



Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Córdoba

TESINA DE GRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

*Regulación epigenética de la expresión de Neurogenina 3 en
hipotálamo de ratón*

Tesinista: Villarreal, Macarena
Directora: Dra. Cisternas, Carla Daniela
Co-directora: Dra. Cambiasso, María Julia

Laboratorio de Neurofisiología
Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra
INIMEC-CONICET-UNC



I N I M E C

Córdoba, Argentina

-2023-

Tesina de grado para optar por el título de Biólogo

Regulación epigenética de la expresión de Neurogenina 3 en hipotálamo de ratón

Alumna: Villarreal, Macarena

Directora: Dra. Cisternas, Carla Daniela

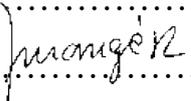
Co-directora: Dra. Cambiasso, María Julia

Tribunal Examinador:

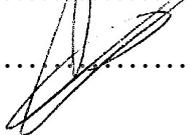
Dra. Musri, Melina

Firma.....

Dra. Rivarola, María Angélica

Firma.....

Dr. Unsain, Nicolas

Firma.....

Calificación: 10 (diez)

Fecha: 27 de junio de 2023

No te rindas

*No te rindas, aun estas a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,
liberar el lastre, retomar el vuelo.*

*No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros y destapar el cielo.*

*No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frio queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se esconda y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque la vida es tuya y tuyo también el deseo,
porque lo has querido y porque te quiero.*

*Porque existe el vino y el amor, es cierto,
porque no hay heridas que no cure el tiempo,
abrir las puertas quitar los cerrojos,
abandonar las murallas que te protegieron.*

*Vivir la vida y aceptar el reto,
recuperar la risa, ensayar el canto,
bajar la guardia y extender las manos,
desplegar las alas e intentar de nuevo,
celebrar la vida y retomar los cielos,*

*No te rindas por favor no cedas,
aunque el frio queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque cada día es un comienzo,
porque esta es la hora y el mejor momento,
porque no estás sola,
porque yo te quiero.*

Mario Benedetti

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Angelica Rivarola, Melina Musri y Nicolas Unsain, mi tribunal de tesina. Por sus correcciones y aportes para mejorar mi trabajo, por su comprensión y el compromiso con el que llevaron adelante esta tarea.

A mi directora, la Dra. Carla Cisternas, por su dedicación y compromiso en la dirección de esta tesina, por acompañarme y guiarme en cada paso, por estar siempre presente cuando lo necesite, por su paciencia, sus enseñanzas y consejos. Gracias por brindarme las herramientas necesarias y por ayudarme a superar los desafíos que se presentaron en el camino.

A mi Co-Directora, la Dra. María Julia Cambiasso, gracias por recibirme en su laboratorio y brindarme los recursos y el espacio para realizar mi tesina, por acompañarme y guiarme compartiendo sus conocimientos, su sabiduría, su experiencia, y pasión por la investigación.

A mis compañeras de laboratorio, Ro, Juli, Sabri, Cami y Coqui, gracias por su amistad, compañía y buena onda, por ayudarme con los experimentos y por sus palabras de aliento cuando no todo salía bien.

A las autoridades del Instituto Ferreyra, por brindarme las condiciones necesarias para realizar mi tesis; y a todo el personal técnico de cultivo y bioterio por su imprescindible ayuda con los experimentos con animales.

A la facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba, y a todos sus profesores y profesoras por la formación recibida en el transcurso de mi formación académica. Agradezco sus enseñanzas, su pasión por la docencia y su dedicación en transmitir conocimientos.

A mis amigues y compañeros de carrera, gracias por hacer que este camino sea más fácil y enriquecedor, por tantas horas de estudio y cursada juntas. Por estar presentes en los momentos de alegría y también en los momentos de desafíos académicos. Un agradecimiento especial para Lu, Mari y Male gracias por su amistad, sin dudas el mejor regalo de esta etapa ha sido conocerlas.

Gracias a mis amigas de toda la vida, Luji y Viki, por su amistad tan sincera e incondicional, por estar siempre para mí y prestarme su oído y su hombro cada vez que lo necesite.

A mi familia, mis padres, hermanos y demás seres queridos quienes siempre han estado a mi lado, les agradezco por su cariño, comprensión y respaldo a lo largo de toda mi formación académica. Sin su apoyo incondicional, este logro no habría sido posible.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	5
Lista de genes.....	6
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
MATERIALES Y METODOS.....	20
1. Animales.....	20
2. Genotipificación de ratones FCG.....	20
3. Obtención de muestras.....	22
4. Análisis de la expresión génica relativa.....	23
5. Tratamiento neonatal con testosterona.....	25
EXPERIMENTOS REALIZADOS.....	26
1. Expresión de histona metiltransferasas (HMT) durante el desarrollo.....	26
1.1. Expresión de HMT antes y durante el periodo crítico.....	26
1.2. Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de <i>Ngn3</i> y <i>Ezh2</i>	26
2. Expresión de ADN metiltransferasas (DNMTs) durante el desarrollo.....	27
2.1. Expresión de DNMTs antes y durante el periodo crítico	27
2.2. Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de DNMTs.....	27
3. Expresión de enzimas implicadas en la demetilación del ADN durante el desarrollo.....	27
3.1. Expresión de enzimas implicadas en la demetilación del ADN antes y durante el periodo crítico.....	27
3.2. Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de <i>Tet3</i>	27
4. Análisis de resultados.....	28

RESULTADOS.....	29
1. Expresión de histona metiltransferasas (HMT) durante el desarrollo.....	29
1.1. Expresión de HMT antes y durante el periodo crítico.....	29
1.2. Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de <i>Ngn3</i> y <i>Ezh2</i>.....	32
2. Expresión de ADN metiltransferasas (DNMTs) durante el desarrollo.....	33
2.1. Expresión de DNMTs antes y durante el periodo crítico	33
2.2. Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de DNMTs.....	35
3. Expresión de enzimas implicadas en la demetilación del ADN durante el desarrollo.....	36
3.1. Expresión de enzimas implicadas en la demetilación del ADN antes y durante el periodo crítico.....	36
3.2. Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de <i>Tet3</i>.....	39
DISCUSIÓN.....	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

5caC: 5-carboxilcitosina

5fC: 5-formilcitosina

5hmC: 5-hidroximetilcitosina

5mC: 5-metilcitosina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNasa: enzima desoxirribonucleasa

ADNc: ADN complementario

ANOVA: análisis de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosómico

AZA: 5'-azadeoxicitidina

BER: reparación por escisión de base

bHLH: factores de transcripción “*basic Helix-Loop-Helix*”

CpG: regiones del ADN enriquecidas en guanina y citosina

DNMTs: ADN metiltransferasas

DO: densidad óptica

E2: 17 β -estradiol

E15: 15 días de edad gestacional

E17: 17 días de edad gestacional

EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético

FCG: modelo murino transgénico de los cuatro genotipos o “*Four Coure Genotypes*”

H3: histona tipo 3

H3K4: residuo de lisina en la posición 4 de histonas tipo 3

H3K9: residuo de lisina en la posición 9 de histonas tipo 3

H3K27: residuo de lisina en la posición 27 de histonas tipo 3

H3K36: residuo de lisina en la posición 36 de histonas tipo 3

H3K9me2/me3: di o trimetilación de H3K9

H3K27me2/me3: di o trimetilación de H3K27

HMTs: histona metiltransferasas

HT: hembra testosterona

HV: hembra vehículo

HVM: hipotálamo ventromedial
MF1: modelo murino salvaje
MSY: región específica de macho en el cromosoma Y
MV: macho vehículo
PN0: día de nacimiento
PN1: día posnatal 1
PN10: día posnatal 10
pb: pares de bases nucleotídicas
PBS: solución salina tamponada con fosfato
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PMTs: modificaciones postraduccionales de las histonas
PRC2: complejo represivo Polycomb o “*Polycomb repressive complex*”
qPCR: PCR cuantitativa en tiempo real
RT-PCR: PCR de retrotranscripción
SAM: s-adenosilmetionina
T: Testosterona
TA: temperatura ambiente
TBE: solución tampón de Tris/borato/EDTA
TBS: solución salina tamponada con Tris
TDG: ADN glicosilasa de timina
TET: metilcitosina dioxigenasas de translocación diez-once
TTBS: TBS conteniendo Tween-20 0.1%
UV: radiación ultravioleta
XXh: hembra gonadal con complemento cromosómico XX
XXm: macho gonadal con complemento cromosómico XX
XYh: hembra gonadal con complemento cromosómico XY
XYm: macho gonadal con complemento cromosómico XY

LISTA DE GENES

(Ratón doméstico, *Mus musculus*)

18S o Rn18: ARN ribosomal 18S

Dnmt1: ADN metiltransferasa (citosina-5) 1

Dnmt3a: ADN metiltransferasa 3A

Dnmt3b: ADN metiltransferasa 3B

Ezh1: potenciador de la subunidad 2 del complejo represivo zeste 1 polycomb

Ezh2: potenciador de la subunidad 2 del complejo represivo zeste 2 polycomb

G9a o Ehmt2: histona eucromática lisina N-metiltransferasa 2

Kdm6a o Utx: demetilasa 6A específica de lisina (K)

Myog: miogenina

Ngn3 o Neurog3: neurogenina 3

Sry: región determinante de sexo del cromosoma Y

Ssty: transcritto específico de espermiogénesis en el Y

Tet1: tet metilcitosina dioxigenasa 1

Tet2: tet metilcitosina dioxigenasa 2

Tet3: tet metilcitosina dioxigenasa 3

RESUMEN

Palabras claves: *Ngn3*, diferenciación sexual, cromosomas sexuales, hipotálamo, metilación de histonas, metilación del ADN.

La diferenciación sexual del cerebro es un proceso complejo que ocurre durante el desarrollo temprano, durante este proceso diversos factores como los cromosomas sexuales y las hormonas gonadales actúan, e interactúan entre sí por medio de diferentes mecanismos epigenéticos, para causar o eliminar las diferencias sexuales en el cerebro. En la presente tesina nos propusimos indagar sobre algunos mecanismos epigenéticos que participan en la diferenciación sexual del cerebro antes y durante el periodo crítico, enfocándonos particularmente en aquellos con potencialidad para regular la expresión génica de Neurogenina 3 (*Ngn3*). Para ello evaluamos en tejido de hipotálamo en ratones *wild type* y transgénicos del modelo Four Coure Genotypes (FCG) al día embrionario 15 (E15) y postnatal 1 (PN1), la expresión génica de enzimas implicadas en la metilación de histonas y en la metilación/demetilación del ADN, así como también la expresión de *Ngn3* en ambas edades. Evidencias previas de nuestro laboratorio demuestran que la demetilasa de histona KDM6a presenta una expresión sexualmente dimórfica a E15 y está involucrada en la regulación de la expresión de *Ngn3*. Es por ello que en este trabajo evaluamos el papel de las metiltransferasas de histona EZH1 y EZH2. *Ezh2* y *Ezh1* presentaron una expresión sexualmente dimórfica a E15 y PN1 respectivamente, la expresión de estas enzimas tuvo correlación con la expresión de *Ngn3* observada en ambas edades. El análisis de la expresión en tejido de animales FCG no reveló un efecto de los cromosomas sexuales en ambas enzimas. El tratamiento con testosterona a PN0-PN1 no afectó la expresión de *Ngn3*, ni la expresión de *Ezh2*. En cuanto a las enzimas que participan en la metilación y demetilación del ADN, encontramos que *Dnmt3a* presenta una expresión sexualmente dimórfica a E15, y *Tet3* en ambas edades. El patrón de expresión de ambas enzimas no tuvo correlación con el perfil de expresión encontrado para *Ngn3*. El tratamiento con testosterona no afectó la expresión de las enzimas en estudio. Estos resultados señalan a las metiltransferasas de histonas EZH2 y EZH1 como participantes activos en la regulación sexo-específica de la expresión de *Ngn3*, y por ende en el proceso de diferenciación sexual del cerebro.

INTRODUCCIÓN

Diferenciación sexual del cerebro

El cerebro es un órgano sexualmente dimórfico. La diferenciación sexual del cerebro es un proceso que ocurre temprano en el desarrollo y en el cual participan múltiples factores para organizar los circuitos neuronales necesarios para la expresión de características sexualmente dimórficas en el organismo (Arnold, 2017a). Las diferencias sexuales en el cerebro pueden categorizarse como estructurales, neuroquímicas o moleculares. Las diferencias estructurales van desde lo macroscópico (diferencias en el área de la región del cerebro, el volumen, el número de células o la densidad de proyección) hasta lo microscópico (diferencias en el tamaño de las células, la complejidad o morfología de las neuritas, la longitud de las dendritas y el número de espinas). Las neuroquímicas incluyen diferencias en los niveles de neurotransmisores, enzimas u hormonas locales; mientras que las diferencias sexuales moleculares ocurren en la activación de la cascada de señalización, la expresión génica y las modificaciones epigenéticas. En el hipotálamo se han encontrado diferencias sexuales de los tres tipos: diferencias en el número de células, morfología celular y conectividad sináptica; incluidas diferencias en la morfología de las neuritas y dendritas, el número o densidad de las espinas dendríticas y el número o tipo de sinapsis, así como diferencias en el tamaño y el volumen de ciertas regiones (Lenz & McCarthy, 2010).

Hay dos factores principales que contribuyen en el proceso de diferenciación sexual: (1) un entorno trófico específico del sexo debido a las hormonas gonadales y (2) un patrón genético y epigenético distinto para machos y hembras generado por diferencias en la expresión de genes ligados a los cromosomas sexuales X e Y (Arnold *et al.*, 2016; 2017b).

Efectos de los esteroides gonadales

La hipótesis clásica de la diferenciación sexual del cerebro, también conocida como hipótesis organizacional/activacional, sostiene que los dimorfismos sexuales en el sistema nervioso central son consecuencia de la acción de los esteroides gonadales, siendo responsables de acciones organizacionales y activacionales (Arnold & Gorski, 1984). Las acciones organizacionales describen los efectos que tienen las hormonas gonadales en el modelado sexualmente dimórfico de los circuitos neuronales durante el desarrollo perinatal, mientras que las acciones activacionales son efecto de los esteroides sexuales sobre estos circuitos en

el cerebro adulto, controlando respuestas fisiológicas y comportamentales sexualmente dimórficas, que incluyen por ej. la conducta sexual de cópula, de juego, cuidado parental, etc. Los efectos organizacionales son considerados permanentes mientras que los activacionales son reversibles y transitorios (Arnold & Gorski, 1984).

