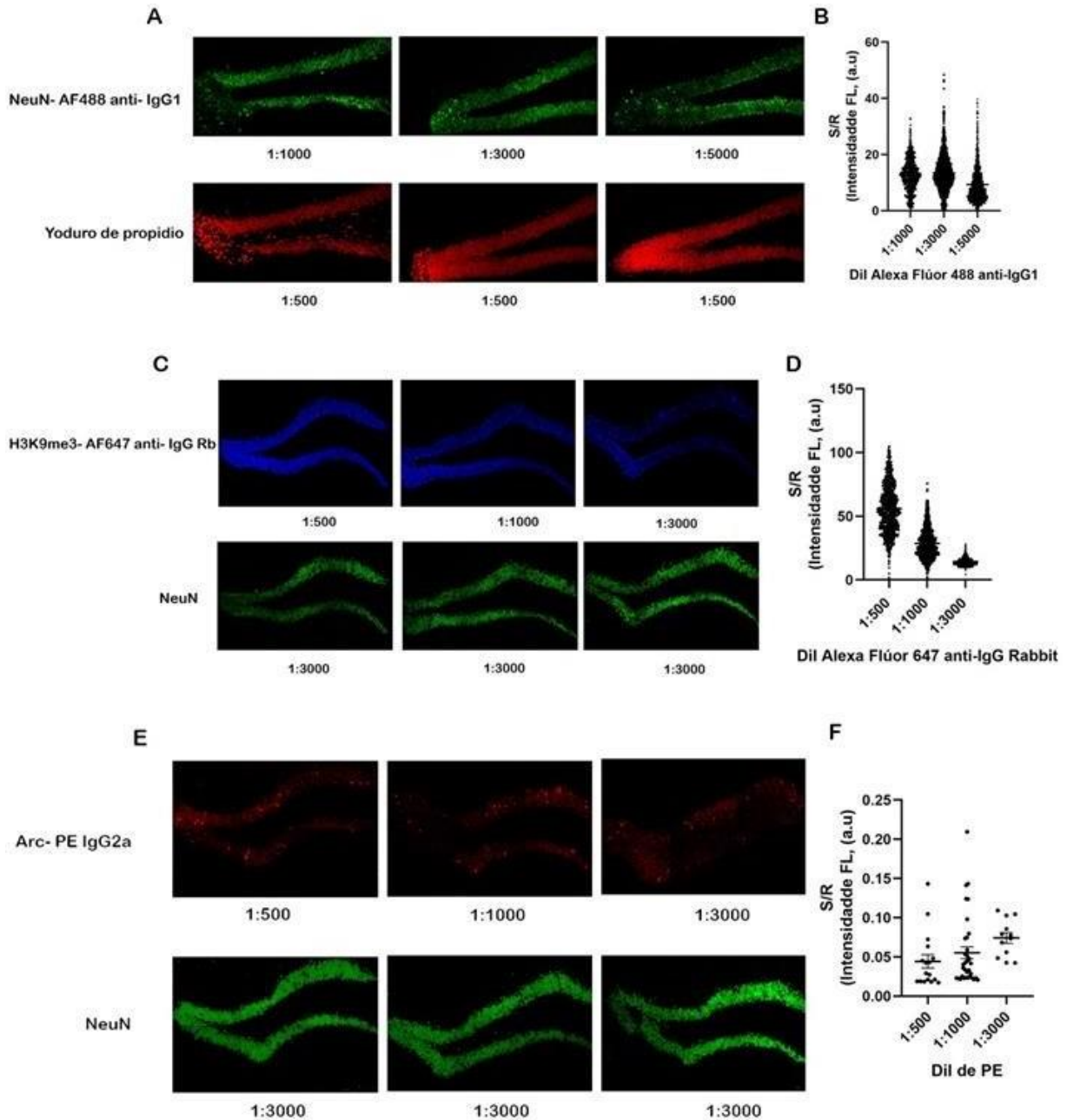


Figura 8. Titulación de anticuerpos secundarios. Imágenes de microscopia confocal en rebanadas coronales de hipocampo teñidas con: A) anti-NeuN IgG1 (Dil. 1:2000) y anti-IgG1 (ratón) AF488 a diferentes concentraciones. B) anti-H3K9me3 IgG (conejo) (Dil. 1:500) y AF647 anti-IgG (conejo) a diferentes concentraciones. C) anti-Arc IgG2a (Dil. 1:1000) y PE anti-IgG2a a diferentes concentraciones. Debajo de cada imagen se observa la tinción para NeuN (control positivo, Dil. 1:2000) o yoduro de propidio. Relación de la señal-ruido de AF488 anti-IgG1 (B), AF647 anti-IgG (conejo) (D) y PE anti-IgG2a (F) a diferentes concentraciones; n = 3 rebanadas para cada titulación.

5.2 El ambiente novedoso (AN) induce activación neuronal en el GD.

En primer lugar, examinamos si la exposición a un ambiente novedoso induce la activación de las neuronas del GD. Reportes previos han demostrado que un episodio de aprendizaje o la exposición a estímulos novedosos conduce a la expresión neuronal de IEG, los cuales se pueden visualizar mediante IHQ y así evaluar la activación neuronal posterior a experiencias conductuales (Gros y col., 2022).

Investigaciones anteriores han demostrado que la expresión de *Arc* en el hipocampo y la neocorteza refleja la experiencia conductual en respuesta a la exploración espacial, tareas de laberinto de agua, condicionamiento del miedo contextual, aprendizaje operante y tareas de evitación pasiva (Heroux y col., 2018; Miyashita y col., 2008). En nuestra investigación, para inducir activación neuronal los ratones se colocaron en un AN durante 15 min, y posteriormente se regresaron a su caja hasta el sacrificio 1 hora después. Para la identificación de las neuronas activadas se midió la intensidad de *Arc* en las células identificadas con el marcador neuronal NeuN en el GD mediante un análisis de célula única. Las neuronas que eran positivas a la tinción de *Arc* se clasificaron de acuerdo con la intensidad de la marca en: Neuronas medianamente activadas (*Arc* +), neuronas altamente activadas (*Arc* ++) y neuronas no activadas (*Arc*-, tinción negativa). Al analizar la intensidad de fluorescencia para la marca de *Arc* en el total de neuronas de cada rebanada, las neuronas *Arc* + se definieron como aquellas en donde la intensidad de la marca de *Arc* era superior al promedio + 3DE (desviación estándar) e inferior al promedio + 4DE; mientras que las neuronas *Arc* ++ se definieron como aquellas en donde la intensidad de la marca de *Arc* era superior al promedio + 4DE; las neuronas *Arc*- se definieron por tener una intensidad de la marca de *Arc* menor a la media + 3DE. De acuerdo con el análisis, el porcentaje de neuronas *Arc* + y *Arc* ++ en el GD aumentó en los ratones sometidos a un AN, en comparación con los ratones mantenidos en su caja habitual (HC, hábitat control) (*Arc* + $p= 0.0062$, *Arc* ++ $p < 0.0001$, ANOVA de dos vías) (Figura 9). Estos resultados indican que la actividad neuronal aumenta en el GD cuando los animales son sometidos a exploración. Los porcentajes de neuronas activadas que observamos (~ 1%) son consistentes con estudios previos

que examinan la actividad del GD utilizando IEG, y en los que se ha demostrado una escasa actividad en las neuronas granulares del GD, que oscila entre 1% y 4% (Schmidt y col., 2012).

Además de Arc, se ha reportado también un aumento de EGR1, Homer1 y Narp después de diferentes paradigmas conductuales. Estos IEG están principalmente relacionados en diferentes etapas de la memoria, apoyan al mantenimiento del LTP y la consolidación de la memoria dependiente de hipocampo (Kushwaha y col., 2020), además de ser importantes en múltiples procesos de plasticidad sináptica, sinaptogénesis y remodelación de neuritas (Blalock y col., 2003). De manera interesante, se ha propuesto también que la modulación de los niveles de los IEG se ve influenciada por modificaciones epigenéticas (Kushwaha y col., 2020).