A lo largo del desarrollo perinatal, se reconoce un periodo crítico durante el cual el cerebro es sensible al ambiente hormonal. En ratones este periodo se extiende desde el día gestacional 17 (E17) al postnatal 10 (PN10), que corresponde con el pico de secreción testicular que en ratones ocurre alrededor de E18 (O'Shaughnessy *et al.*, 1998, 2006). Durante este periodo la testosterona (T) producida por los testículos en desarrollo llega al cerebro y organiza los circuitos cerebrales masculinos. En las hembras la ausencia de secreciones gonadales durante este periodo conduce al desarrollo de un cerebro femenino (McCarthy, 2008; Negri-Cesi *et al.*, 2008). La T desempeña un rol importante en el desarrollo morfológico, neuroendocrino y conductual del cerebro de roedores (McEwen *et al.*, 1977). En los primeros estudios donde se evaluó la hipótesis organizacional/activacional se inyectó T a crías hembra recién nacidas o, como en el trabajo de Phoenix *et al.* (1959), se trató con T a hembras preñadas para masculinizar el cerebro de las crías hembra. Cuando ratas hembras son expuestas a T exógena antes de PN10 carecen de receptividad sexual y son estériles en la adultez (Barracough & Gorski, 1961; Barracough, 1961), si luego en la vida adulta se les administra andrógenos exhiben un aumento en el número de montas en presencia de una hembra receptiva (Baum, 1979; Whalen, 1964). Es decir, el cerebro de las hembras es masculinizado cuando es expuesto a esteroides exógenos durante el período crítico (McCarthy, 2008).

Rol del complemento cromosómico sexual

Existen evidencias que reportan características sexualmente dimórficas que no pueden ser explicadas por la acción organizacional de los esteroides gonadales (Arnold, 2009; Caeiro *et al.*, 2011; Dadam *et al.*, 2014) o que aparecen antes de que los niveles hormonales incrementen significativamente. Estas y otras evidencias llevaron a plantear la existencia de diferencias intrínsecas entre las células XX vs. XY antes de haber sido expuestas a los esteroides *in utero* (Beyer *et al.*, 1991; Burgoyne *et al.*, 1995; Cambiasso *et al.*, 2000; Dewing *et al.*, 2003; Reisert & Pilgrim, 1991; Scerbo *et al.*, 2014).

En animales con cromosomas sexuales heteromórficos, las diferencias sexuales en el fenotipo se originan por los efectos desiguales de los genes que portan, debido a que son los únicos factores que difieren consistentemente entre los cigotos masculino y femenino (Burgoyne & Arnold, 2016). En mamíferos, los complementos cromosómicos sexuales son XX (hembra) y XY (macho). Únicamente el cromosoma Y porta el gen *Sry* (del inglés “*Sex determining region Y*”), el cual comienza a expresarse en la embriogénesis temprana e inicia el proceso de diferenciación testicular. En los individuos XX, ciertos genes autosomales y otros ligados al cromosoma X, inducen el programa de diferenciación de los ovarios (Goodfellow & Lovell-Badge, 1993; Makela *et al.*, 2019). Desde el preciso momento en el que se establece el cigoto y el complemento cromosómico sexual del nuevo individuo queda definido, las diferencias sexuales en la expresión de los genes ligados a los cromosomas X e Y comienzan a manifestarse, tan pronto como se activa el transcriptoma embrionario, y no se detienen en la determinación gonadal sino que continúan a lo largo de toda la vida causando numerosas diferencias sexuales en el fenotipo (Arnold, 2017b; Burgoyne & Arnold, 2016; Pfaff & Christen, 2013).

Los primeros estudios de los efectos de los cromosomas sexuales como causantes de diferencias sexuales, se basaron en observaciones en lugar de manipulación experimental, debido a la dificultad para manipular el número de cromosomas sexuales (Arnold, 2019). En las últimas décadas el avance de la ingeniería genética permitió el desarrollo de modelos animales transgénicos. Entre ellos, el modelo de ratones transgénicos de los cuatro genotipos o FCG (por las siglas en inglés “*Four Core Genotypes*”) (Figura 1). Este modelo conjuga la delección del gen *Sry* del cromosoma Y (Y^-), con su re inserción en el autosoma 3 (Itoh *et al.*, 2015). De esta manera, se desvincula la herencia del cromosoma Y de la herencia del gen *Sry*, generando ratones cuyo fenotipo gonadal es independiente del complemento cromosómico sexual. Los cuatro genotipos que se obtienen son: machos XX *Sry*, hembras XX, machos XY^-Sry y hembras XY^- . Este modelo permite la evaluación independiente de las hormonas sexuales y los efectos de los cromosomas o la interacción entre ambos factores (Burgoyne & Arnold, 2016).

Un gran número de variables que difieren en machos y hembras están influenciadas por el complemento cromosómico sexual, estas incluyen diferencias sexuales estructurales que, por ejemplo, determinan un patrón de expresión génica específico o, diferencias en la innervación de vasopresina, así como también diferencias en comportamiento agresivo y parental, nocicepción, abuso de alcohol, susceptibilidad a enfermedades neurales, conductas

sociales (Abel *et al.*, 2011; Barker *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2008, 2009; De Vries *et al.*, 2002; Gatewood *et al.*, 2006; Gioiosa *et al.*, 2008; Smith-Bouvier *et al.*, 2008). Algunas de estas diferencias sexuales se derivan de los efectos directos de genes que escapan a la inactivación del X, y por ende están presentes en dos copias en hembras y una copia en machos (Arnold, 2022; McCarthy & Arnold, 2011).

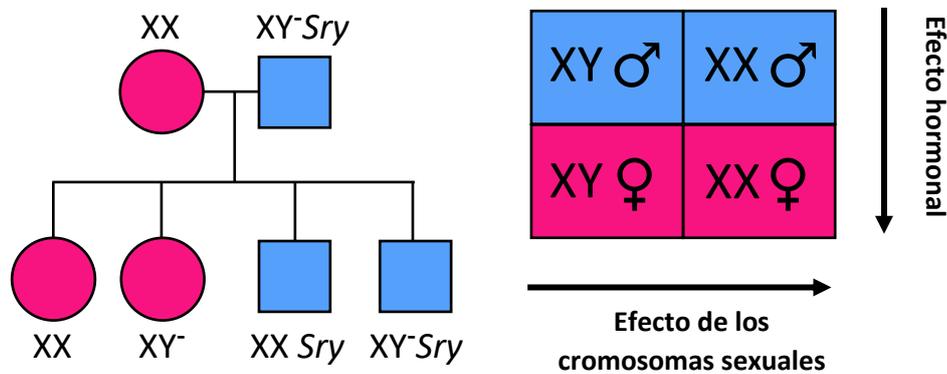


Figura 1. Modelo de ratones transgénicos de los cuatro genotipos (FCG). El gen *Sry* determinante de testículos se deletionó del cromosoma Y (Y^-) y se insertó en un autossoma, de esta manera se independiza el sexo gonadal de los cromosomas sexuales. La cruce de un macho XY^-Sry con una hembra XX genera los cuatro genotipos: hembras XY y XX , machos XY y XX . Este modelo permite estudiar las diferencias provocadas por las hormonas gonadales, o por el complemento cromosómico sexual, así como su interacción. ♂: macho gonadal; ♀: hembra gonadal. Adaptado de Arnold *et al.*, 2004.

Modelo unificado de diferenciación sexual

En la actualidad, y en base a la evidencia expuesta, se plantea un **modelo unificado de diferenciación sexual**, que incluye los efectos (y la interacción) de numerosos factores específicos del sexo, hormonales, genéticos y epigenéticos, que actúan para causar o eliminar las diferencias sexuales en el cerebro (Arnold, 2019; McCarthy & Arnold, 2011).

El rol de la epigenética en la diferenciación sexual

Históricamente, la regulación génica se ha enfocado en las variaciones del fenotipo causadas por modificaciones en la secuencia genética primaria, actualmente gracias a los avances en el campo de la epigenética se sabe que estas variaciones también están inducidas por cambios epigenéticos transitorios o de larga duración que alteran el grado de compactación de la cromatina (Arnold *et al.*, 2012). Estos cambios tempranos en el desarrollo pueden alterar el

fenotipo del animal mucho más tarde en la vida (Zhang & Meaney, 2010), esta persistencia en las modificaciones epigenéticas, las posiciona como un mecanismo candidato para explicar algunos efectos de larga duración de las hormonas gonadales, por ejemplo, los efectos organizacionales ejercidos durante el desarrollo (Arnold *et al.*, 2012).

El término epigenética -modificaciones covalentes en el ADN o las histonas que influyen en la expresión génica- fue establecido por Waddington (1957). Dentro de los mecanismos epigenéticos más conocidos se encuentran la metilación del ADN y las modificaciones postraduccionales de las histonas (PMTs, por las siglas en inglés *posttranslational modifications*) (Musri & Párrizas, 2013). De acuerdo a la hipótesis del “código de histonas” el patrón de PMTs que conforman la cromatina de un determinado gen, regula el resultado transcripcional del mismo (Jenuwein & Allis, 2001; Musri & Párrizas, 2013; Turner, 2000). Estos mecanismos son llevados a cabo por enzimas que son clasificadas de acuerdo a su función como escritoras o *writers*, aquellas encargadas de agregar modificaciones como las ADN metiltransferasas o histona metiltransferasas; y las borradoras o *erasers* cuya función es eliminar estas marcas, como las histona demetilinas.

Los mecanismos epigenéticos juegan un papel importante en la función cerebral mediante la regulación de la expresión génica. Por ejemplo, la metilación del ADN afecta la actividad transcripcional al reclutar o inhibir la unión de factores de transcripción al ADN (Xie *et al.*, 2023). En los mamíferos, el ADN puede ser modificado por metilación de los residuos de citosina en dinucleótidos CpG (Cedar & Bergman, 2009), esta acción es llevada a cabo por una familia de enzimas denominadas ADN metiltransferasas (DNMTs). Las DNMTs transfieren un grupo metilo de la s-adenosilmetionina (SAM) a la citosina en la posición 5, formando la 5-metilcitosina (5mC). Durante el desarrollo y la diferenciación celular, el establecimiento inicial de patrones de 5mC, denominado metilación *de novo*, se basa predominantemente en la actividad tanto de DNMT3a como de DNMT3b, mientras que DNMT1 realiza una función de mantenimiento en el transcurso de la replicación del ADN para garantizar la propagación de patrones de 5mC (Okano *et al.*, 1999; Vertino *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2023). Como la metilación del ADN es un mecanismo dinámico y reversible, existe otra familia de enzimas, las metilcitosina dioxigenasas de translocación diez-once (TET), conocidas por su rol en la demetilación del ADN. Estas enzimas son responsables de catalizar la oxidación de 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC). En mamíferos esta familia incluye 3 variantes TET1, TET2 y TET3, que comparten un dominio catalítico de homología en su extremo C terminal. Luego, 5fC y

5caC son reconocidos específicamente por la ADN glicosilasa de timina (TDG) para desencadenar el proceso de reparación por escisión de base (BER), lo que conduce a su conversión final en una citosina no metilada (Ito *et al.*, 2010; Wu & Zhang, 2011; Xie *et al.*, 2023). Los genes activos, promotores, sitios de unión a factores de transcripción y potenciadores específicos del cerebro normalmente están enriquecidos en 5hmC, mientras que esta marca está ausente en las regiones intergénicas (Hahn *et al.*, 2013; Szulwach *et al.*, 2011). Es decir, 5hmC es una marca epigenética en sí misma, que generalmente promueve la expresión génica, mientras que 5mC es frecuentemente asociada con el silenciamiento génico (McCarthy, 2011; Nugent *et al.*, 2015). De esta manera y, en base a las evidencias expuestas previamente, hoy se acepta que la metilación del ADN es un proceso dinámico, especialmente durante el desarrollo del cerebro, responsable de cambiar el estado transcripcional de determinados genes durante el desarrollo, estos cambios pueden ocurrir en respuesta a factores ambientales y hormonales, entre otros (McCarthy, 2011). En los últimos años, la metilación del ADN ha sido implicada en el proceso de diferenciación sexual del cerebro en mamíferos. Se han reportado diferencias sexuales en cuanto al grado de metilación, expresión y actividad enzimática de DNMTs y TET en el cerebro de roedores neonatos, y se encontró que algunas de estas diferencias son reguladas por el efecto de las hormonas sexuales (Cisternas *et al.*, 2020b; McCarthy *et al.*, 2009; Nugent *et al.*, 2015; Schwarz *et al.*, 2010). Otros mecanismos epigenéticos también involucrados en la diferenciación sexual del cerebro son las PMTs. En las últimas décadas, han emergido estudios que evidencian la existencia de dimorfismos sexuales en relación a los patrones de acetilación y metilación de las histonas en el cerebro (Matsuda *et al.*, 2011, 2012; Murray *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2009). Una de las principales modificaciones que sufren las histonas es la metilación de lisinas, sin embargo, hasta el momento es escasa la información sobre su rol en la diferenciación sexual del cerebro (Tsai *et al.*, 2009). La metilación es una marca que se asocia tanto con la cromatina transcripcionalmente activa como inactiva, dependiendo del residuo que es metilado y el grado de metilación (mono-, di-, o trimetilación; me1, me2, me3). Por ejemplo, la metilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4) y H3K36 son marcas asociadas con genes transcripcionalmente activos, mientras que H3K9me2/me3 y H3K27me2/me3 son marcas presentes en la cromatina condensada y están asociadas al silenciamiento génico (Ferrari *et al.*, 2014; Greer & Shi, 2012; Pan *et al.*, 2018). Las metiltransferasas EZH1 y EZH2 están presentes en células de mamíferos y son las encargadas de introducir grupos metilo en H3K27, estas dos enzimas forman parte del complejo de represión Polycomb2 (PRC2) (Pan *et al.*, 2018). Durante mucho tiempo,

H3K27me3 se consideró una marca epigenética estable que no se podía eliminar, hasta la identificación de las enzimas KDM6a y KDM6b como H3K27me3 demetilinas (Tsukada *et al.*, 2006).

A pesar de que la metilación del ADN y la modificación de histonas se llevan a cabo por diferentes reacciones químicas y requieren diferentes conjuntos de enzimas, parece haber una relación biológica entre los dos sistemas que juega un papel en la modulación de la represión génica en el organismo (Cedar & Bergman, 2009). Un ejemplo de cooperación entre dos sistemas clave de represión epigenética es el reclutamiento de DNMTs por parte de EZH2. En un estudio se demostró que EZH2 interactúa físicamente con DNMTs, e indican que la unión de DNMTs a varios genes reprimidos por EZH2 depende de la presencia de EZH2 (Viré *et al.*, 2006), de esta manera ambas marcas represivas cooperan en el silenciamiento génico. En otro estudio reciente encontraron que la enzima G9a, metiltransferasa H3K9, y el complejo PRC2 interactúan físicamente y la activación de G9a podría aumentar el reclutamiento de PRC2 a los promotores de un conjunto de genes, cabe señalar que PRC2 y G9a comparten un significativo número de genes *targets* entre ellos genes involucrados en el desarrollo y la diferenciación neuronal, sugiriendo una cooperación entre ambas marcas para lograr el silenciamiento epigenético en ciertas regiones de la cromatina (Mozzetta *et al.*, 2014). Otro ejemplo de cooperación para lograr la represión génica, está dado por la interacción entre G9a y DNMTs, en primera instancia G9a provoca la metilación local de la histona H3K9me3 y luego recluta a DNMT3a/3b que realizan una metilación *de novo* en el promotor (Epsztejn-Litman *et al.*, 2008). Aunque el mecanismo molecular preciso de estas interacciones epigenéticas aún no es bien comprendido, la evidencia acumulada sugiere que el *cross-talk* entre diferentes modificaciones epigenéticas está involucrado en procesos de transcripción génica.

***Ngn3* y su expresión sexualmente dimórfica en el hipotálamo**

Neurogenina 3 (*Ngn3*) es un gen autosomal que pertenece a un grupo de genes proneurales que codifican para factores de transcripción del tipo bHLH. En el sistema nervioso es requerido para la especificación de los subtipos neuronales que controlan la homeostasis energética en el hipotálamo ventromedial, promueve el desarrollo de las neuronas Pomc+ e inhibe el desarrollo de las neuronas Npy+, además regula la neurogénesis en retina e hipotálamo (Pelling, *et al.*, 2011; Salama-Cohen *et al.*, 2006). En estudios donde se utilizó

el modelo FCG, se demostró que el complemento cromosómico sexual determina la expresión sexualmente dimórfica de *Ngn3* en el hipotálamo ventromedial en desarrollo, en donde cultivos de neuronas hipotalámicas a E15 provenientes de embriones XX presentan mayores niveles de *Ngn3* que los provenientes de embriones XY, independientemente del sexo gonadal. A su vez, las neuronas XX muestran un crecimiento y maduración *in vitro* más acelerado que las neuronas XY, dependientes de la mayor expresión de *Ngn3* (Cisternas *et al.*, 2020a; Scerbo *et al.*, 2014). Estos estudios indican que la expresión sexualmente dimórfica de *Ngn3* está regulada por los cromosomas sexuales, implicados tanto en la generación de diferencias sexuales como en la tasa de diferenciación neuronal (Scerbo *et al.*, 2014). En un estudio reciente de nuestro laboratorio se encontró que el hipotálamo de ratones hembra muestra mayores niveles de expresión de la enzima KDM6A demetilasa de histonas 3 (H3) (Cabrera Zapata *et al.*, 2021), la cual elimina grupos di o trimetilos asociados al residuo de lisina (K) en la posición 27 (H3K27me2/me3) (Agger *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007). El gen que codifica KDM6a se encuentra en el cromosoma X y escapa a la inactivación, y está involucrado en la regulación diferencial de *Ngn3* entre machos y hembras. Cabrera Zapata *et al.* (2021) encontraron que el bloqueo de KDM6a produce una disminución en los niveles de *Ngn3* en neuronas XX. A su vez, en recientes experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina, se demostró que existe un enriquecimiento de marcas H3K27me3 en el promotor del gen que codifica para *Ngn3* en neuronas hipotalámicas de macho a E15 (Cabrera Zapata *et al.*, 2022). Por otra parte, en líneas celulares de cáncer de mama se demostró una regulación negativa de la expresión de *Ngn3* por parte de DNMT3b, la hipermetilación del promotor da como resultado la represión de *Ngn3* y este efecto se revierte con la inhibición farmacológica de la metilación del ADN con 5'-azadeoxicitidina (AZA) (Zhou *et al.*, 2017). En un estudio similar en líneas celulares humanas se demostró que la inhibición con AZA aumenta los niveles de expresión de *Ngn3* e induce la diferenciación endocrina (Lefebvre *et al.*, 2010).

Estos estudios sugieren que una combinación específica de marcas epigenéticas (metilación/demetilación) en la H3 y/o asociadas al promotor de *Ngn3* podrían determinar el silenciamiento o promover la expresión sexualmente dimórfica del gen. Dado que la actividad de KDM6a está asociada a la demetilación de los residuos H3K27 lo que promueve la transcripción, en esta tesina nos interesa evaluar la expresión de las enzimas: metiltransferasas de histonas EZH1/2, ADN metiltransferasas y metilcitosina dioxigenasas;

ya que participan en el establecimiento o remoción de marcas epigenéticas que podrían regular la expresión de *Ngn3* en hipotálamo de ratón durante el desarrollo perinatal.

HIPÓTESIS

Las enzimas metiltransferasas de histonas EZH1 y EZH2 presentan una expresión sexualmente dimórfica en hipotálamo de ratón, lo que contribuye a la regulación epigenética de la expresión de *Ngn3* durante el desarrollo perinatal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el rol de la metilación de histonas y otras modificaciones epigenéticas que podrían contribuir a la expresión sexualmente dimórfica de *Ngn3* en hipotálamo de ratón.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión génica de las enzimas *Ezh1*, *Ezh2* y *G9a* en hipotálamo de ratón antes y durante el periodo crítico.
2. Explorar otros reguladores epigenéticos que podrían contribuir en la expresión sexualmente dimórfica de *Ngn3*.
3. Evaluar el efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de los reguladores epigenéticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Para los experimentos de la presente tesina se utilizaron ratones MF1 de la cepa salvaje (*wild type*) y ratones transgénicos del modelo FCG generados a partir de la cepa MF1. Los animales utilizados fueron mantenidos en el bioterio de experimentación del Instituto Ferreyra en jaulas a cielo abierto con agua y alimento *ad libitum* y en condiciones ambientales de temperatura a 23°C y ciclo periódico de 12 h luz y 12 h oscuridad. Los protocolos para el cuidado, bienestar y buen uso de los animales de experimentación fueron aprobados y controlados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) del Instituto M. y M. Ferreyra (Res 004-2021). Para obtener animales de edad gestacional conocida se aparearon los animales la noche del proestro de las hembras y al día siguiente la presencia de tapón vaginal en las hembras indicó el día 1 de la gestación (E1).

2. Genotipificación de ratones FCG

La identificación del genotipo de los animales transgénicos FCG se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir del ADN de las muestras obtenidas de cada individuo. En todos los animales se confirmó previamente el fenotipo gonadal.

Extracción y purificación del ADN

Las muestras individuales obtenidas se incubaron en presencia de la enzima proteinasa K (0.25 mg/ml, Productos Bio-Lógicos Argentina) en solución tampón de lisis durante 18 h a 55 °C. A continuación, se centrifugaron las muestras 10 min a 13200 rpm y se recuperó el sobrenadante, descartando los restos de tejido sin degradar. El ADN fue precipitado mediante centrifugaciones sucesivas primero en presencia de isopropanol y luego en etanol 70%. El precipitado final de ADN se dejó secar por 10 min a temperatura ambiente (TA) para eliminar por evaporación el etanol remanente. Finalmente, las muestras fueron resuspendidas y homogeneizadas en agua bidestilada estéril y utilizadas en la PCR (o almacenadas a -20 °C hasta realizarse la misma).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la PCR se utilizaron tres pares de oligonucleótidos (cebadores) específicos para amplificar: a) una región del gen *Sry* determinante de testículo, b) una región del gen *Ssty* presente exclusivamente en el cromosoma *Y*, y c) una región del gen Miogenina (*Myog*) presente en el par autosómico 1 como control positivo de la reacción. Las secuencias para cada par de oligonucleótidos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Pares de oligonucleótidos empleados en la genotipificación.

Gen	N° de acceso (GenBank, NCBI)	Secuencia sentido 5'-3'	Secuencia antisentido 5'-3'	Producto (pb)
<i>Sry</i>	21674	CTACACAGAGAGAAATACCCAAAC	GTCTTGCCTGTATGTGATGG	159
<i>Ssty</i>	20611	CTGGAGCTCTACAGTGATGA	CAGTTACCAATCAACACATCAC	302
<i>Myog</i>	17928	TTACGTCCATCGTGGACAGCAT	TGGGCTGGGTGTTAGCCTTAT	246

En cada microtubo de reacción se colocó (concentraciones finales): el ADN de la muestra a una concentración no mayor a 10 ng/μl, cada uno de los cebadores 400 nM, enzima ADN polimerasa *Taq* PEGASUS 0.05 U/μl (Productos Bio-Lógicos, Argentina), MgCl₂ 2 mM y desoxirribonucleótidos (A, T, G y C) 400 μM (Invitrogen, Estados Unidos). La PCR se realizó en un termociclador Eppendorf, las condiciones de ciclado fueron: 3 min a 94°C, 35 ciclos sucesivos de 1 min a 94 °C/1 min a 58°C/1 min a 72°C, 10 min a 72°C.

Electroforesis

Finalizada la PCR, los productos de amplificación fueron sembrados en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X con ADN GelRed 100x (Biotium, Estados Unidos) para la resolución de las bandas amplificadas y su posterior observación en transiluminador de luz UV. En la figura 1, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en la determinación del genotipo de una camada representativa de ratones transgénicos.

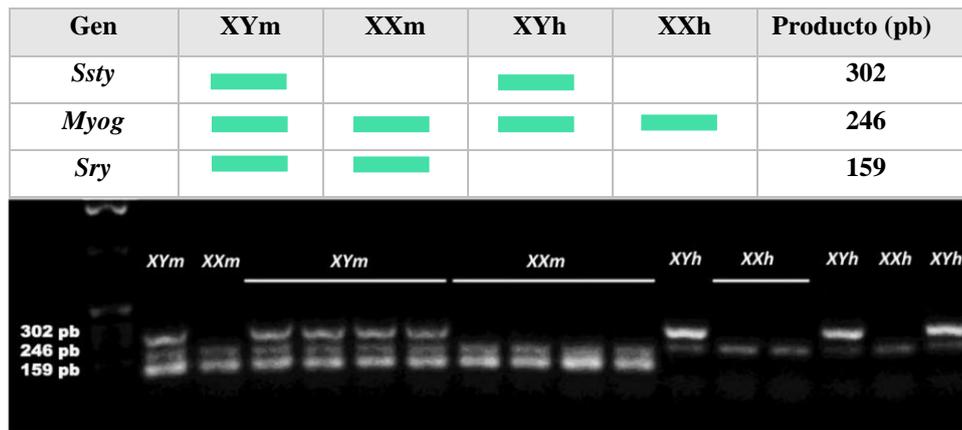


Figura 1. Determinación del genotipo de animales transgénicos. En la tabla se observa a modo esquemático los productos de la PCR correspondientes a cada genotipo, en tanto que la imagen muestra el resultado de una corrida electroforética representativa de los productos de amplificación. Los productos para cada genotipo son: XYm: banda de 302 pb (*Ssty*), 246 pb (*Myog*) y 159 pb (*Sry*); XXm: bandas de 246 pb (*Myog*) y 159 pb (*Sry*); XYh: bandas de 302 pb (*Ssty*) y 246 pb (*Myog*); XXh: banda de 246 pb (*Myog*). XYm y XXm (machos gonadales), XYh y XXh (hembras gonadales).

3. Obtención de las muestras

El tejido utilizado se obtuvo a partir de embriones de 15 días de edad gestacional (E15) o de ratones de 1 día posterior a su nacimiento (PN1), tomando como PN0 el día del nacimiento. Las edades se eligieron específicamente con el propósito de comparar la expresión de las enzimas en hipotálamo antes (E15) y después de los picos de secreción de hormonas gonadales, los cuales ocurren en ratones macho en torno a E17 y PN0 (O'Shaughnessy *et al.*, 2006). Para los experimentos con embriones E15, las ratonas preñadas fueron deprimidas mediante inhalación de CO₂ y sacrificadas por dislocación cervical. Los embriones se extrajeron asépticamente de la cavidad uterina empleando pinzas y tijeras estériles.

Identificación del sexo

La identificación del sexo gonadal (sexado) de los embriones se realizó mediante visualización, bajo microscopio estereoscópico, de la arteria espermática sobre la gónada masculina en desarrollo: la presencia de dicha arteria determina la asignación del sexo masculino, en tanto que su ausencia corresponde al sexo femenino. Para los experimentos con neonatos (PN1), el sexado se realizó por observación de la zona perianal, para dicho propósito se evalúa la distancia entre la papila genital y la apertura anal, la cual es casi el doble en los machos.

Para los experimentos con ratones FCG, en ambas edades, al momento del sacrificio se conservó una porción de tejido de cada ejemplar para la posterior extracción de ADN y genotipificación.

Extracción del tejido

Los encéfalos extraídos y separados por sexo fueron colocados en cápsulas de Petri con solución PBS fría, bajo observación con microscopio estereoscópico a un aumento de 20X se removieron las meninges y se diseccionó el hipotálamo ventromedial (HVM). Las muestras de tejido fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización.

4. Análisis de la expresión génica relativa

Extracción y Purificación del ARN

Las muestras de tejido fueron homogeneizadas en microtubos utilizando TRIzol (Invitrogen, Estados Unidos) a 4° C mediante el pasaje sucesivo a través de jeringas 30G x ½” estériles. Luego de 5 min a TA, se agregó cloroformo frío a cada muestra, se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 11400 rpm durante 15 min a 4 °C. Luego, se separó la fase superior transparente que contiene el ARN, se añadió isopropanol frío y se dejó precipitar toda la noche a -20 °C. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 11400 rpm durante 20 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Luego se realizó un lavado del precipitado centrifugando en etanol 70% a 11400 rpm durante 15 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado final de ARN por 10 min a 37 °C en estufa de hibridación, a fines de eliminar el etanol remanente por evaporación. El ARN purificado se disolvió en agua libre de nucleasas (Biodynamics, Argentina) incubando 10 min a 45 °C.

Digestión con ADNasa y PCR de retrotranscripción (RT-PCR)

Para eliminar posibles trazas remanentes de ADN en las muestras, al ARN total purificado se le realizó una digestión con enzima ADNasa. Se incubó cada muestra con Buffer 10X con MgCl₂ y con DNasa I (Invitrogen, Estados Unidos) durante 15 minutos a 37 °C y luego 10 minutos con EDTA 50 mM a 65 °C. Inmediatamente después de la digestión con ADNasa, se cuantificó el ARN de las muestras por espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm (NanoDrop 2000-Thermo Scientific) y se evaluó su pureza por medio del índice de absorbancia 260/280. La relación de DO 260/280 es considerada óptima con valores

cercanos a 1.8, valores menores indican contaminación de la muestra con proteínas o fenol y valores mayores hasta 2 indican preparaciones altamente purificadas de ARN.