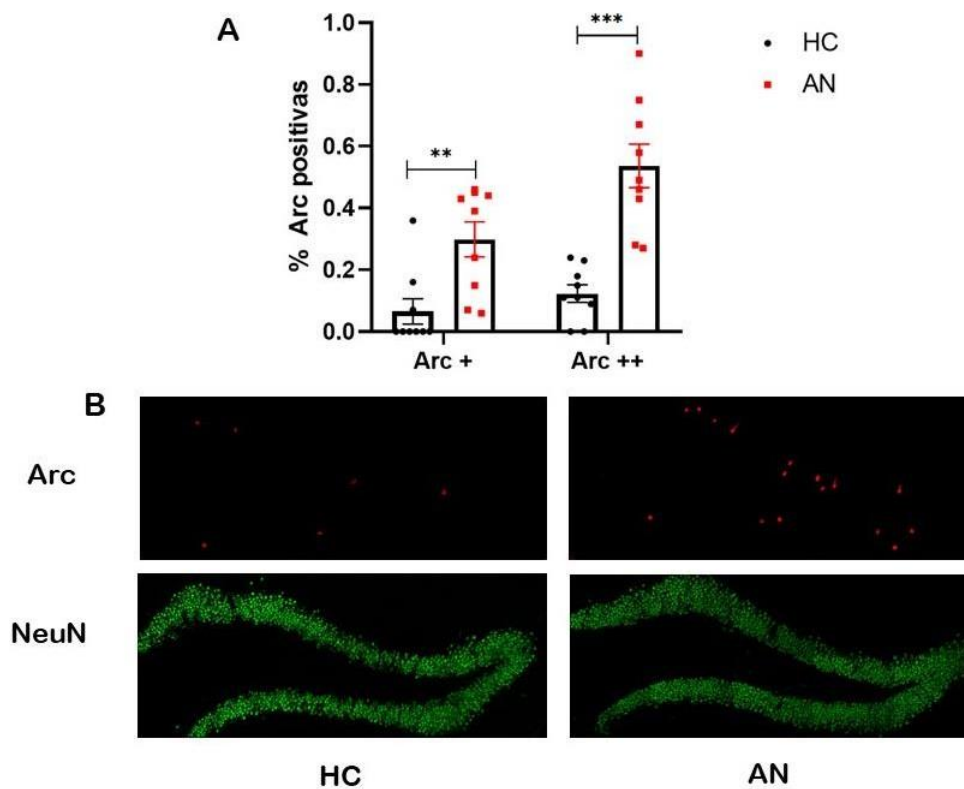


Figura 9. Activación neuronal en el giro dentado por estimulación en ambiente novedoso. AN se refiere a los animales que exploraron un ambiente novedoso por 15 min y fueron sacrificados 1 hora después, mientras que HC indica animales que fueron sacrificados sin haber explorado el AN. Análisis del porcentaje de neuronas activadas por el AN en el giro dentado usando una prueba de ANOVA de dos vías

($p < 0.05$) junto con la prueba Tukey ($p < 0.05$) (A). Imágenes de microscopía confocal de la activación neuronal en el giro dentado en ratones HC y AN (B); $n = 9$ rebanadas/3 ratones, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

5.3 Las neuronas de la capa infrapiramidal del GD expresan niveles más altos de H3K9me3 en comparación con las neuronas de la capa suprapiramidal.

Durante el análisis de imágenes para la titulación de anticuerpos, observamos una mayor intensidad de la marca H3K9me3 en la capa infrapiramidal (IP) del GD en comparación con la capa suprapiramidal (SP). Para confirmar si existía una mayor acumulación de H3K9me3 en la capa IP, se realizaron tinciones en 11 rebanadas de cerebro, obtenidas de 6 ratones. Para el análisis cuantitativo, en las imágenes de microscopía confocal del GD se identificaron las zonas IP y SP (Figura 10B), y se midió la intensidad de H3K9me3 en las neuronas (células NeuN+). Los resultados demostraron que existen mayores niveles de H3K9me3 en la capa IP del GD en comparación con la capa SP ($p = 0.0004$, t pareada) (Figura 10).

Estudios previos han revelado diferencias entre las capas IP y SP del GD, tanto en su estructura, patrón de expresión génica, fisiología de células granulares y excitabilidad, así como en su respuesta a la estimulación, lo que ha sugerido que cada capa contribuye de manera diferente en los procesos de memoria dependientes del hipocampo (Chawla y col., 2018). Nuestro hallazgo, inédito, sugiere que las diferencias entre las capas del GD tienen una raíz epigenética, asociada con la expresión de la marca H3K9me3 a un mayor nivel en la capa IP. Este hallazgo también es importante al considerar que conductas relacionadas con la memoria, navegación espacial, socialización y estrés inducen activación neuronal preferencialmente en la capa SP del GD [i.e., un mayor % de neuronas positivas para IEGs (Arc, c-Fos, Egr1 y Npas4) en la capa SP] (Erwin y col., 2020). Lo anterior plantea la posibilidad de que la acumulación de la marca H3K9me3 en la capa IP contribuya al bajo porcentaje de neuronas que alcanzan el umbral de activación en respuesta a paradigmas experimentales de estimulación. Dicha posibilidad la evaluamos en el presente estudio, como se describe a continuación.

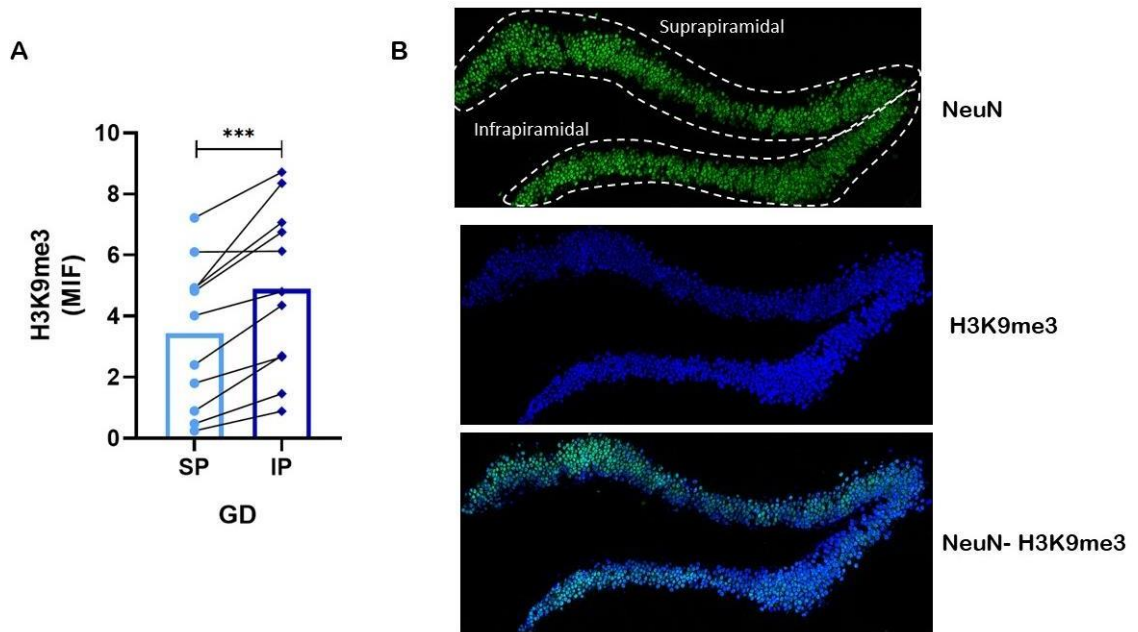


Figura 10. En el GD las neuronas de la capa infrapiriformal expresan niveles más altos de H3K9me3 en comparación con las neuronas de la capa suprapiriformal. Análisis de los niveles de H3K9me3 en ambas capas del GD en ratones macho de 4-6 meses; se compararon los promedios de cada rebanada (t pareada, *** $p < 0.001$, $n = 11$ rebanadas/6ratones) (A). Imágenes representativas de microscopia confocal donde se muestra la señal para el marcador neuronal NeuN (arriba), y se indica cómo se realizó la división de las capas SP e IP para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las neuronas de cada zona. Además, se muestra la señal de la marca H3K9me3 (central); note la diferencia en la intensidad de fluorescencia de H3K9me3 en las capas SP e IP. Por último, se muestra la combinación de ambas imágenes (abajo, NeuN y H3K9me3) (B).

5.4 El AN induce la activación de un número mayor de neuronas en la capa SP en comparación con la capa IP del GD.

Uno de los datos reportados más relevantes para nuestra investigación es la activación preferencial de la capa SP ante diferentes paradigmas de memoria, por lo que inicialmente evaluamos si en nuestro diseño experimental se observaba este fenómeno. Ratones macho de 4 meses fueron expuestos a un ambiente novedoso (AN) por 15 min, regresados a su caja habitual y sacrificados 1 hr después; como control (HC, hábitat control) se utilizaron ratones pareados por sexo y edad mantenidos todo el tiempo en su caja habitual (ver métodos).

La figura 10 muestra que la capa SP contiene un mayor porcentaje de neuronas activadas después del AN. En estado basal (ratones HC) el porcentaje de neuronas

Arc + y Arc ++ es comparable en las capas SP e IP del GD (Arc + $p = 0.8448$, Arc ++ $p = 0.9585$, ANOVA de dos vías con análisis post hoc Tukey). Por el contrario, después del AN la proporción de células granulares Arc + incrementa únicamente en la capa SP ($p = 0.0288$ vs IP); mientras que el incremento en el número de neuronas Arc ++ ocurre en ambas capas, SP e IP ($p = 0.6459$ SP vs IP, ANOVA de dos vías con análisis post hoc Tukey). Nuestros resultados sugieren que durante una experiencia novedosa el aumento de las neuronas altamente activadas ocurre en la misma proporción en ambas capas del GD, mientras que las neuronas medianamente activadas aumentan principalmente en la capa SP.

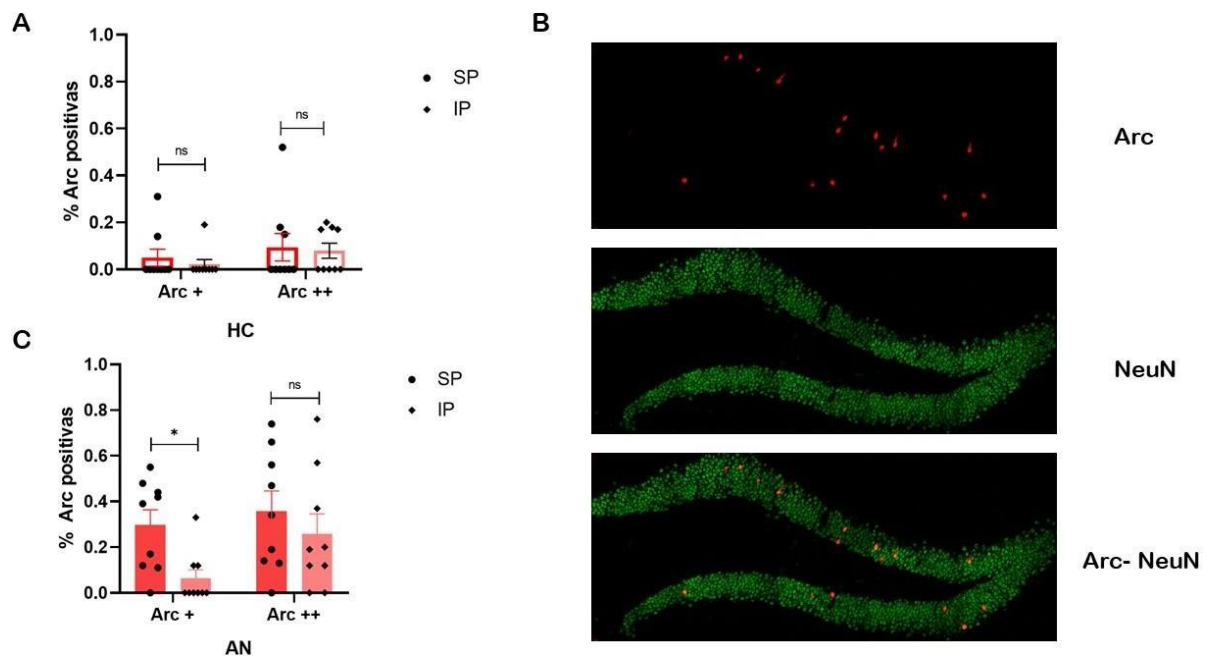


Figura 11. El AN induce la activación de una mayor proporción de neuronas medianamente activadas en la capa SP en comparación con la capa IP. Análisis de los porcentajes de las neuronas Arc + y Arc ++ en la capa SP e IP en ratones HC (A) y AN (B). Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA de dos vías ($p < 0.05$). Imágenes de microscopía confocal neuronas Arc positivas junto NeuN (C). $n = 9$ rebanadas/3 ratones, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Estos cambios en el nivel de activación podrían explicarse por hallazgos anteriores que han reportado que la neurogénesis muestra diferencias entre SP e IP; hay más proliferación y supervivencia celular en la capa suprapiramidal que en la infrapiramidal (Alves y col., 2018). Además, se ha observado que las neuronas

nuevas exhiben una mayor plasticidad y excitabilidad sináptica en comparación con las neuronas maduras, y se ha planteado la hipótesis de que las nuevas neuronas están involucradas de manera preferencial en el aprendizaje dependiente de hipocampo y memoria (Cleland y col., 2017).

Nuestros datos concuerdan con reportes anteriores, donde se muestra un aumento de la expresión de Arc, c-Fos, Egr1 y Npas4 en la capa SP del GD, en comparación con la capa IP. En este mismo estudio, el resultado se repitió en pruebas de condicionamiento contextual aversivo, ambiente novedoso, olores novedosos, reconocimiento social y nado forzado (Erwin y col., 2020). También Cleland y colaboradores en 2017, reportaron que después de la exploración de un entorno nuevo la actividad neuronal aumenta tanto en la capa SP como en la IP, pero manteniendo una mayor respuesta en la capa SP.

Otros resultados difieren, ya que muestran que después de la exposición a un AN la activación en la capa SP aumenta, mientras que la activación de la capa IP es comparable con la activación de un ratón que no fue estimulado (You y col., 2020). Las inconsistencias encontradas al comparar estudios pueden deberse a variaciones en el paradigma de ambiente novedoso (p.ej., tiempo de exposición, tamaño de la caja, número y tipo de objetos, etc.) y/o al tipo de marcador de actividad neuronal usado (p.ej., se han reportado diferencias importantes en el porcentaje y la cinética de expresión entre c-Fos y Arc en las neuronas del GD después de pruebas de aprendizaje) (Gallo y col., 2018).

5.5 Las neuronas infrapiramidales activadas por el AN contienen niveles bajos de la marca H3K9me3

Nuestros resultados muestran que, en comparación con la capa SP, la capa IP presenta niveles altos de H3K9me3 (Figura 9) y una proporción disminuida de neuronas Arc + en respuesta al AN (Figura 8), lo que apoya nuestra hipótesis de que niveles altos de la marca epigenética represora H3K9me3 dificultan la activación neuronal. Para evaluar más directamente si la acumulación de la marca H3K9me3 reprime la activación de las neuronas del GD, se cuantificó el nivel de

H3K9me3 en las neuronas (NeuN+) activadas (tinción positiva para Arc) y no activadas (tinción negativa para Arc) mediante un análisis de célula única.

En los animales expuestos al AN, los resultados muestran que los niveles de H3K9me3 en la capa SP son comparables en las diferentes subpoblaciones de neuronas independientemente de su estado de activación ($p=0.3252$, ANOVA). Por el contrario, en la capa IP el nivel de H3K9me3 fue significativamente menor en neuronas altamente activadas Arc ++ ($p = 0.0419$ vs Arc-; $p = 0.0420$ vs Arc +, ANOVA, Figura 11A). De manera interesante, también observamos que los niveles de H3K9me3 de las neuronas altamente activadas (Arc ++) en la capa IP son semejantes a los correspondientes en las neuronas de la capa SP, activadas o no activadas, lo que apoya la idea de que una acumulación de H3K9me3 por arriba de dichos niveles afecta negativamente los mecanismos que subyacen la activación neuronal.