Tabla 2: Secuencias de oligonucleótidos usados en el análisis de la expresión génica mediante qPCR

Gen	Secuencia sentido 5'-3'	Secuencia antisentido 5'-3'
<i>Ezh1</i>	TTCCCGCTGCATTCCATGAG	CCATATTTGCCTGGAGCCGT
<i>Ezh2</i>	TGCTTCCTACATCGTAAGTGC	AGGCTTGTTGTCCAAAGCTG
<i>G9a</i>	GAAGAAGCTGCGATTCCACC	ACGGCATTGATGTTGGCT
<i>Tet1</i>	ACCACAATAAATCAGGTTACAC	AGGTAGATGTTTCTGCGGAGG
<i>Tet2</i>	CCATCATGTTGTGGGACGGA	TCTGAGAACAGCGACGGTTG
<i>Tet3</i>	CTCCCTCGGCGGGGATAAT	AGCATTTATTTCCACCTCGGC
<i>Dnmt1</i>	CCATCTTCTTGTCTCCCTGTATG	GGTGCTTTGTCTTCTCCTT
<i>Dnmt3a</i>	GTCTCAACAGCACCATTCT	TGTGGTAGGCACCTGAAATAC
<i>Dnmt3b</i>	GTGCCAGACCTTGGAAACCT	CATTGTTTCCTGAAAGAAGCCCC
<i>18 S</i>	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT	CATTCTTGCAAATGCTTTTCG

Conocidas las concentraciones de ARN de cada muestra, se realizaron los cálculos necesarios para retrotranscribir 1 µg de ARN total en un volumen de reacción de 20 µl. Además del ARN, en cada microtubo de reacción se colocó (concentraciones finales): oligonucleótidos de secuencia aleatoria (random primers) 100 ng/µl (Invitrogen, Estados Unidos), enzima retrotranscriptasa M-MLV 200 U/µl (Promega, Estados Unidos), MgCl₂ 3 mM y desoxirribonucleótidos de adenina, timina, guanina y citosina 1 mM (Invitrogen, Estados Unidos). Se realizó la RT-PCR en un termociclador Eppendorf (Alemania) bajo las siguientes condiciones de ciclado: 60 min a 37 °C, 5 min a 95 °C. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

Cuantificación por PCR en tiempo real (qPCR)

La cuantificación de la expresión relativa por PCR en tiempo real se realizó con oligonucleótidos diseñados para la amplificación específica de los genes: *Ezh1*, *Ezh2*, *G9a*, *Tet1*, *Tet2*, *Tet3*, *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* y *Ngn3*, y *18s* (codificante para el ARN ribosómico 18S) como gen endógeno calibrador. Las secuencias de cebadores empleadas para cada gen se encuentran en la Tabla 2.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μl , utilizando una concentración entre 250-500 nM de cada par de oligonucleótidos (según el gen en particular) y 3 μl de una dilución del producto de la RT-PCR y empleando Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Estados Unidos). Para *Ngn3*, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15 μl utilizando oligonucleótidos diseñados a medida para la amplificación específica de *Ngn3* (Mm00437606_s1: 4331182, Invitrogen Estados Unidos) y 6,75 μl de una dilución del producto de la RT-PCR, empleando TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Estados Unidos). Para todos los genes se utilizó el equipo StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Estados Unidos).

Los niveles de expresión relativa del ARN mensajero para cada gen se calcularon utilizando el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$, con el programa StepOne™ Software v2.3, en el cual las diferencias cuantitativas en la expresión génica entre los grupos experimentales se calculan en relación a la expresión en el grupo control o “de referencia” y a un gen endógeno de expresión constitutiva. Para cada gen en estudio se verificó la eficiencia (E) de amplificación por medio de una curva estándar de los valores Ct (ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo en la fase exponencial de la PCR) obtenidos en función de diluciones seriadas del ADNc de una mezcla de muestras de los diferentes grupos experimentales, trazando así una relación lineal de cuya pendiente se obtiene el valor de E, se consideraron óptimos los valores de $E=2\pm 0,14$.

5. Tratamiento neonatal con testosterona

Con el objetivo de estudiar si las hormonas gonadales ejercen un efecto sobre la expresión sexualmente dimórfica de los reguladores epigenéticos en estudio, se empleó el protocolo de masculinización con testosterona para roedores neonatales (Cisternas *et al.*, 2020b). Al nacer, los animales de cada camada fueron asignados al azar a los siguientes grupos experimentales: hembra control (HV), macho control (MV) y hembra + testosterona (HT). Posteriormente, se administraron los tratamientos por vía subcutánea al día PN0 y PN1: 20 μl del vehículo aceite de maní o 20 μl conteniendo 100 μg de propionato de testosterona (Figura 2). Para la obtención de muestras de HVM a PN1, los animales fueron sacrificados 4 horas después de la última inyección a PN1.

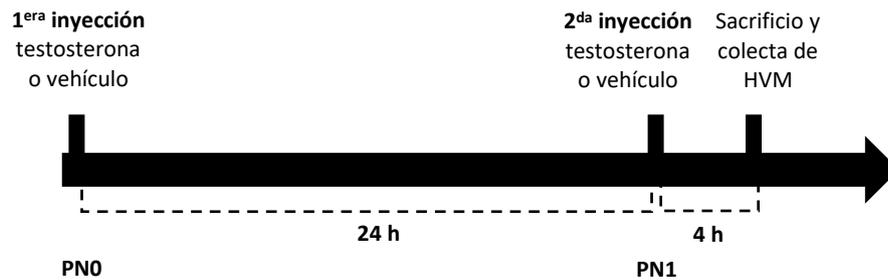


Figura 2: Esquema que muestra los tratamientos neonatales empleados para estudiar la regulación de la expresión de los reguladores bajo el efecto de la testosterona.

EXPERIMENTOS REALIZADOS

1. Expresión de histona metiltransferasas (HMTs) durante el desarrollo

1.1. *Expresión de HMTs antes y durante el periodo crítico*

Con el propósito de evaluar la expresión de *Ezh1*, *Ezh2* y *G9a*, antes y después de la exposición *in vivo* a las hormonas gonadales, se midió la expresión génica por qPCR en tejido proveniente de ratones *wild type* macho y hembra a E15 y a PN1 respectivamente. Además, se evaluó la expresión génica de *Ngn3* en los mismos animales, para correlacionar los cambios observados en enzimas metiltransferasas con cambios en la expresión de *Ngn3*. Cuando se observaron diferencias sexuales en los animales *wild type*, luego se midió el gen en estudio en tejido de animales FCG para evaluar el rol de los cromosomas sexuales.

1.2. *Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de Ngn3 y Ezh2*

Con el propósito de evaluar el rol de las hormonas gonadales *in vivo* sobre las diferencias sexuales observadas en *Ngn3* y *Ezh2* se midió la expresión génica de dichos genes por qPCR en tejido proveniente de ratones *wild type* macho y hembra controles y hembra + testosterona a PN1.

2. Expresión de ADN metiltransferasas (DNMTs) durante el desarrollo

2.1. Expresión de DNMTs antes y durante el periodo crítico

Con el propósito de evaluar la expresión de *Dnmt1*, *Dnmt3a* y *Dnmt3b*, antes y después de la exposición *in vivo* a las hormonas gonadales, se midió la expresión génica por qPCR en tejido proveniente de ratones *wild type* macho y hembra a E15 y a PN1 respectivamente.

2.2. Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de DNMTs

Con el propósito de evaluar el rol de las hormonas gonadales *in vivo* sobre las diferencias sexuales observadas en *Dnmt1*, *Dnmt3a* y *Dnmt3b*, se midió la expresión génica de dichos genes por qPCR en tejido proveniente de ratones *wild type* macho y hembra controles y hembra + testosterona a PN1.

3. Expresión de enzimas implicadas en la demetilación del ADN durante el desarrollo

3.1. Expresión de enzimas implicadas en la demetilación del ADN antes y durante el periodo crítico

Con el propósito de evaluar la expresión de *Tet1*, *Tet2* y *Tet3*, antes y después de la exposición *in vivo* a las hormonas gonadales, se midió la expresión génica por qPCR en tejido proveniente de ratones *wild type* macho y hembra a E15 y a PN1 respectivamente.

3.2. Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de Tet3

Con el propósito de evaluar el rol de las hormonas gonadales *in vivo* sobre las diferencias sexuales observadas en *Tet3*, se midió la expresión génica de dicho gen por qPCR en tejido proveniente de ratones *wild type* macho y hembra controles y hembra + testosterona a PN1.

4. Análisis de resultados

Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante la Prueba t de Student y análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías seguido de comparaciones post hoc usando la prueba LSD-Fisher. La diferencia entre las medias se consideró significativa cuando el p valor $< 0,05$. Se comprobaron los supuestos de homogeneidad de las varianzas, distribución normal e independencia de los residuos para cada set de datos, cuando los supuestos no se cumplieron se utilizaron pruebas no paramétricas como Mann-Whitney y Kruskal-Wallis. Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron mediante el programa GraphPad Prism8.0.1.

RESULTADOS

1. Expresión de histona metiltransferasas (HMTs) durante el desarrollo

1.1. Expresión de HMTs antes y durante el periodo crítico

Con el objeto de evaluar la expresión génica de las enzimas histona metiltransferasas (*Ezh2*, *Ezh1*, *G9a*) durante el desarrollo perinatal, se midió la expresión de dichas enzimas a E15 y PN1. Los niveles de expresión de *Ezh2* fueron mayores en machos a E15 (Prueba *t* de Student $t=3,021$, $gl=10$, $p=0,012$) en comparación con los niveles de expresión en hembras. A PN1 se observó una tendencia opuesta, con una menor expresión en machos, aunque la diferencia no fue significativa (Prueba *t* de Student $t=2,051$, $gl=13$, $p=0,061$) (Figura 1A).

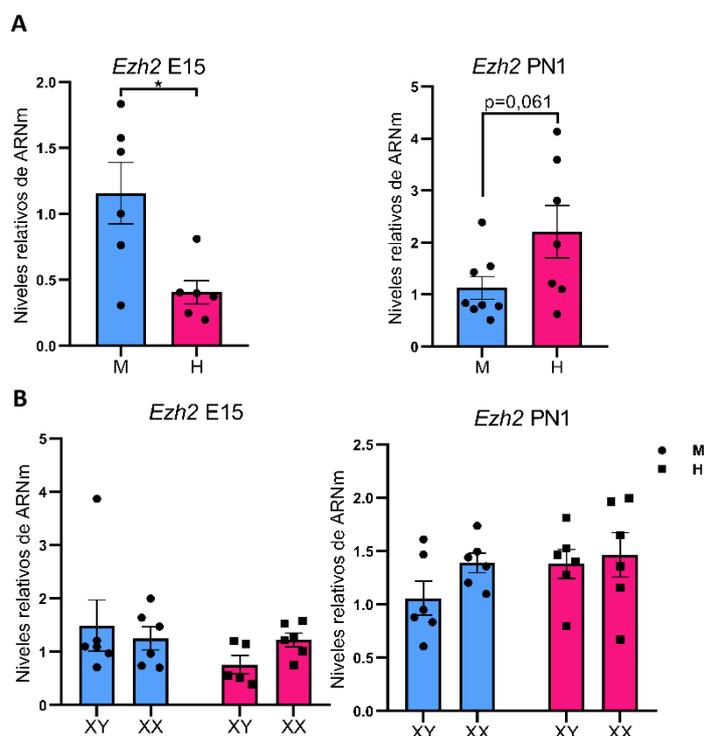


Figura 1. Niveles relativos de ARNm de *Ezh2* a E15 y PN1 en ratones *wild type* separados por sexo (A), y en ratones FCG separados según sexo y genotipo (B). Los machos presentaron una expresión significativamente mayor de *Ezh2* a E15 en comparación con las hembras (A). Los machos presentaron niveles de expresión significativamente menores de *Ezh2* a PN1 en comparación a su expresión a E15 (A). Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión en los machos (A) o a XY/Sry (B). Las barras representan la media \pm error estándar, $n=5-8$. * $p<0,05$. M=machos, H=hembras.

A continuación, con el fin de evaluar si los cromosomas sexuales podrían estar involucrados en la expresión sexualmente dimórfica de *Ezh2* (Figura 1A), se midieron los niveles de dicha enzima a E15 y PN1 en tejido proveniente de individuos transgénicos FCG. Como se observa en la figura 1B, los resultados indican que no hubo efecto de los cromosomas sexuales sobre la expresión génica de *Ezh2* a ninguna de las dos edades evaluadas ($p>0,05$; Figura 1B). A fines de evaluar posibles cambios durante el desarrollo perinatal, se realizó una comparación

entre los niveles de expresión génica a E15 y PN1, en cada sexo respectivamente. Con respecto a *Ezh2*, los machos presentaron un descenso significativo en los niveles de expresión a PN1 en comparación con su expresión a E15 (Prueba *t* de Student $t=2,394$, $gl=12$, $p=0,033$), mientras que en las hembras no se observó una diferencia significativa (Figura 2).

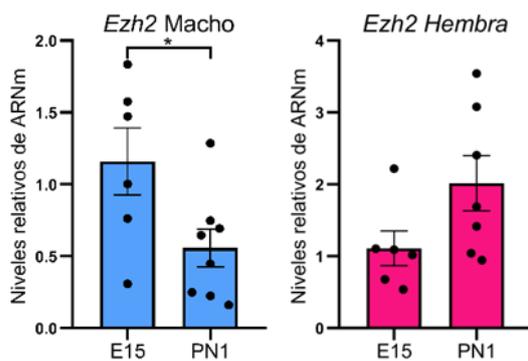


Figura 2. Niveles relativos de ARNm de *Ezh2* en hipotálamo ventromedial de ratones *wild type* machos y hembras, separados por edad. Los machos presentaron niveles de expresión significativamente menores de *Ezh2* a PN1 en comparación a su expresión a E15. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión a E15 en cada sexo. Las barras representan la media \pm error estándar, $n=6-8$. * $p<0,05$.

Luego, se midieron los niveles de expresión de *Ezh1*. En tejido proveniente de individuos E15 no se detectó su expresión. En cuanto a PN1, los niveles de expresión de *Ezh1* en animales *wild type* no reflejaron una expresión sexualmente dimórfica (Figura 3A). Mientras que en ratones transgénicos FCG, la expresión en los machos gonadales (XYm, XXm) fue significativamente menor en comparación con las hembras gonadales (XYh, XXh) (ANOVA $F_{1,2}=4,941$; $p=0,037$) (Figura 3B).

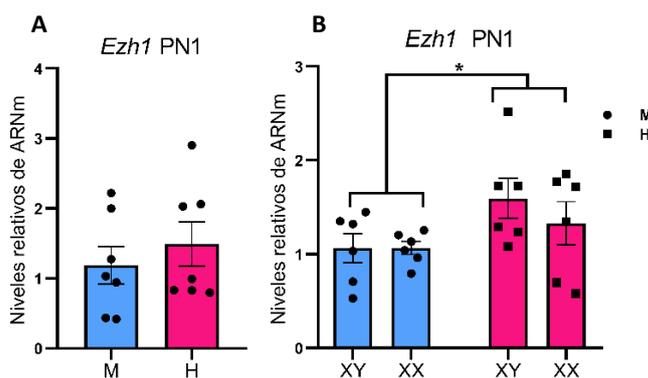


Figura 3. Niveles relativos de ARNm de *Ezh1* a PN1, en ratones *wild type* (A) y en ratones FCG separados según sexo y genotipo. Los machos gonadales (XXm, XYm) presentaron una expresión significativamente menor en comparación con las hembras gonadales (XXh, XYh). Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión en los machos (A), o a XY-Sry (B). Las barras representan la media \pm error estándar, $n=6-7$. * $p<0,05$. M=machos, H=hembras.

Con respecto a la expresión génica de la enzima *G9a*, no se observaron diferencias sexuales en la expresión de dicha enzima a E15 y PN1 (Figura 4).

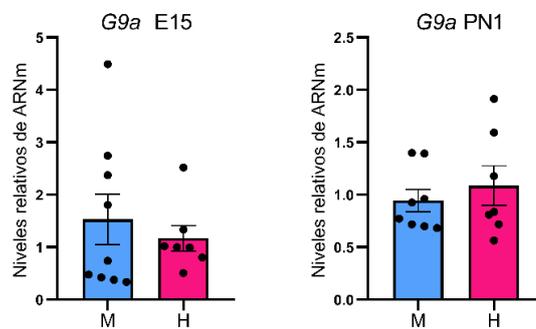


Figura 4. Niveles relativos de ARNm de *G9a* en ratones *wild type* separados por sexo, a E15 y PN1. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión en los machos. Las barras representan la media \pm error estándar, n=7-9. M=machos, H=hembras

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se demuestra la existencia de una expresión sexualmente dimórfica de *Ngn3* en cultivos primarios de neuronas hipotalámicas a E15 (Cisternas *et al.*, 2020; Scerbo *et al.*, 2014). Los niveles de expresión de *Ngn3* en cultivos provenientes de embriones macho E15 son menores con respecto a la expresión en cultivos de hembras, y el tratamiento con E2 *in vitro* aumenta los niveles de *Ngn3* únicamente en cultivos neuronales de machos sin provocar cambios en las hembras, anulando así la diferencia sexual (Scerbo *et al.*, 2014). En los experimentos de esta tesina se midió por primera vez la expresión de *Ngn3* en tejido con el fin de correlacionar los cambios observados en enzimas metiltransferasas de histonas con cambios en la expresión de *Ngn3*, a E15 y PN1 (Figura 5). Los resultados indican que la expresión de *Ngn3* fue significativamente menor en los machos a E15 en comparación con las hembras (Prueba Mann-Whitney $U=0$, $p=0,009$). A PN1 no se observaron diferencias significativas en la expresión de *Ngn3* entre machos y hembras (Prueba *t* de Student $t=1,357$, $gl=11$, $p=0,201$) (Figura 5A). Con el fin de evaluar posibles cambios en la expresión de *Ngn3* durante el desarrollo perinatal, se compararon los niveles de expresión génica a E15 y PN1, dentro de cada sexo respectivamente. Los niveles de expresión fueron menores a PN1 tanto en machos (Prueba *t* de Student $t=7,689$, $gl=8$, $p<0,0001$) como en hembras (Prueba Mann-Whitney $U=0$, $p=0,001$) (Figura 5B).

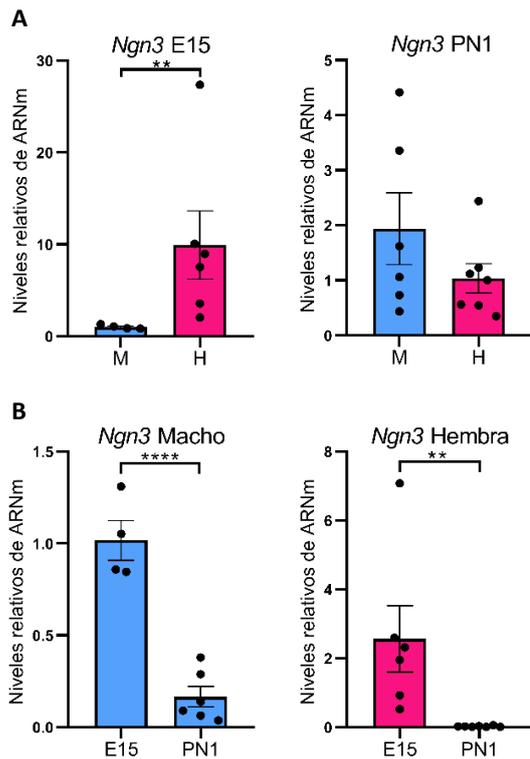


Figura 5. Niveles relativos de ARNm de *Ngn3* ratones *wild type* separados por sexo (A) y edad (B). Los machos presentaron una expresión significativamente menor de *Ngn3* a E15 comparados con las hembras. Los niveles de expresión de *Ngn3* fueron significativamente menores a PN1 en comparación con la expresión a E15 en ambos sexos. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión en los machos (A) o a E15 (B). Las barras representan la media \pm error estándar, $n=4-7$ ** $p<0,002$; **** $p<0,0001$. M=machos, H=hembras.

1.2 Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de *Ngn3* y *Ezh2*

En base a los resultados previamente obtenidos, donde se observó una expresión sexualmente dimórfica de *Ezh2* a E15 y una tendencia opuesta a PN1, menores niveles de expresión a PN1 en machos, mientras que en las hembras no se observaron diferencias (Figura 1) y debido a que no se observó un efecto de los cromosomas sexuales (Figura 2); nos propusimos evaluar si las hormonas gonadales podrían estar implicadas en la regulación de la expresión génica de *Ezh2* para lo cual utilizamos el protocolo de masculinización neonatal por tratamiento con testosterona a hembras a los días PN0-PN1. Se realizó un ANOVA a una vía para evaluar diferencias entre los grupos experimentales: machos vehículo, hembras vehículo y hembras con testosterona a PN1 (Welch ANOVA: $W=3,781$, $p=0,054$; Prueba *t* de Welch: MV vs. HT: $p=0,052$; MV vs. HV: $p=0,071$) (Figura 6A). En la comparación entre grupos se observó una tendencia hacia menores niveles de expresión de *Ezh2* en machos en comparación a ambos grupos de hembras y no se observaron efectos del tratamiento con testosterona en hembras.

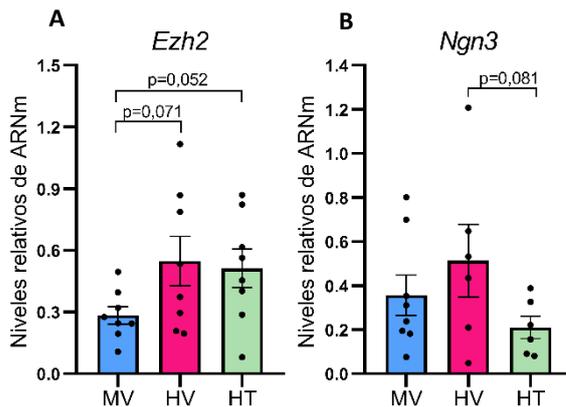


Figura 6. Efecto de la testosterona (T) sobre los niveles de ARNm de *Ezh2* (A) y *Ngn3* (B) en ratones *wild type* a PN1. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión en machos E15. Las barras representan la media \pm error estándar, cada punto representa un individuo distinto, $n=8$. * $p<0,05$. MV=machos vehículo, HV=hembras vehículo, HT=hembras con testosterona.

A continuación, evaluamos el efecto de la testosterona sobre la expresión génica de *Ngn3* (Figura 6B). El análisis de nuestros resultados no reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales (ANOVA: $F_{2,17}=1,363$, $p=0.209$; Prueba LSD de Fisher: HV vs. HT: $p=0.081$), el tratamiento con testosterona no fue suficiente para causar cambios en la expresión de *Ngn3* en las hembras tratadas (Figura 6B).

2. Expresión de ADN metiltransferasas (DNMTs) durante el desarrollo

2.1 Expresión de DNMTs antes y durante el periodo crítico

Con el propósito de explorar otras modificaciones epigenéticas como la metilación del ADN, que podrían participar en la diferenciación sexual del hipotálamo, nos propusimos evaluar la expresión de ADN metiltransferasas a E15 y PN1. A E15, solo los niveles de expresión de *Dnmt3a* fueron significativamente menores en los machos en comparación a la expresión en las hembras (Prueba *t* de Welch $t=2,568$, $gl=11,30$ $p=0,025$), aunque se observó la misma tendencia en la expresión de *Dnmt1* esta diferencia no fue significativa (Prueba *t* de Student $t=1,509$, $gl=10$, $p=0,162$) (Figura 7A). En cuanto a la expresión a PN1, no se observaron diferencias en la expresión en ninguna de las ADN metiltransferasas en estudio (Figura 7B).

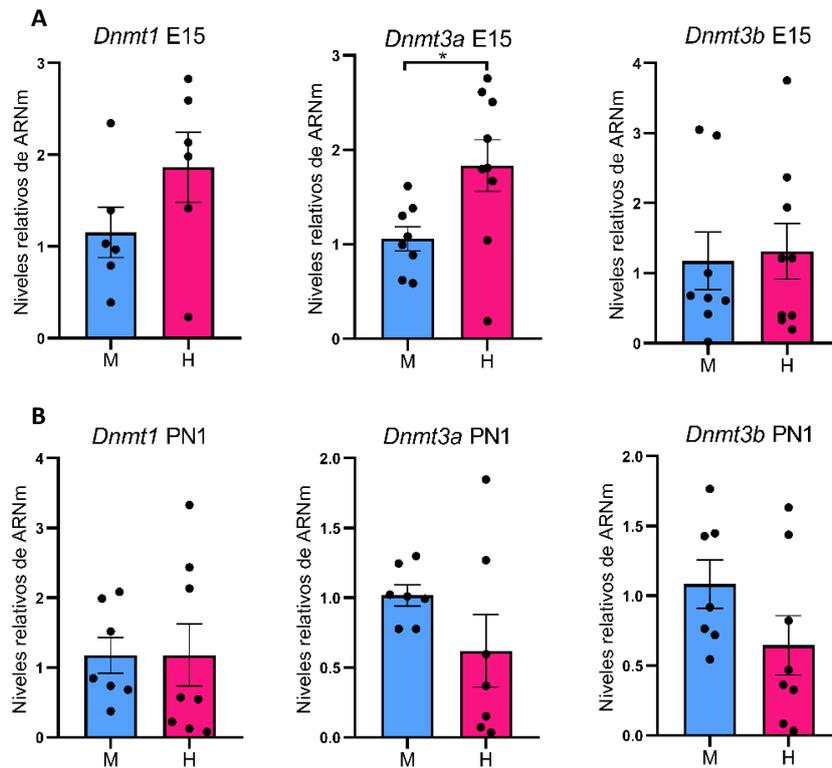


Figura 7. Niveles relativos de ARNm de *Dnmt1*, *Dnmt3a* y *Dnmt3b* en ratones *wild type* separados por sexo a E15 (A) y PN1 (B). Los machos presentaron una expresión significativamente menor de *Dnmt3a* a E15 en comparación a lo expresado por las hembras. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión en los machos. Las barras representan la media \pm error estándar, n=6-9. *p<0,05. M=machos, H=hembras.

A fines de evaluar posibles cambios en la expresión de DNMTs durante el desarrollo, se compararon los niveles de expresión génica entre las edades en cada sexo respectivamente. En machos a PN1, los niveles de expresión de *Dnmt1* y *Dnmt3a* aumentaron significativamente en comparación con la expresión a E15 (Prueba Mann Whitney U=4, p=0,014; Prueba *t* de Welch t=3,093, gl=6,070, p=0,021). Respecto a *Dnmt3b*, a pesar de que en los machos se observa un aumento aparente en los niveles de expresión a PN1, la diferencia no alcanzó a ser significativa (Prueba *t* de Welch t=2,239, gl=6,786, p=0,061) (Figura 8A). En cuanto a las hembras, no se observaron diferencias significativas en la expresión de DNMTs entre las edades (Figura 8B).

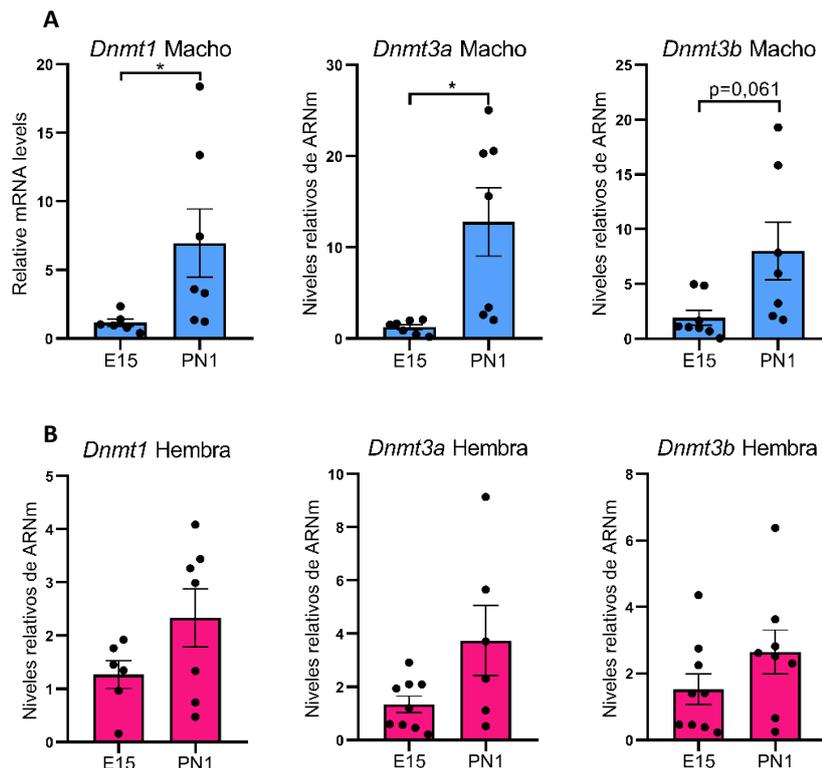


Figura 8. Niveles relativos de ARNm de *Dnmt1*, *Dnmt3a* y *Dnmt3b* en hipotálamo ventromedial de ratones *wild type* machos (A) y hembras (B) separados por edad. Se observaron niveles de expresión significativamente mayores de *Dnmt1* y *Dnmt3a* en ratones macho a PN1 comparados con la expresión a E15. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión a E15. Las barras representan la media \pm error estándar, n=6-9. *p<0,05.

2.2 Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de DNMTs

En virtud de que se encontraron diferencias sexuales en la expresión de *Dnmt3a* a E15 y que la expresión de las DNMTs fue mayor en los machos a PN1, mientras que en las hembras no se observaron diferencias; se procedió a evaluar si las hormonas gonadales podrían estar regulando la expresión génica de DNMTs. Los resultados indican que no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión de *Dnmt1*, *Dnmt3b* y *Dnmt3a* entre los grupos experimentales (Figura 9).