En ratones HC, los resultados sugieren que los niveles de H3K9me3 son comparables en las diferentes subpoblaciones de neuronas, independientemente de su estado de activación ($P = 0.1748$, ANOVA), tanto en la capa SP como en la capa IP (Figura 11B). Sin embargo, debido a la poca cantidad de neuronas activadas en los ratones HC es necesario repetir el experimento para tener poder estadístico suficiente para llegar a conclusiones más sólidas.

En conjunto, nuestros datos muestran que las neuronas IP con alto nivel de activación en respuesta al AN (neuronas Arc++) concentran la menor cantidad de la marca H3K9me3, en comparación con la población total de neuronas de la capa IP. Esto sugiere que los niveles de la marca H3K9me3 influyen de manera negativa sobre la capacidad de activación neuronal durante un evento de aprendizaje. Así, los resultados apoyan nuestra hipótesis y son consistentes con la idea de que un nivel bajo de la marca H3K9me3 conlleva una baja represión transcripcional en las neuronas, lo que favorece su activación mediante la expresión de múltiples programas genéticos.

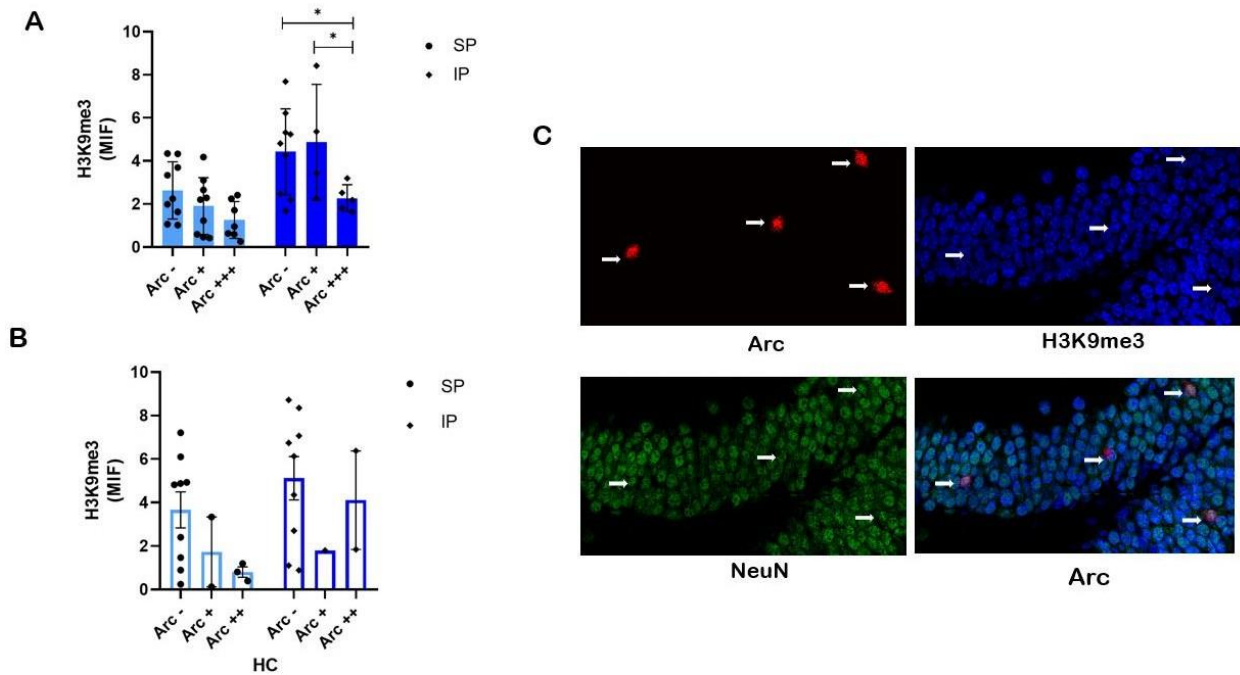


Figura 12. Las neuronas infrapiramidales activadas por el AN contienen niveles bajos de la marca H3K9me3. Se muestra el análisis de los niveles de H3K9me3 en las neuronas activadas y no activadas de la capa SP e IP del GD de ratones AN (A) y HC (B). Los datos se analizaron con una prueba ANOVA de dos vías con una prueba post hoc de Tukey ($P < 0.05$). Imágenes de microscopia confocal de las marcas Arc, H3K9me3, NeuN y la unión de las marcas. $n = 9$ rebanadas/3 ratones, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

5.6 Los niveles de H3K9me3 no se modifican después de 1hr de exposición a un AN.

Por último, se analizó si el AN *per se* modificaba el nivel de H3K9me3 en el giro dentado. La Figura 12 muestra que el nivel de H3K9me3 en el giro dentado es similar al comparar animales HC y AN ($p = 0.2811$, prueba t con corrección de Welch), tanto en la capa SP como en la IP. Lo anterior sugiere fuertemente que, en nuestras condiciones experimentales, el AN no modifica la marca epigenética estudiada en las neuronas del GD, y apoya la idea de que los niveles intrínsecos de H3K9me3 son un factor determinante para que una neurona se active.

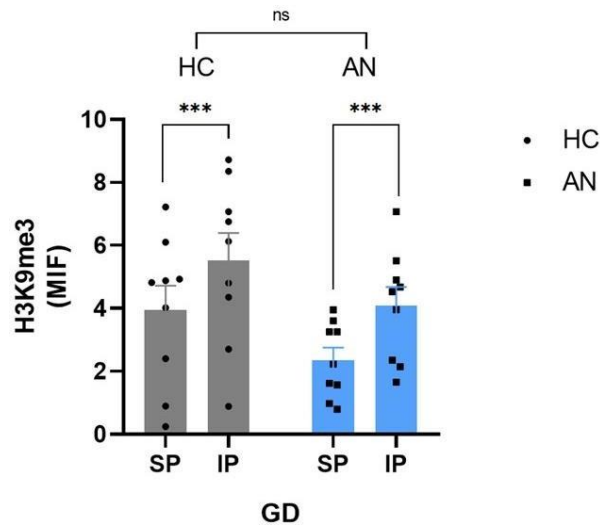


Figura 13. La exposición al AN no modifica *per se* los niveles de H3K9me3. Niveles de H3K9me3 en las capas SP e IP del GD en ratones HC y AN. n= 9 rebanadas/3 ratones, *** p< 0.001 (ANOVA de dos vías).

Así, de acuerdo con nuestros resultados la cantidad de H3K9me3 presente en cada neurona del GD determina la capacidad que tiene ésta de activarse, abriendo la posibilidad de que si la metilación en la histona H3K9 cambia también se modifique la facultad de activación de una neurona. Entonces ¿Qué podría provocar un cambio en la acumulación de H3K9me3 en las neuronas del GD? Principalmente se ha observado que la marca H3K9me3 cambia con la edad en el hipocampo. Estudios previos han indicado que la marca epigenética H3K9me3 aumenta en hipocampo de ratones de 18-20 meses en comparación con ratones de 3-4 meses (Snigdha y col., 2016). También, un estudio en hipocampo de ratón evaluó la marca H3K9me3 por inmunohistoquímica semicuantitativa en ratones de 1, 6, 12, 18 y 22 meses, observaron que los ratones de 12, 18 y 22 meses tenían más niveles de H3K9me3 en comparación con los más jóvenes (Wu y col., 2019). Además, el aumento de la marca epigenética H3K9me3 también se ha observado en tejidos somáticos de *C. elegans*, esta ganancia específica de H3K9me3 en la vejez dio como resultado la formación de nuevas regiones heterocromáticas (Li y col., 2021). El resultado se repite en otro estudio por ChIP en donde se evalúa el nivel de H3K9me3 en ratones de 3, 8 y 20 meses, y se observa que la metilación de la histona H3 (K9) se ve

modificada con la edad de manera diferente en las subregiones del hipocampo, encontrando un aumento significativo entre 3 y 8 meses en el GD (Kushwaha y col., 2020). De manera consiente con estos hallazgos, al disminuir la cantidad de H3K9me3 inhibiendo farmacológicamente a la enzima SUV39H1 (la principal encargada de trimetilar la histona 3 en la lisina 9), se observan beneficios cognitivos en animales viejos (18-20 meses) (Snigdha y col., 2016; Ionescu-Tucker y col., 2021).