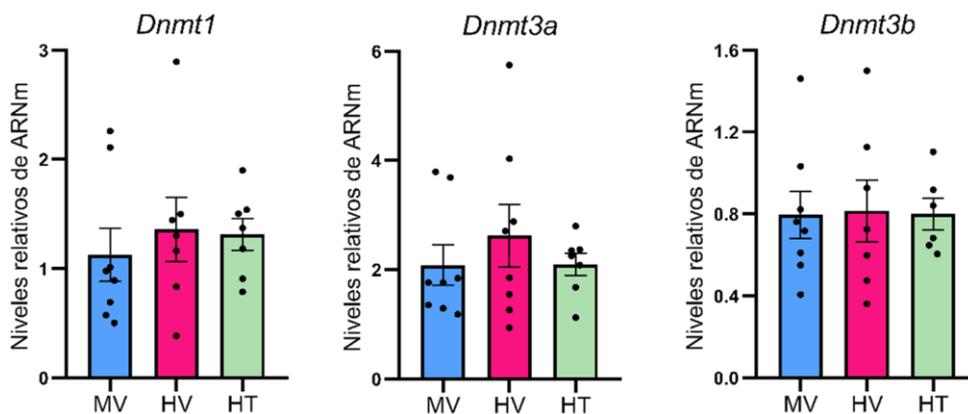


Figura 9. Efecto de la testosterona (T) sobre los niveles de ARNm de *Dnmt1*, *Dnmt3a* y *Dnmt3b* en hipotálamo ventromedial de ratones *wild type* a PN1. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión en machos. Las barras representan la media \pm error estándar, n=6-8. MV=machos vehículo, HV=hembras vehículo, HT=hembras con testosterona.

3. Expresión de enzimas implicadas en la demetilación del ADN durante el desarrollo

3.1 Expresión de enzimas implicadas en la demetilación del ADN antes y durante el periodo crítico

Con el propósito de explorar patrones de expresión de las enzimas metilcitosina dioxigenasas de translocación diez-once (TET) durante el desarrollo perinatal, nos propusimos medir la expresión de dichas enzimas a E15 y PN1. No se registraron diferencias significativas en los niveles de expresión de *Tet1* y *Tet2* a E15, sin embargo, para ambas enzimas se observó una tendencia a mayores niveles de expresión en los machos. A PN1 a pesar de que se observó una tendencia opuesta, menores niveles de *Tet1* y *Tet2* en los machos, estas diferencias no fueron significativas (Prueba *t* de Welch $t=1,763$, $gl=10$, $p=0,108$; Prueba *t* de Student $t=2,010$, $gl=14$, $p=0,064$) (Figura 10).

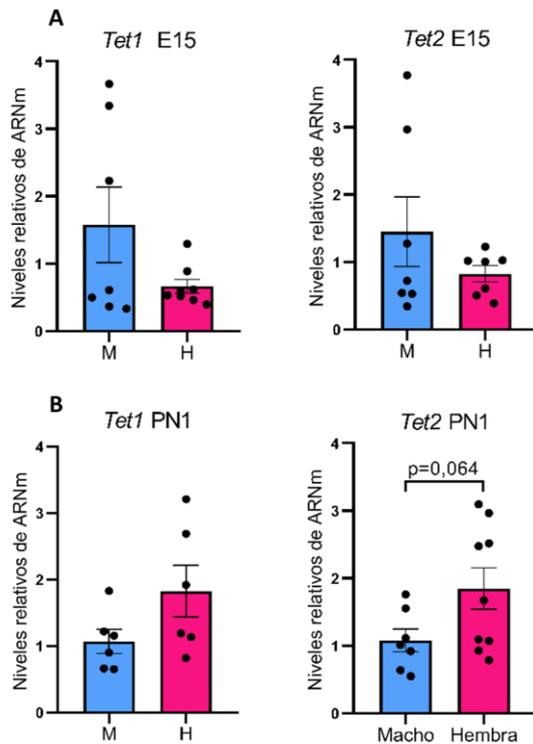


Figura 10. Niveles relativos de ARNm de *Tet1* y *Tet2* en hipotálamo ventromedial de ratones *wild type* separados por sexo a E15 (A) y PN1 (B). Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión en los machos. Las barras representan la media \pm error estándar, $n=6-9$. M=machos, H=hembras.

Respecto a *Tet3*, los niveles de expresión fueron significativamente menores en los machos a E15 en comparación a lo expresado por las hembras (Prueba *t* de Student $t=2,659$, $gl=13$, $p=0,019$). A PN1, a pesar de que los resultados siguieron la misma tendencia, la diferencia no fue significativa (Prueba *t* de Welch $t=2,189$, $gl=8,693$, $p=0,057$) (Figura 11 A y B).

Con el objeto de evaluar si los cromosomas sexuales podrían estar involucrados en la expresión sexualmente dimórfica de *Tet3* se midieron los niveles de dicha enzima a PN1 en tejido proveniente de individuos transgénicos FCG. Se observó una menor expresión en los machos gonadales (XYm, XXm) en comparación a las hembras gonadales (XYh, XXh) ($F_{1,19}=4,49$; $p=0,047$) (Figura 11C), replicando el resultado registrado en los individuos *wild type* E15.

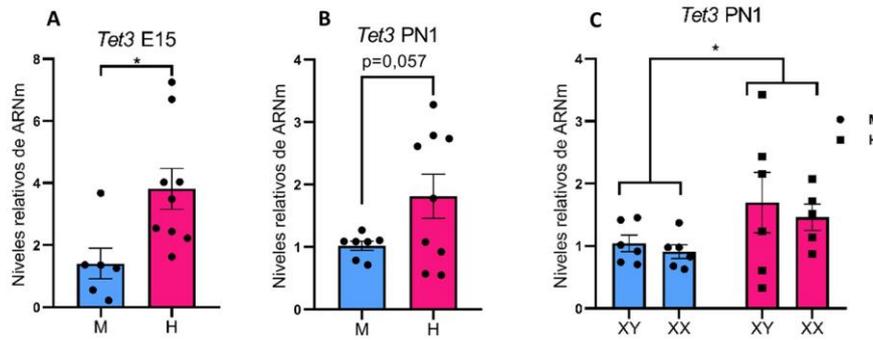


Figura 11. Niveles relativos de ARNm de *Tet3* en hipotálamo ventromedial de ratones *wild type* a E15 (A) y PN1 separados por sexo, (B) y en ratones FCG a PN1 separados según sexo y genotipo (C). Los machos presentaron una expresión significativamente menor de *Tet3* a E15 en comparación con las hembras. Los machos gonadales (XXm, XYm) presentaron niveles de expresión significativamente menores de *Tet3* en comparación con las hembras gonadales (XXh, XYh). Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión en los machos en individuos *wild type*, y a XY·Sry en FCG. Las barras representan la media \pm error estándar, n=5-9. * $p < 0,05$. M=machos, H=hembras.

A continuación, con el propósito de analizar los cambios en los niveles de expresión durante el desarrollo perinatal, se compararon los niveles de expresión de *Tet1*, *Tet2* y *Tet3* a E15 y PN1 en cada sexo respectivamente. Los machos presentaron un aumento significativo en los niveles de expresión de *Tet3* a PN1 en comparación con su expresión a E15 (Mann Whitney test $U=7$, $p=0,051$) (Figura 12A), mientras que en las hembras se observó un aumento significativo en la expresión de *Tet1* a PN1 (Prueba *t* de Welch $t=3,420$, $gl=5,360$, $p=0,016$) (Figura 12B).

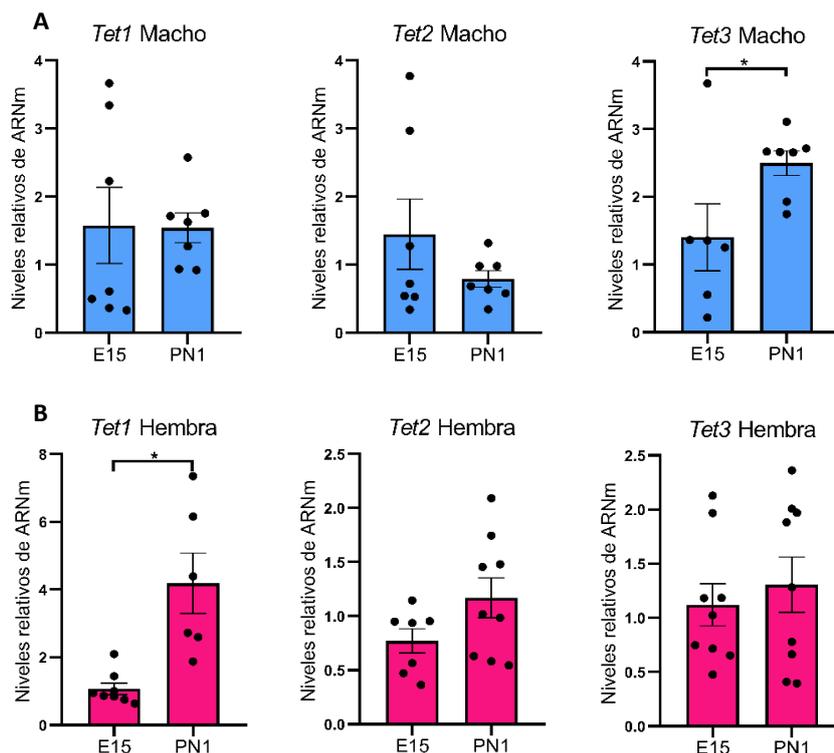


Figura 12. Niveles relativos de ARNm de *Tet1*, *Tet2* y *Tet3* en hipotálamo de ratones *wild type* machos (A) y hembras (B) separados según edad. Se observaron niveles de expresión significativamente mayores de *Tet3* en ratones macho a PN1 comparados con E15. Las hembras presentaron una mayor expresión de *Tet1* a PN1 en comparación a E15. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión a E15. Las barras representan la media \pm error estándar, $n=6-9$. * $p<0,05$.

3.2 Efecto de la testosterona sobre la expresión sexualmente dimórfica de *Tet3*

Debido a que se encontraron diferencias sexuales en la expresión de *Tet3* a E15, y que su expresión fue significativamente mayor en los machos a PN1, mientras que en las hembras no se observaron diferencias; nos propusimos evaluar el efecto de las hormonas gonadales en la regulación de la expresión génica de *Tet3*. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de *Tet3* entre los grupos experimentales (Figura 13).

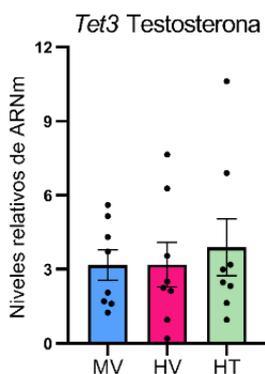


Figura 13. Efecto de la testosterona (T) sobre los niveles de ARNm de *Tet3* en ratones *wild type* a PN1. Los datos fueron normalizados con respecto a la expresión en machos E15. Las barras representan la media \pm error estándar, $n=8$. MV=machos vehículo, HV=hembras vehículo, HT=hembras con testosterona.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesina de grado hemos evaluado los cambios durante el desarrollo perinatal en los niveles de expresión de enzimas que participan en mecanismos epigenéticos con potencialidad para regular la expresión de *Ngn3*, en búsqueda de diferencias sexuales en sus perfiles de expresión. En primer lugar, comenzamos estudiando la expresión de *Ngn3* en hipotálamo ventromedial de ratón antes y durante la exposición *in vivo* a las hormonas secretadas por las gónadas masculinas, para luego correlacionar estos valores con la expresión de los reguladores epigenéticos. Nuestros resultados indicaron que los niveles de expresión de *Ngn3* a E15 fueron menores en los machos en comparación a la expresión en las hembras, estos resultados coinciden con resultados previos de nuestro laboratorio en donde Scerbo *et al.* (2014) y Cisternas *et al.* (2020a) demostraron que los cultivos de neuronas hipotalámicas de ratones transgénicos a E15 presentan una expresión sexualmente dimórfica de *Ngn3*, con una menor expresión en cultivos XY en comparación a cultivos XX, independientemente del sexo gonadal. En el presente trabajo también evaluamos los niveles de expresión de *Ngn3* a PN1, a pesar de que la diferencia no es significativa se observó una tendencia hacia mayores niveles de expresión en los machos, revirtiendo el patrón observado a E15. En un estudio similar, Ruiz-Palmero *et al.* (2016) midieron los niveles de *Ngn3* en tejido de hipocampo y encontraron diferencias sexualmente dimórficas en su expresión a E17, estas diferencias se anulan a PN0 mientras que a PN1 a pesar de que la diferencia no es significativa, al igual que en nuestros resultados, se observa una tendencia hacia una mayor expresión de *Ngn3* en machos.

Al comparar los niveles de *Ngn3* entre E15 y PN1, nuestros resultados mostraron que en ambos sexos los niveles de expresión fueron menores a PN1, en las hembras el descenso en la expresión de *Ngn3* fue del 99 % mientras que en los machos el descenso fue del 83%. Durante el desarrollo embrionario *Ngn3* promueve el establecimiento de diferentes fenotipos neuronales, entre ellos las neuronas *Npy+* y *Pomc+* que controlan la homeostasis energética en el hipotálamo ventromedial. Pelling *et al.* (2011) evaluaron los niveles de expresión de células *Ngn3+*, *Npy+* y *Pomc+* en hipotálamo durante el desarrollo embrionario. Las primeras células *Ngn3+* son detectadas a E9.5, entre E12-14 el número de células *Ngn3+* es mayor mientras que a E17.5 ya se detectan menores niveles. En cuanto a la expresión de neuronas *Npy+* y *Pomc+*, las células *Pomc+* aumentan desde E10.5 a E15.5 mientras que a E17.5 se mantienen los mismos valores, en cambio las células *Npy+* recién son detectadas a E15.5 y aumentan a E17.5. Los investigadores correlacionaron los cambios en la expresión

de células $Ngn3^+$ con los cambios en la expresión de Npy^+ y $Pomc^+$, y además mediante ratones *knockout* $Ngn3^{-/-}$ constataron que $Ngn3$ promueve el desarrollo de neuronas $Pomc^+$ e inhibe el desarrollo de neuronas Npy^+ . Basándonos en nuestros resultados y en la evidencia expuesta, podemos hipotetizar que durante el desarrollo embrionario temprano $Ngn3$ promueve el establecimiento de las células $Pomc^+$, es por eso que su expresión es mayor a E15, luego los niveles disminuyen y comienzan a expresarse las células Npy^+ , hasta que finalmente a PN1 ambos fenotipos neuronales ya están establecidos y por lo tanto los niveles de $Ngn3$ disminuyen.

Nuestros resultados indican que la expresión de $Ngn3$ es sexualmente dimórfica antes del período crítico (E15) y sugieren que, luego de la exposición *in vivo* a las hormonas sexuales secretadas por los testículos, las diferencias sexuales se anulan (PN1). Estos resultados concuerdan con resultados previos del laboratorio obtenidos a partir de cultivos celulares de neuronas hipotalámicas. El tratamiento *in vitro* con 17- β -estradiol aumenta la expresión de $Ngn3$ solo en neuronas derivadas de cultivos de embriones macho (Scerbo *et al.*, 2014), y este efecto es mediado por los receptores ER α (Cisternas *et al.*, 2020a). Estas evidencias nos llevaron a pensar que estos efectos son debidos a la testosterona secretada por los testículos que es luego convertida a estradiol en cerebro, y no a la síntesis *de novo* de estradiol en neuronas. Es por esto que decidimos evaluar los efectos de la exposición exógena de testosterona en las hembras sobre los niveles de expresión de $Ngn3$, a fines de simular el proceso de masculinización del cerebro en ratones. Los análisis estadísticos no arrojaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, sin embargo, observamos un ligero descenso en la expresión de $Ngn3$ en las hembras tratadas con testosterona con respecto a las hembras control. La testosterona podría estar afectando la expresión de $Ngn3$ directamente, o a través de su conversión a E2. Por otra parte, testosterona (o estradiol) podría estar actuando sobre reguladores epigenéticos que a su vez alteran el estado transcripcional de $Ngn3$.