Diversos informes muestran que múltiples genes relacionados con la memoria están regulados a la baja en el hipocampo envejecido como consecuencia de alteraciones epigenéticas que actúan de forma sinérgica (Snigdha y col., 2016; Barter y Foster, 2018; Singh y Thakur, 2018; Kushwaha y col., 2019). También, se han demostrado cambios epigenéticos asociados a metilación y acetilación de histonas en los promotores de diferentes IEG relacionados con la memoria. Aún más, existe un aumento de la marca H3K9me3 en el promotor del gen Arc, EGR1, Homer1 y Narp en ratones de envejecidos de 18 meses (Kushwaha y col., 2020).

A partir de las evidencias anteriormente expuestas y de nuestros resultados en ratones jóvenes, se propone que la marca epigenética H3K9me3 es crucial para el aprendizaje y la memoria dependientes de hipocampo, al modular negativamente la activación neuronal en el GD inducida por alguna experiencia. Lo anterior sugiere que la enzima SUV39H1 es un potencial blanco terapéutico para modificar el estado de la cromatina en las neuronas del GD y facilitar la activación neuronal. Queda por investigarse si nuestros resultados se reproducen en animales viejos, los cuales presentan niveles altos H3K9me3 en hipocampo.

6. CONCLUSIÓN

Los resultados demuestran por primera vez que, comparada con la capa SP, la capa IP del GD presenta un nivel mayor de la marca H3K9me3. El análisis de célula única en imágenes de rebanadas de cerebro mostró que la activación neuronal en la capa IP en respuesta a un ambiente novedoso ocurre preferentemente en neuronas con niveles bajos de H3K9me3, lo que sugiere que la acumulación de la marca epigenética H3K9me3 influye negativamente en la capacidad de activación neuronal requerida para los procesos de memoria dependiente de hipocampo.

7. REFERENCIAS

Alberini, C. M., Cruz, E., Descalzi, G., Bessières, B., Gao, V. Astrocyte glycogen and lactate: New insights into learning and memory mechanisms. *Glia*. **2018**; 6: 1244–1262.

Alves, N. D., Patrício, P., Correia, J. S., Mateus-Pinheiro, A., Machado-Santos, A. R., Loureiro-Campos, E., Morais, M., Bessa, J. M., Sousa, N., Pinto, L. Chronic stress targets adult neurogenesis preferentially in the suprapyramidal blade of the rat dorsal dentate gyrus. *Brain Structure and Function*. **2018**; 1: 415–428.

Amaral G, Scharfman E, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in brain research*. **2007**; 163: 3–22.

Asok A, Leroy F, Rayman J, Kandel R. Molecular Mechanisms of the Memory Trace. *Trends in neurosciences*. **2019**; 42: 14–22.

Barter, J. D., Foster, T. C. Aging in the Brain: New Roles of Epigenetics in Cognitive Decline. *The Neuroscientist*. **2018**; 5: 516–525.

Blalock, E. M., Chen, K.-C., Sharrow, K., Herman, J. P., Porter, N. M., Foster, T. C., Landfield, P. W. (2003). Gene Microarrays in Hippocampal Aging: Statistical Profiling Identifies Novel Processes Correlated with Cognitive Impairment. *The Journal of Neuroscience*. **2003**; 9: 3807–3819.

Bliss TV, Lomo T. Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. *J Physiol*. **1970**; 207: 2: 61.

Bramha C, Worley F, Moore J, Guzowski F. The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. **2008**; 28: 11760–11767.

Brem K, Ran K, Pascual-Leone A. Learning and memory. *Handbook of clinical neurology*. **2013**; 116: 693–737.

Bruel-Jungerman E, Davis S, Laroche S. Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*. **2007**; 13: 492–505.

Butterfield, D., Poon, H. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): A model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*. **2005**; 10: 774–783.

Chawla K, Sutherland L, Olson K, McNaughton L, Barnes A. Behavior-driven arc expression is reduced in all ventral hippocampal subfields compared to CA1, CA3, and dentate gyrus in rat dorsal hippocampus. *Hippocampus*. **2018**; 28: 178–185.

Clarys D, Isingrini M, Gana K. Aging and episodic memory: mediators of age-related differences in remembering and knowing. *Acta Psychologica*. **2002**; 109: 315-329

Cleland, J. P., Willis, E. F., Bartlett, P. F., Vukovic, J. Somatic Arc protein expression in hippocampal granule cells is increased in response to environmental change but independent of task-specific learning. *Scientific reports*. **2017**; 7: 42-77.

Council for International Organization of medical Sciences, International Council for Laboratory Animal Science. *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. **2012**

Dahan L, Rampon C, Florian C. Age-related memory decline, dysfunction of the hippocampus and therapeutic opportunities. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. **2020**; 102: 109-123.

Dudai Y, Karni A, Born J. The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*. **2015**; 88: 20–32.

Eisen, R. N. Quality management in immunohistochemistry. *Diagnostic Histopathology*. **2008**; 7: 299–307.

Erwin R, Sun W, Copeland M, Lindo S, Spruston N, Cembrowski S. A Sparse, Spatially Biased Subtype of Mature Granule Cell Dominates Recruitment in Hippocampal-Associated Behaviors. *Cell reports*. **2020**; 31: 107551.

Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. NORMA Oficial Mexicana **NOM-062-ZOO-199**. 18 de junio de **2001**.

Fanselow S, Dong W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*. **2010**; 65: 7–19.

Fritschy, J.-M. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *European Journal of Neuroscience*. **2008**; 12: 2365–2370.

Gallo T, Katche C, Morici F, Medina H, Weisstaub V. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Frontiers in behavioral neuroscience*. **2018**; 12: 79-89.

Gros, A., Lim, A. W. H., Hohendorf, V., White, N., Eckert, M., McHugh, T. J., Wang, S.-H. Behavioral and Cellular Tagging in Young and in Early Cognitive Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*. **2022**; 14: 809-879.

Gupta S, Kim S, Artis S, Molfese L, Schumacher A, Sweatt D, Paylor E, Lubin D. Histone methylation regulates memory formation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. **2010**; 30: 3589–3599.

Hainmueller T, Bartos M. Dentate gyrus circuits for encoding, retrieval and discrimination of episodic memories. *Nature reviews Neuroscience*. **2020**; 21: 153–168.

Healy S, Khan P, Davie R. Immediate early response genes and cell transformation. *Pharmacology & therapeutics*. **2013**; 137: 64–77.

Heroux, N. A., Osborne, B. F., Miller, L. A., Kawan, M., Buban, K. N., Rosen, J. B., Stanton, M. E. Differential expression of the immediate early genes c-Fos, Arc, Egr-1, and Npas4 during long-term memory formation in the context preexposure

facilitation effect (CPFE). *Neurobiology of Learning and Memory*. **2018**; 147: 128–138.

Ionescu-Tucker, A., Butler, C. W., Berchtold, N. C., Matheos, D. P., Wood, M. A., & Cotman, C. W. Exercise Reduces H3K9me3 and Regulates Brain Derived Neurotrophic Factor and GABRA2 in an Age Dependent Manner. *Frontiers in Aging Neuroscience*. **2021**;13: 98-114.

Ionescu-Tucker, A., Cotman, C. W. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. **2021**;107: 86–95.

Isingrini M, Taconnat L. Episodic memory, frontal functioning, and aging. *Revue neurologique*. **2008**; 164: S91–S95.

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. H. A novel environment-evoked transcriptional signature predicts reactivity in single dentate granule neurons. *Nature Communications*. **2018**; 1: 3084.

Knierim J. The hippocampus. *Current biology: CB*. **2015**; 25: R1116–R1121.

Kushwaha A, Thakur K. Increase in hippocampal histone H3K9me3 is negatively correlated with memory in old male mice. *Biogerontology*. **2020**; 21: 175–189.

Lee, M. Y., Lee, J., Hyeon, S. J., Cho, H., Hwang, Y. J., Shin, J.-Y., McKee, A. C., Kowall, N. W., Kim, J.-I., Stein, T. D., Hwang, D., Ryu, H. (2020). Epigenome signatures landscaped by histone H3K9me3 are associated with the synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Aging Cell*. **2020**; 6: 131-153.

Li, C.-L., Pu, M., Wang, W., Chaturbedi, A., Emerson, F. J., Lee, S. S. Region-specific H3K9me3 gain in aged somatic tissues in *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genetics*. **2021**; 9:100-119.

Lisman J, Buzsáki G, Eichenbaum H, Nadel L, Ranganath C, Redish D. Viewpoints: how the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition. *Nature neuroscience*. **2017**; 20: 1434–1447

Lu H, Liu X, Deng Y, Qing H. DNA methylation, a hand behind neurodegenerative diseases. *Frontiers in aging neuroscience*. **2013**; 5: 85.

Messaoudi E, Kanhema T, Soulé J, Tiron A, Dagate G, da Silva B, Bramham, C. R. Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. **2007**; 27: 10445–10455.

Miyashita, T., Kubik, S., Lewandowski, G., Guzowski, J. F. Networks of neurons, networks of genes: An integrated view of memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*. **2008**; 3: 269–284.

Moser M, Moser I. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*. **1998**; 8: 608–619.

Myrum C, Kittleson J, De S, Fletcher B, Castellano J, Kundu G, Becker K, Rapp P. Survey of the Arc Epigenetic Landscape in Normal Cognitive Aging. *Molecular Neurobiology*. **2020**; 57: 2727–2740.

Neves G, Cooke F, Bliss V. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nature reviews. Neuroscience*. **2008**; 9: 65–75.

Nomoto M, Inokuchi K. Behavioral, cellular, and synaptic tagging frameworks. *Neurobiology of learning and memory*. **2018**; 153(Pt A):13–20.

Okuno H. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neuroscience research*. **2011**; 69: 175–186.

Opitz B. Memory function and the hippocampus. *Frontiers of neurology and neuroscience*. **2014**; 34: 51–59.

Palop, J. J. Vulnerability of Dentate Granule Cells to Disruption of Arc Expression in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *Journal of Neuroscience*. **2005**; 42: 9686–9693.

Ramirez-Amaya V, Angulo-Perkins A, Chawla K, Barnes A, Rosi S. 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*. **2013**; 33: 1631–1639.

Robinson, N. T. M., Descamps, L. A. L., Russell, L. E., Buchholz, M. O., Bicknell, B. A., Antonov, G. K., Lau, J. Y. N., Nutbrown, R., Schmidt-Hieber, C., Häusser, M. Targeted Activation of Hippocampal Place Cells Drives Memory-Guided Spatial Behavior. *Cell*. **2020**; 6: 1586-1599.

Sauvage M, Kitsukawa T, Atucha E. Single-cell memory trace imaging with immediate-early genes. *Journal of neuroscience methods*. **2019**; 326, 108368.

Schmidt, B., Marrone, D. F., & Markus, E. J. Disambiguating the similar: The dentate gyrus and pattern separation. *Behavioural Brain Research*. **2012**; 1: 56–65.

Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R., Berger, S. L. Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell*. **2016**; 4: 822–839.

Shandilya M, Gautam A. Hippocampal Arc Induces Decay of Object Recognition Memory in Male Mice. *Neuroscience*. **2020**; 431: 193–204.

Shihan, M. H., Novo, S. G., Le Marchand, S. J., Wang, Y., Duncan, M. K. A simple method for quantitating confocal fluorescent images. *Biochemistry and Biophysics Reports*. **2021**; 25:100-116.

Shoji, H., Miyakawa, T. Age-related behavioral changes from young to old age in male mice of a C57BL/6J strain maintained under a genetic stability program.

Neuropsychopharmacology Reports. **2019**; 39:100–118.

Singh, P., Thakur, M. K. Histone Deacetylase 2 Inhibition Attenuates Downregulation of Hippocampal Plasticity Gene Expression during Aging. *Molecular Neurobiology*. **2018**; 55: 2432–2442.

Snigdha S, Prieto G, Petrosyan A, Loertscher B, Dieskau P, Overman E, Cotman W. H3K9me3 Inhibition Improves Memory, Promotes Spine Formation, and Increases BDNF Levels in the Aged Hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. **2016**; 36: 3611–3622.

Stefanelli G, Walters B, Ramzan F, Narkaj K, Tao C, Zovkic I. Chapter 15 - Epigenetic Mechanisms of Learning and Memory. *Academic Press, Molecular-Genetic and Statistical Techniques for Behavioral and Neural Research*, **2018**: 345-382.

Strange A, Witter P, Lein S, Moser I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nature reviews. Neuroscience*. **2014**; 15: 655–669.

Tonegawa S, Morrissey D, Kitamura T. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. *Nature reviews. Neuroscience*. **2018**; 19: 485–498.

Tromp D, Dufour A, Lithfous S, Pebayle T, Després O. Episodic memory in normal aging and Alzheimer disease: Insights from imaging and behavioral studies. *Ageing research reviews*. **2015**; 24: 232–262.

Wu, Z.-X., Cao, L., Li, X.-W., Jiang, W., Li, X.-Y., Xu, J., Wang, F., & Chen, G.-H. Accelerated Deficits of Spatial Learning and Memory Resulting From Prenatal Inflammatory Insult Are Correlated With Abnormal Phosphorylation and Methylation of Histone 3 in CD-1 Mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*. **2019**; 11.

You, J. C., Muralidharan, K., Fu, C. H., Park, J., Tosi, U., Zhang, X., Chin, J. Distinct patterns of dentate gyrus cell activation distinguish physiologic from aberrant stimuli. *PloS one*. 2020; 15: 232-241.

ANEXOS

Anexo 1. Composición nutrimental de la marca LabDiet, Laboratory Rodent Diet 500.

CHEMICAL COMPOSITION¹	
Nutrients²	
Protein, %	23.9
Arginine, %	1.41
Cystine, %	0.31
Glycine, %	1.21
Histidine, %	0.57
Isoleucine, %	1.14
Leucine, %	1.83
Lysine, %	1.41
Methionine, %	0.67
Phenylalanine, %	1.04
Tyrosine, %	0.71
Threonine, %	0.91
Tryptophan, %	0.29
Valine, %	1.17
Serine, %	1.19
Aspartic Acid, %	2.81
Glutamic Acid, %	4.37
Alanine, %	1.43
Proline, %	1.49
Taurine, %	0.02
Fat (ether extract), %	5.0
Fat (acid hydrolysis), %	5.7
Cholesterol, ppm	200
Linoleic Acid, %	1.22
Linolenic Acid, %	0.10
Arachidonic Acid, %	<0.01
Omega-3 Fatty Acids, %	0.19
Total Saturated Fatty Acids, %	1.56
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	1.60
Fiber (Crude), %	5.1
Neutral Detergent Fiber ³ , %	15.6
Acid Detergent Fiber ⁴ , %	6.7
Nitrogen-Free Extract (by difference), %	48.7
Starch, %	31.9
Glucose, %	0.22
Fructose, %	0.30
Sucrose, %	3.70
Lactose, %	2.01
Total Digestible Nutrients, %	76.0
Gross Energy, kcal/gm	4.07
Physiological Fuel Value⁵, kcal/gm	3.36
Metabolizable Energy, kcal/gm	3.02
Minerals	
Ash, %	7.0
Calcium, %	0.95
Phosphorus, %	0.66
Phosphorus (non-phytate), %	0.39
Potassium, %	1.18
Magnesium, %	0.21
Sulfur, %	0.36
Sodium, %	0.40
Chlorine, %	0.67
Fluorine, ppm	16
Iron, ppm	270
Zinc, ppm	79
Manganese, ppm	70
Copper, ppm	13
Cobalt, ppm	0.90
Iodine, ppm	1.0
Chromium, ppm	1.2
Selenium, ppm	0.30
Vitamins	
Carotene, ppm	2.3
Vitamin K (as menadione), ppm	1.3
Thiamin Hydrochloride, ppm	16
Riboflavin, ppm	4.5
Niacin, ppm	120
Pantothenic Acid, ppm	24
Choline Chloride, ppm	2250
Folic Acid, ppm	7.1
Pyridoxine, ppm	6.0
Biotin, ppm	0.30
B ₁₂ , mcg/kg	50
Vitamin A, IU/gm	15
Vitamin D ₃ (added), IU/gm	4.5
Vitamin E, IU/kg	42
Ascorbic Acid, mg/gm	—
Calories provided by:	
Protein, %	28.507
Fat (ether extract), %	13.496
Carbohydrates, %	57.996
*Product Code	
1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.	
2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.	
3. NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.	
4. ADF = approximately cellulose and lignin.	
5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.	