En un trabajo reciente de nuestro laboratorio Cabrera-Zapata *et al.* (2022) demostraron que en la región del promotor de $Ngn3$ el residuo de lisina en la posición 27 de la histona 3 (H3K27) se encuentra trimetilado (H3K27me3) en mayores niveles en cultivos de neuronas hipotalámicas E15 de machos en comparación a las hembras. Como mencionamos previamente H3K27me3 es una marca asociada con el silenciamiento génico, por lo que la expresión de $Ngn3$ en machos está siendo reprimida en mayor medida en comparación a la

expresión en hembras. Anteriormente Cabrera-Zapata *et al.* (2021) encontraron que en hipotálamo de ratón la enzima demetilasa de histonas KDM6a presenta una expresión sexualmente dimórfica. La expresión de *Kdm6a* en ratones FCG es mayor en los individuos XX, independiente del sexo gonadal, y esta mayor expresión se mantiene a E15, PN0 y PN60. Debido a que KDM6a retira grupos metilos en H3K27 promoviendo la expresión génica, los investigadores concluyeron que los mayores niveles de *Ngn3* en las hembras a E15 eran explicados en parte por mayores niveles de *Kdm6a* a la misma edad embrionaria. Las metiltransferasas de histonas EZH1 y EZH2 son enzimas que colocan grupos metilos en H3K27 promoviendo el silenciamiento génico, contrario al efecto producido por KDM6a, el efecto de estas enzimas sería reprimir la expresión génica de *Ngn3*. Dado que las marcas epigenéticas son dinámicas, es decir el grado de metilación cambia durante el desarrollo de un organismo, el estado transcripcional de un determinado gen va a estar dado por el balance entre marcas que reprimen y promueven su expresión. Por eso en el presente trabajo evaluamos los niveles de expresión de *Ezh1* y *Ezh2* durante el desarrollo perinatal, con el fin de evaluar si los niveles de expresión de estas enzimas podrían correlacionarse con los niveles de expresión observados en *Ngn3*. Tal como esperábamos nuestros resultados mostraron una expresión sexualmente dimórfica de *Ezh2* a E15, con mayores niveles de expresión en machos en comparación a las hembras. Los mayores niveles de expresión de *Ezh2* en machos tienen correlación con un mayor grado de marcas represivas H3K27me3 en el promotor de *Ngn3* en machos y por ende con menores niveles en su expresión en los machos a E15. Y a su vez en las hembras, los menores niveles de expresión de *Ezh2* se correlacionan con un menor grado de marcas represivas H3K27me3 en el promotor de *Ngn3* y una mayor expresión a E15. A PN1 observamos una expresión significativamente menor de *Ezh1* en los machos en comparación a las hembras, respecto a *Ezh2*, aunque la diferencia no fue significativa, presentó el mismo patrón de expresión que *Ezh1*. Esta menor expresión de las enzimas metiltransferasas de histonas, que reprimen la expresión génica, podría explicar porque en los machos a PN1 la expresión de *Ngn3* se iguala respecto a las hembras. En tejido proveniente de ratones transgénicos no observamos efecto de los cromosomas en ninguna de las edades evaluadas para ambas enzimas. Al haber evaluado los niveles de expresión tanto en los ratones *wild type* a E15 y PN1 como en los ratones transgénicos FCG, nos permite presentar resultados robustos que muestran que la expresión sexualmente dimórfica de *Ezh1* y *Ezh2* está determinada por el sexo gonadal. Hasta dónde llega nuestro conocimiento, el presente trabajo de tesina es el primer estudio en explorar y demostrar la expresión sexualmente dimórfica de *Ezh2* y *Ezh1* en hipotálamo ventromedial de ratón, sería

interesante para complementar estos resultados comparar el grado de metilación en H3K27 en el promotor de *Ngn3*, para comprobar si los machos a PN1 están menos metilados que a E15. Al comparar los valores de expresión entre ambas edades en *Ezh2* encontramos que solo en los machos la expresión disminuyó significativamente a PN1. Estos resultados nos llevaron a pensar que la expresión de *Ezh2* podría estar siendo regulada por las hormonas gonadales masculinas, es por esto que decidimos analizar el efecto de la estimulación con T sobre la expresión de *Ezh2*. Contrariamente a lo esperado, no observamos un cambio en los niveles de expresión de *Ezh2* en las hembras tratadas con T.

Nos propusimos seguir indagando acerca de otros mecanismos epigenéticos que podrían estar regulando la expresión de *Ngn3* y contribuir a su expresión sexualmente dimórfica. Entre los diferentes mecanismos epigenéticos elegimos evaluar la metilación y demetilación del ADN debido a la evidencia encontrada sobre trabajos que demuestran dimorfismos sexuales en cuanto a la expresión o actividad enzimática de enzimas que participan en estos mecanismos (Cisternas *et al.*, 2020b; McCarthy *et al.*, 2009; Nugent *et al.*, 2015; Schwarz *et al.*, 2010), y porque varios trabajos demuestran que la expresión de *Ngn3* es regulada por estas enzimas (Lefebvre *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2017). Entonces evaluamos la expresión de dos grupos de enzimas: DNMTs, metiltransferasas de ADN que colocan grupos metilos y reprimen la expresión génica, y TET, enzimas que participan en la remoción de metilos y promueven la expresión génica. En cuanto a las DNMTs, encontramos un dimorfismo sexual en la expresión de *Dnmt3a* a E15 donde los machos presentaron una menor expresión en comparación a las hembras, mientras que a PN1 no se observaron diferencias en la expresión de ninguna de las enzimas evaluadas. Estos resultados no son correlacionables con los niveles de *Ngn3*, ya que una mayor metilación en las hembras a E15 indica una mayor represión génica y por ende llevaría a una menor expresión de *Ngn3*. Al comparar los valores de expresión entre ambas edades encontramos que en los machos la expresión de *Dnmt1* y *Dnmt3a* aumentó significativamente a PN1, y se observó una tendencia hacia estos mismos valores en *Dnmt3b*, mientras que en las hembras no se encontraron diferencias en su expresión entre las dos edades. Estos resultados nos llevaron a pensar que la expresión de DNMTs podría estar siendo regulada por las hormonas gonadales masculinas, es por esto que analizamos el efecto de la estimulación con T sobre la expresión de DNMTs. Nuestros resultados mostraron que la T no alteró los niveles de expresión de ninguna de las DNMTs en las hembras tratadas con T. En un trabajo en el área preóptica del hipotálamo (POA) de ratas Nugent *et al.* (2015) reportaron un dimorfismo sexual en cuanto a la actividad

enzimática de DNMTs y los valores globales de metilación del ADN a PN0 y PN2, ambos parámetros presentan menores niveles en machos y estas diferencias desaparecen cuando las hembras son tratadas con estradiol. Sin embargo, en este mismo estudio cuando evalúan la expresión de ARNm de *Dnmt1/3a/3b* a PN0 y PN2 no encuentran diferencias sexuales y la expresión no es afectada por el tratamiento con estradiol. A pesar de que en nuestros resultados no encontramos diferencias en los niveles de expresión, no podemos descartar la posibilidad que exista una diferencia sexual en cuanto a la actividad enzimática, por esto sería interesante en un futuro evaluar la actividad enzimática de DNMTs y el grado de marcas 5mC en el promotor de *Ngn3* a E15 y PN1 y evaluar el efecto de la T sobre estos parámetros a fines de esclarecer el rol de la metilación del ADN sobre la regulación de la expresión génica de *Ngn3*.

En cuanto a las enzimas que participan en la demetilación del ADN evaluamos la expresión de las enzimas *Tet1*, *Tet2* y *Tet3*. Respecto a *Tet1* y *Tet2* a E15 no encontramos diferencias en su expresión, en tanto que la expresión de *Tet3* a E15 sí fue sexualmente dimórfica con una mayor expresión en las hembras. Estos resultados obtenidos en cuanto a la expresión de *Tet3* a E15 pueden correlacionarse con los niveles de *Ngn3* en el mismo estadio embrionario, ya que una mayor demetilación en las hembras a E15 se corresponde con una mayor expresión génica de *Ngn3*. A PN1 se observó una tendencia en *Tet2* hacia mayores niveles en las hembras y en cuanto a *Tet3* se mantuvo el patrón de expresión observado a E15, una expresión sexualmente dimórfica con mayores niveles en hembras. En base a estos resultados decidimos medir la expresión de *Tet3* en los ratones transgénicos para evaluar si su expresión estaba ligada a los cromosomas sexuales. No encontramos efecto de los cromosomas sexuales y nuevamente observamos que las hembras gonadales (XXh y XYh) presentaron mayores niveles de expresión de *Tet3*. Los resultados obtenidos a PN1 no tienen correlación con el patrón de expresión de *Ngn3* encontrado en PN1, ya que mayores valores de *Tet2* y *Tet3* en las hembras se corresponden con mayores niveles de *Ngn3*. Con los resultados obtenidos hasta el momento, no podemos comprobar el efecto de la demetilación activa del ADN sobre la regulación de la expresión de *Ngn3*; sería oportuno evaluar la actividad enzimática de estas enzimas y medir los niveles de 5hmC sobre el promotor de *Ngn3* en ambas edades. Con respecto a la expresión génica de las enzimas TET antes y durante el período crítico, al comparar los valores de expresión entre ambas edades encontramos que en los machos sólo la expresión de *Tet3* aumentó significativamente a PN1, mientras que en las hembras se observó un aumento en los niveles de expresión de *Tet1* a

PN1. Este cambio en la expresión de *Tet3* en los machos, pero no en las hembras nos llevó a pensar que podría haber una regulación hormonal en la expresión de la misma, por eso evaluamos los cambios en su expresión en ratones bajo tratamiento con T. Sin embargo, los resultados demostraron que la testosterona no afectó la expresión de *Tet3* en las hembras tratadas.

Considerando lo discutido y relacionando los resultados del presente trabajo con evidencias previas de nuestro laboratorio y otros grupos, proponemos la siguiente hipótesis sobre los factores y mecanismos que contribuyen a la expresión sexualmente dimórfica de *Ngn3* en hipotálamo ventromedial de ratón. Durante el estadio embrionario temprano el desarrollo del cerebro ocurre en ausencia de niveles significativos de hormonas gonadales, durante este periodo las hembras presentan una mayor expresión de *Kdm6a*, esta enzima retira marcas represivas en H3K27 y promueve la expresión de *Ngn3* la cual es mayor en las hembras. Por otro lado, los ratones machos presentan una mayor expresión de *Ezh2*, esta enzima coloca marcas represivas en H3K27 por lo que el promotor de *Ngn3* está enriquecido en ellas, y en consecuencia la expresión de *Ngn3* es reprimida. Como la represión no es absoluta en los machos ni nula en las hembras, el balance que se da entre la acción antagónica de las enzimas determina finalmente el estado transcripcional de *Ngn3*. Posterior al nacimiento, y luego del pico postnatal de secreción de las hormonas gonadales los niveles de *Kdm6a* no cambian, las hembras presentan una mayor expresión en comparación a los machos. Sin embargo, la expresión de *Ezh2* sí cambia, las hembras presentan mayores niveles de expresión de *Ezh2* y *Ezh1* y por el contrario los niveles de *Ezh2* disminuyen en los machos. Es decir, en las hembras aumenta la represión génica de *Ngn3* a través de la metilación en H3K27 y en los machos disminuye la represión. A modo de resumen podemos decir que, en estadios embrionarios tempranos la expresión sexualmente dimórfica de *Ngn3* es causada por diferencia sexuales en la expresión de los reguladores epigenéticos, mientras que a PN1 los dimorfismos en la expresión de estos mismos reguladores provocan que los niveles de *Ngn3* se igualen garantizando el desarrollo adecuado del hipotálamo en ambos sexos.

Los resultados de esta tesina aportan información novedosa y contribuyen al conocimiento de los mecanismos epigenéticos que participan en la regulación de la expresión sexualmente dimórfica de *Ngn3* y por tanto en el proceso de diferenciación sexual del cerebro. Estudios más detallados son necesarios para identificar a través de qué mecanismos o procesos la

testosterona gonadal afecta la expresión de *Ngn3*, y esclarecer el rol de la metilación/demetilación del ADN sobre la regulación de *Ngn3*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel J. M., D. M. Witt & E. F. Rissman. 2011. Sex differences in the cerebellum and frontal cortex: roles of estrogen receptor alpha and sex chromosome genes. *Neuroendocrinology* 93: 230-240.
- Agger, K., P. A Cloos, J. Christensen, D. Pasini, S. Rose, J. Rappsilber, I. Issaeva, E. Canaani, A. E. Salcini & K. Helin. 2007. UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449(7163): 731–734.
- Arnold, A. P. 2009. The organizational-activational hypothesis as the foundation for a unified theory of sexual differentiation of all mammalian tissues. *Hormones and Behavior* 55: 570-578.
- Arnold, A. P. 2017. Sex Differences in the Age of Genetics. En Pfaff, D.W. & M. Joëls *Hormones, brain, and behavior*, 3° ed. 33-48. Elsevier/Academic Press, Amsterdam, Países Bajos; Boston, Estados Unidos.
- Arnold, A. P. 2019. Rethinking sex determination of non-gonadal tissues. En Capel, B. *Sex Determination in Vertebrates*, 1° ed. 289-315. Elsevier/Academic Press.
- Arnold, A. P. 2022. X chromosome agents of sexual differentiation. *Nature reviews. Endocrinology* 18(9): 574–583.
- Arnold, A. P. & P. S. Burgoyne. 2004. Are XX and XY brain cells intrinsically different? *Trends in endocrinology and metabolism* 15(1): 6–11.
- Arnold, A. P. & R. A. Gorski. 1984. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 7: 413-442.
- Arnold, A. P., K. Reue, M. Eghbali, E. Vilain, X. Chen, N. Ghahramani, Y. Itoh, J. Li, J. C. Link, T. Ngun & S. M. Williams-Burris. 2016. The importance of having two X chromosomes. *Philosophical Transactions Soc Lond B Biol Sci* 371(1688), 20150113.
- Arnold, A. P., X. Chen & Y. Itoh. 2012. What a difference an X or Y makes: sex chromosomes, gene dose, and epigenetics in sexual differentiation. *Handbook of experimental pharmacology* (214): 67-88.
- Barker, J. M., M. M. Torregrossa, A. P. Arnold & J. R. Taylor. 2010. Dissociation of genetic and hormonal influences on sex differences in alcoholism-related behaviors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30(27): 9140–9144.
- Barraclough, C. A., 1961. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 68: 62-67.
- Barraclough, C. A. & R. A. Gorski. 1961. Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. *Endocrinology* 68: 68-79.
- Baum, M. J., 1979. Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. *Neuroscience and Biobehavioral reviews* 3(4): 265-284.