ANEXO 2. Dictamen del Comité de Bioética, Facultad de Química, UAQ.

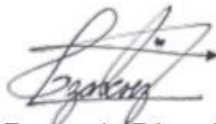
C.U., Querétaro, enero 25, 2022
No. de oficio. CBQ22/001

M. C. Alma Delia Bertadillo Jilote
Facultad de Química
Presente

At'n. Citlali Anahi Suárez Rangel

Con base en las actividades de responsabilidad para el Comité de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro en la revisión de proyectos de investigación con la participación de sujetos humanos (directamente en ensayos clínicos, investigación observacional o por empleo de muestras biológicas), así como del uso de animales de experimentación, le comunicamos que el protocolo de investigación titulado **“Papel del marcador epigenético H3K9me3 en la activación de las neuronas del giro dentado”**, del cual Usted es responsable, fue evaluado con una resolución de **aprobado**.

Sin más por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.



Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Presidente



M.I.M. David Gustavo García Gutiérrez
Representante investigador

Ccp archivo

ANEXO 3. Análisis de célula única usando el programa CellProfiler.

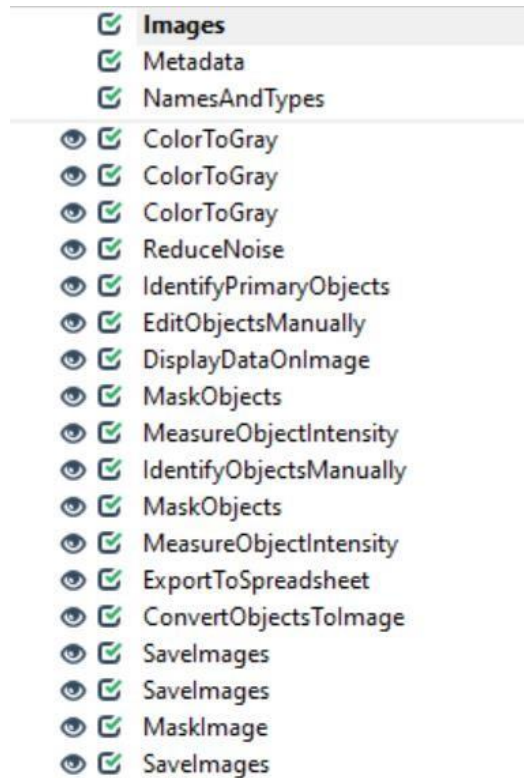
El análisis de imágenes está desempeñando un papel cada vez más importante en la investigación científica, ya que permite la cuantificación precisa de numerosos parámetros como expresión de proteínas en células y tejidos, es por eso que automatizar el proceso de análisis de imágenes da pie a realizar el procedimiento en una gran cantidad de imágenes de manera simultánea en poco tiempo.

Para este proyecto se usó CellProfiler, un software gratuito diseñado para el análisis de imágenes biológicas por el Instituto de Whitehead de Investigación Biomédica y el Instituto de Massachusetts en 2005.

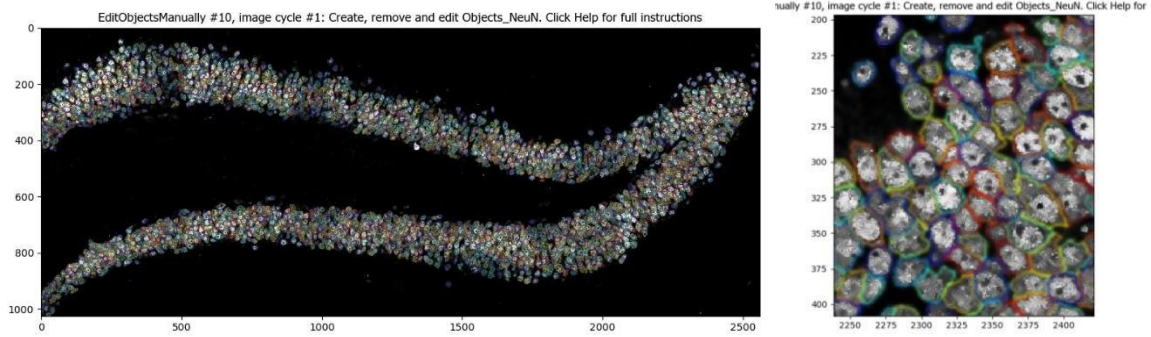
Se buscó optimizar el proceso de extracción y normalización de datos. En seguida se desglosa el procedimiento en el que se analizaron todas las imágenes de fluorescencia con parámetros ya estandarizados. En primer lugar, se editaron en el paquete de cómputo ImageJ Fiji las imágenes de NeuN y Arc, en ambas se aumentó el contraste y se eliminaron células que no eran de nuestro interés (Interneuronas o neuronas pertenecientes a CA3) o ruido que pudiera ser detectado.

Para el análisis de célula única se utilizó el programa CellProfiler. Se cargaron las 3 imágenes originales (NeuN, Arc y H3K9me3) y las dos imágenes editadas.

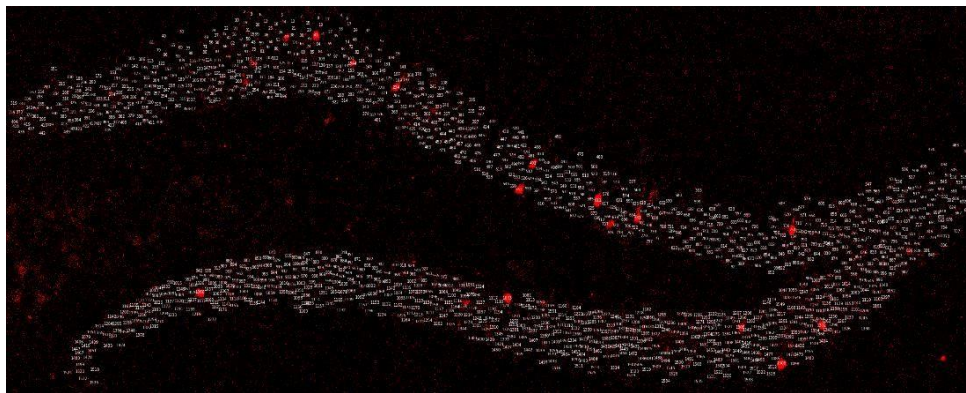
Se seleccionaron los siguientes módulos en el Pipeline y se procesaron las imágenes justo en ese orden:



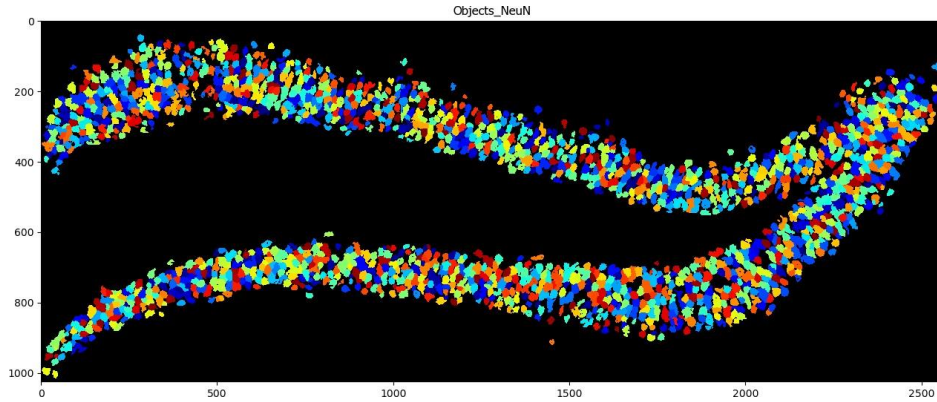
- 1) ColorToGray: Las tres imágenes de convirtieron a escala de grises.
- 2) ReduceNoise: Se redujo el ruido de la imagen editada de NeuN con el objetivo de mejorar la imagen para una fácil identificación de las células.
- 3) IdentifyPrimaryObjects: Este apartado es de los más importantes, ya que es el que identifica las células. Para esto, es necesario que le indiques al programa cuál imagen quieres que use para identificar las células, se selecciona la imagen de NeuN con contraste que se le redujo el ruido anteriormente. También debes de indicar el diámetro aproximado en pixeles que tienen las células de interés, en este caso se usó 12-35 unidades de pixeles. Para los parámetros de umbral se escogió como estrategia Global y como método Otsu. Los parámetros restantes se mantuvieron como los preestablece el programa



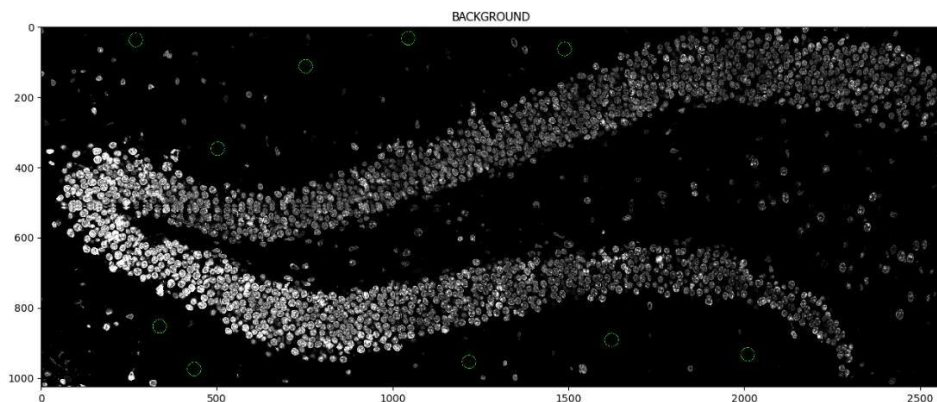
- 4) EditObjectsManually: En este módulo podemos editar los objetos que anteriormente se identificaron. Podemos eliminar, modificar o agregar objetos.
- 5) DisplayDataOnImage: Aquí se genera una imagen que contiene el número y la ubicación de cada célula (Objeto) que se identificó anteriormente. Esta imagen fue útil para corroborar el marcaje adecuado de las células Arc positivas. La imagen que se ingresó en este módulo fue la de Arc con contraste. En este punto no es necesario eliminar el ruido de fondo.



- 6) MaskObjects: Genera una máscara de los objetos identificados.

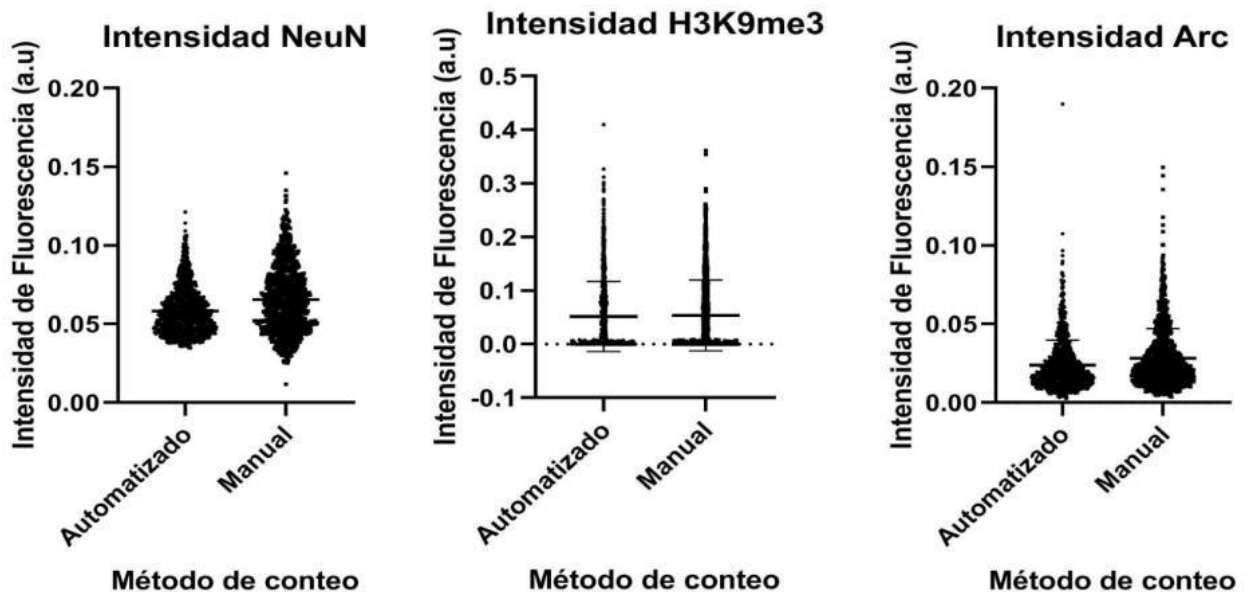


- 7) **MeasureObjectIntensity**: Mide la intensidad de regiones marcadas en la máscara. En este caso las mismas regiones de la imagen son medidas en las diferentes señales (NeuN, Arc, H3K9me3). Por lo que en las imágenes para medir debemos de seleccionar las imágenes que convertimos en escala de grises. Y en los objetos para medir, se debe escoger la máscara de las células identificadas.
- 8) **IdentifyObjectsManually**: Este apartado se seleccionó para encontrar la intensidad de fondo de las imágenes, la cual será útil en el procesamiento de los datos. Aquí se seleccionó la imagen de H3K9me3 en escala de grises y se eligieron al azar 5 zonas de la parte superior de la imagen y 5 de la parte inferior cuidando que no se seleccione ninguna célula.



- 9) MaskObjects, MeasureObjectIntensity: Volvemos a realizar el mismo procedimiento que antes se describió; hacer una máscara de los objetos y medir su intensidad en las imágenes de NeuN, Arc y H3K9me3.
- 10) ExportToSpreadsheet: Este módulo sirve para exportar los datos de intensidad de que se midieron. Se debe seleccionar la carpeta en donde se van exportar los datos y con qué nombre. En este caso solo exportamos los datos de intensidad, así que nos dirigimos a “select measurements” y seleccionar “Intensity” en los apartados de las dos mascarar utilizadas.
- 11) ConvertObjectsToImage: Este apartado nos ayuda a convertir los objetos de la máscara en una imagen que posteriormente puede ser transformada nuevamente a una máscara de objetos para ser usado en nuevas mediciones.

Por último, se comparó el análisis de imágenes usando CellProfiler con el método de conteo automático (parámetros estandarizados) y método de conteo manual.



En síntesis, el método de conteo automatizado es comparable con el método manual en cada marca (NeuN, H3K9me3, Arc) tanto en el número de células detectadas, como en la intensidad que cada una de ellas arroja.

Con estos resultados podemos decir que el pipeline del CellProfiler es óptimo para la identificación y cuantificación de intensidad de neuronas en imágenes de microscopia confocal de giro dentado de ratones. Además, muestra la ventaja de que requiere un menor tiempo y esfuerzo en comparación con el conteo manual y teniendo el mismo desempeño.