- Beyer, C., C. Pilgrim, & I. Reisert. 1991. Dopamine content and metabolism in mesencephalic and diencephalic cell cultures: sex differences and effects of sex steroids. *The Journal of Neuroscience* 11: 1325-1333.
- Burgoyne, P. S. & A. P. Arnold. 2016. A primer on the use of mouse models for identifying direct sex chromosome effects that cause sex differences in non-gonadal tissues. *Biology of Sex Differences* 7:68.
- Burgoyne, P. S., A. R. Thornhill, S. K. Boudrean, S. M. Darling, C. E. Bishop, & E. P. Evans. 1995. The genetic basis of XX-XY differences present before gonadal sex differentiation in the mouse. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 350: 253–261.
- Cabrera Zapata, L. E. 2020. *Rol de genes ligados al cromosoma X en la diferenciación sexual del cerebro* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Córdoba].
- Cabrera Zapata, L. E., C. D. Cisternas, C. Sosa, L. M. Garcia-Segura, M. A. Arevalo & M. J. Cambiasso. 2021. X-linked histone H3K27 demethylase Kdm6a regulates sexually dimorphic differentiation of hypothalamic neurons. *Cell Mol Life Sci.* 78(21-22): 7043-7060.
- Cabrera Zapata, L. E., M. J. Cambiasso & M. A. Arevalo. 2022. Epigenetic modifier Kdm6a/Utx controls the specification of hypothalamic neuronal subtypes in a sex-dependent manner. *Frontiers in cell and developmental biology* 10.
- Caeiro, X. E., F. R. Mir, L. M. Vivas, H. F. Carrer & M. J. Cambiasso. 2011. Sex chromosome complement contributes to sex differences in bradycardic baroreflex response. *Hypertension* 58: 505-511.
- Cambiasso, M. J., J. A. Colombo & H. F. Carrer. 2000. Differential effect of oestradiol and astroglia-conditioned media on the growth of hypothalamic neurons from male and female rat brains. *The European journal of neuroscience* 12: 2291-2298.
- Cedar, H., & Y. Bergman. 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews. Genetics* 10(5): 295–304.
- Chen, X., R. Watkins, E. Delot, R. Reliene, R. H. Schiestl, P. S. Burgoyne & A. P. Arnold. 2008. Sex difference in neural tube defects in p53-null mice is caused by differences in the complement of X not Y genes. *Developmental neurobiology* 68(2): 265–273.
- Chen, X., W. Grisham & A. P. Arnold. 2009. X chromosome number causes sex differences in gene expression in adult mouse striatum. *The European journal of neuroscience* 29(4): 768–776.
- Cisternas, C. D. 2015. *Participación de los cromosomas sexuales en la diferenciación sexual del cerebro* [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Córdoba].
- Cisternas, C. D., L. E. Cabrera Zapata, F. R. Mir, M. J. Scerbo, M. A. Arevalo, L. M. Garcia-Segura, & M. J. Cambiasso. 2020a. Estradiol-dependent axogenesis and Ngn3 expression are determined by XY sex chromosome complement in hypothalamic neurons. *Scientific Reports* 10(1): 8223.

- Cisternas, C. D., L. R. Cortes, E. C. Bruggeman, B. Yao & N. G. Forger. 2020b. Developmental changes and sex differences in DNA methylation and demethylation in hypothalamic regions of the mouse brain. *Epigenetics* 15(1-2): 72–84.
- Dadam, F. M., X. E. Caeiro, C. D. Cisternas, A. F. Macchione, M. J. Cambiasso & L. Vivas. 2014. Effect of sex chromosome complement on sodium appetite and Fos-immunoreactivity induced by sodium depletion. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 306: 175-184.
- De Vries, G. J., E. F. Rissman, R. B. Simerly, L. Y. Yang, E. M. Scordalakes, C. J. Auger, A. Swain, R. Lovell-Badge, P. S. Burgoyne & A. P. Arnold. 2002. A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 22(20): 9005–9014.
- Dewing, P., T. Shi, S. Horvath & E. Vilain. 2003. Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Brain research. Molecular brain research* 118: 82-90.
- Epsztejn-Litman, S., N. Feldman, M. Abu-Remaileh, Y. Shufaro, A. Gerson, J. Ueda, R. Deplus, F. Fuks, Y. Shinkai, H. Cedar & Y. Bergman. 2008. De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nature structural & molecular biology* 15(11): 1176–1183.
- Ferrari, K. J., A. Scelfo, S. Jammula, A. Cuomo, I. Barozzi, A. Stützer, W. Fischle, T. Bonaldi, & D. Pasini. 2014. Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Molecular cell* 53(1): 49–62.
- Gatewood, J. D., A. Wills, S. Shetty, J. Xu, A. P. Arnold, P. S. Burgoyne & E. F. Rissman. 2006. Sex chromosome complement and gonadal sex influence aggressive and parental behaviors in mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 26(8): 2335–2342.
- Gioiosa, L., X. Chen, R. Watkins, E. A. Umeda & A. P. Arnold. 2008. Sex chromosome complement affects nociception and analgesia in newborn mice. *The journal of pain* 9(10): 962–969.
- Goodfellow, P. N. & R. Lovell-Badge. 1993. SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 27: 71-92.
- Greer, E. L., & Y. Shi. 2012. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature reviews. Genetics* 13(5): 343–357.
- Hahn, M. A., R. Qiu, X. Wu, A. X. Li, H. Zhang, J. Wang, J. Jui, S. G. Jin, Y. Jiang, G. P. Pfeifer & Q. Lu. 2013. Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. *Cell reports* 3(2): 291–300.
- Hong, S., Y. W. Cho, L. R. Yu, H. Yu, T. D. Veenstra & K. Ge. 2007. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47): 18439–18444.

- Ito, S., A. C. D'Alessio, O. V. Taranova, K. Hong, L. C. Sowers & Y. Zhang. 2010. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466: 1129–1133.
- Itoh, Y., R. Mackie, K. Kampf, S. Domadia, J. D. Brown, R. O'Neill & A. P. Arnold. 2015. Four core genotypes mouse model: localization of the Sry transgene and bioassay for testicular hormone levels. *BMC Res Notes* 8: 69.
- Jenuwein, T. & C. D. Allis. 2001. Translating the histone code. *Science*:1074-80.
- Konse, K. D., A. Ma, L. Fengling, D. Barsyte-Lovejoy, T. Parton, C. J. Macnevin, F. Liu, C. Gao, X. Huang, E. Kusnetsova, M. Rougie, A. Jiang, S. G. Pattenden, J. L. Norris, L. I. James, B. L. Roth, P. J. Brown, S. V. Frye, C. H. Arrowsmith, K. M. Hahn, G. G. Wang, M. Vedadi & J. Jin. 2013. An Orally Bioavailable Chemical Probe of the Lysine Methyltransferases EZH2 and EZH1. *American Chemical Society* 8:1324-1334.
- Kusakabe, Y., T. Chiba, M. Oshima, S. Koide, O. Rizq, K. Aoyama, J. Ao, T. Kaneko, H. Kanzaki, K. Kanayama, T. Maeda, T. Saito, R. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Kiyonol, M. Nakamura, S. Ogasawara, E. Suzuki, S. Nakamoto, S. Yasui, R. Mikata, R. Muroyama, T. Kanda, H. Maruyama, J. Kato, N. Minura, A. Ma, J. Jin, Y. Zen, M. Otsuka, A. Kaneda, A. Iwama & N. Kato. 2021. EZH1/2 inhibition augments the anti-tumor effects of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports* 11: 21396.
- Lefebvre, B., S. Belaich, J. Longue, B. Vandewalle, J. Oberholzer, V. Gmyr, F. Pattou & J. Kerr-Conte. 2010. 5'-AZA induces Ngn3 expression and endocrine differentiation in the PANC-1 human ductal cell line. *Biochemical and biophysical research communications* 391(1): 305–309.
- Lenz, K. M. & M. M. McCarthy. 2010. Organized for sex-steroid hormones and the developing hypothalamus. *European Journal of Neuroscience* 32: 2096–2104.
- Makela, J. A., J. J. Koskenniemi, H. E. Virtanen & J. Toppari. 2019. Testis development. *Endocr Rev* 40(4): 857-905.
- Matsuda, K. I., H. Mori, B. M. Nugent, D. W. Pfaff, M. M. McCarthy, & M. Kawata. 2011. Histone deacetylation during brain development is essential for permanent masculinization of sexual behavior. *Endocrinology* 152(7): 2760–2767.
- Matsuda, K. I., H. Mori & M. Kawata. 2012. Epigenetic mechanisms are involved in sexual differentiation of the brain. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 13(3): 163–171.
- McCarthy, M. M. 2008. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev.* 88 (1): 91-124.
- McCarthy, M. M. 2011. *Sex and the Developing Brain*. Morgan & Claypool.
- McCarthy, M. M. & A. P. Arnold. 2011. Reframing sexual differentiation of the brain. *Nature Neuroscience* 14: 677-683.
- McCarthy, M. M., A. P. Auger, T. L. Bale, G. J. De Vries, G. A. Dunn, N. G. Forger, E. K. Murray, B. M. Nugent, J. M. Schwarz & M. E. Wilson. 2009. The epigenetics of sex

- differences in the brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 29(41): 12815–12823.
- McEwen, B. S., I. Lieberburg, C. Chaptal & L. C Krey. 1977. Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. *Hormones and Behavior* 9: 249-263.
- Mozzetta, C., J. Pontis, L. Fritsch, P. Robin, M. Portoso, C. Proux, R. Margueron & S. Ait-Si-Ali. 2014. The histone H3 lysine 9 methyltransferases G9a and GLP regulate polycomb repressive complex 2-mediated gene silencing. *Molecular cell* 53(2): 277–289.
- Murray, E. K., A. Hien, G. J. De Vries & N. G. Forger. 2009. Epigenetic control of sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology* 150(9): 4241–4247.
- Musri, M. M. & M. Párrizas. 2013. *Regulación epigenética en la adipogénesis y la obesidad*. Editorial Académica Española.
- Negri-Cesi, P., A. Colciago, A. Pravettoni, L. Casati, L. Conti & F. Celotti. 2008. Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: hormonal and environmental influences. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109(3-5): 294-299.
- Nugent, B. M., C. L. Wright, A. C. Shetty, G. E. Hodes, K. M. Lenz, A. Mahurkar, S. J. Russo, S. E. Devine & M. M. McCarthy. 2015. Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nature neuroscience* 18(5): 690–697.
- Okano, M., D. W. Bell, D. A. Haber & E. Li. 1999. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* 99: 247–257.
- O'shaughnessy, P. J., P. J. Baker, U. Sohnius, A. M. Haavisto, H. M. Charlton & I. Huhtaniemi. 1998. Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139: 1141-1146.
- O'shaughnessy, P. J., P. J. Baker & H. Johnston. 2006. The foetal Leydig cell-differentiation, function and regulation. *International Journal of Andrology* 29(1): 90-95; discussion 105-108.
- Pan, M. R., M. C. Hsu, L. T. Chen & W. C. Hung. 2018. Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. *Cellular and molecular life sciences* 75(2): 209–223.
- Pelling, M., N. Anthwal, D. Mcnay, G. Gradwohl, A. B. Leiter, F. Guillemot & S. L. Ang. 2011. Differential requirements for neurogenin 3 in the development of POMC and NPY neurons in the hypothalamus. *Developmental Biology* 349: 406–16.
- Pfaff, D. W. & Y. Christen. 2013. *Multiple origins of sex differences in brain: neuroendocrine functions and their pathologies*. Nueva York, Estados Unidos.
- Phoenix, C., R. Goy, A. Gerall & W. Young. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65: 369-382.

- Reisert, I. & C. Pilgrim. 1991. Sexual differentiation of monoaminergic neurons--genetic or epigenetic? *Trends in Neuroscience* 14: 468-473.
- Salama-Cohen, P., M. A. Arévalo, R. Grantyn & A. Rodríguez-Tébar. 2006. Notch and NGF/p75NTR control dendrite morphology and the balance of excitatory/inhibitory synaptic input to hippocampal neurons through Neurogenin 3. *J. Neurochem.* 97: 1269–78.
- Scerbo, M. J., A. Freire-Regatillo, C. D. Cisternas, M. Brunotto, M. A. Arevalo, L. M. Garcia-Segura & M. J. Cambiasso. 2014. Neurogenin 3 mediates sex chromosome effects on the generation of sex differences in hypothalamic neuronal development. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 188.
- Schwarz, J. M., B. M. Nugent & M. M. McCarthy. 2010. Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology* 151(10): 4871–4881.
- Smith-Bouvier, D. L., A. A. Divekar, M. Sasidhar, S. Du, S. K. Tiwari-Woodruff, J. K. King, A. P. Arnold, R. R. Singh & R. R. Voskuhl. 2008. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine* 205(5): 1099–1108.
- Szulwach, K.E., X. Li, Y. Li, C. X. Song, H. Wu, Q. Dai, H. Irier, A. K. Upadhyay, M. Gearing, A. I. Levey, A. Vasanthakumar, L. A. Godley, Q. Chang, X. Cheng, C. He & P. Jin. 2011. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nature neuroscience* 14: 1607–1616
- Tsai, H. W., P. A. Grant & E. F. Rissman. 2009. Sex differences in histone modifications in the neonatal mouse brain. *Epigenetics* 4(1): 47–53.
- Turner, B. M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays* 22(9): 836-45.
- Vertino, P.M., J. A. Sekowski, J. M. Coll, N. Applegreen, S. Han, R. J. Hickey & L. H. Malkas. 2002. DNMT1 is a Component of a Multiprotein DNA Replication Complex. *Cell Cycle* 1: 416–423.
- Viré, E., C. Brenner, R. Deplus, L. Blanchon, M. Fraga, C. Didelot, L. Morey, A. Van Eynde, D. Bernard, J. M. Vanderwinden, M. Bollen, M. Esteller, L. Di Croce, Y. de Launoit & F. Fuks. 2006. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439(7078): 871–874.
- Waddington C. H. 1957. *The strategy of the Genes*. (1st edition). Routledge.
- Whalen, R.E., 1964. Hormone-induced changes in the organization of sexual behavior in the male rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 57(2): 175-182.
- Wu, H. & Y. Zhang. 2011. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes & Development* 25: 2436–2452.
- Xie, J., L. Xie, H. Wei, X. J. Li, & L. Lin. 2023. Dynamic Regulation of DNA Methylation and Brain Functions. *Biology* 12(2): 152.

- Zhang, T. & M. J. Meaney. 2010. Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annual review of psychology* 61: 439-466.
- Zhou, C., H. Jiang, Z. Zhang, G. Zhang, H. Wang, Q. Zhang, P. Sun, R. Xiang & S. Yang. 2017. ZEB1 confers stem cell-like properties in breast cancer by targeting neurogenin-3. *Oncotarget* 8(33): 54388–54401.