



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

TESINA DE GRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ROL DE LA DEMETILACIÓN ACTIVA DEL ADN EN  
LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL DE OXITOCINA**

Tesinista: Bigarani, Rocio  
Directora: Dra. Cisternas, Carla Daniela  
Co-director: Dr. Mir, Franco Rafael

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

*Rol de la demetilación activa del ADN en la diferenciación sexual de oxitocina*

Alumna: Bigarani, Rocio

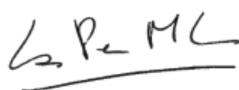
Directora: Dra. Cisternas, Carla Daniela

Co-director: Dr. Mir, Franco Rafael

Tribunal Examinador:

Dra. Las Peñas, María Laura

Firma

  
M. Laura Las Peñas

Dra. Miguel, Virginia

Firma

  
Dra. Virginia Miguel

Dr. Unsain, Nicolas

Firma

  
Dr. Nicolas Unsain

Calificación: 10 (Diez)

Fecha: 29/09/2023

*Dedicado a mi directora, quien me  
acompañó y aconsejó durante esta tesina;*

*A Mauricio, por ser incondicional;*

*A mis padres, por apoyarme siempre;*

*A mis abuelos, por dejarme soñar.*

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	6
LISTA DE GENES .....	7
RESUMEN .....	9
ABSTRACT .....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
Rol de las hormonas gonadales en la diferenciación sexual .....	11
Rol de los cromosomas sexuales en la diferenciación sexual.....	13
Modelo unificado de diferenciación sexual .....	14
Rol de la epigenética en la diferenciación sexual .....	15
Procesos involucrados en la diferenciación sexual y el rol de las hormonas gonadales sobre los mismos .....	19
Oxitocina y su expresión sexualmente dimórfica .....	21
HIPÓTESIS .....	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
1. Mantenimiento y cría de animales.....	24
2. Análisis de la expresión génica relativa por PCR en tiempo real.....	24
2.1 Obtención de la muestra por la técnica del sacabocados o “punch” .....	24
2.2 Extracción y purificación de ARN .....	25
2.3 PCR de retrotranscripción (RT-PCR).....	25
2.4 Determinación de la expresión génica de Tet1, Tet2, Tet3, Gadd45a, Gadd45b, TDG y OTR por PCR en tiempo real (qPCR).....	26
2.5 Análisis mediante el modelo matemático de Pfaffl.....	27
3. Análisis de la expresión de oxitocina por inmunohistoquímica.....	28
3.1 Obtención de cerebros para inmunohistoquímica.....	28
3.2 Inmunohistoquímica.....	28
3.3 Análisis de las imágenes .....	28
4. Análisis estadístico .....	29
EXPERIMENTOS REALIZADOS .....	30
1. Expresión génica de la maquinaria de demetilación activa del ADN y el mecanismo de reparación durante el desarrollo.....	30
2. Expresión de OXT y su receptor durante el desarrollo .....	30

2.1	Expresión de OXT por inmunohistoquímica después del periodo crítico. ....	30
2.2	Expresión del receptor de OXT durante y después del periodo crítico.....	30
RESULTADOS	.....	31
1.	Expresión génica de la maquinaria de demetilación activa del ADN y el mecanismo de reparación durante el desarrollo.....	31
1.1.	Expresión de Gadd45a y Gadd45b, TDG, Tet1, Tet2, Tet3 durante del periodo crítico.....	31
1.2	Expresión de Gadd45a y Gadd45b, TDG, Tet1, Tet2, Tet3 después del periodo crítico.....	34
2.	Evaluación de las diferencias sexuales en la expresión de OXT y su receptor durante el desarrollo. ....	37
2.1	Análisis de la expresión de OXT por inmunohistoquímica. ....	37
2.2	Análisis de los niveles de expresión del receptor de OXT por qPCR durante el desarrollo. ....	39
DISCUSIÓN	.....	42
BIBLIOGRAFÍA	.....	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

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**AVPV:** núcleo anteroventricular periventricular

**BER:** reparación por escisión de base

**BNST:** núcleo del lecho de la estría terminalis

**CpG:** regiones del ADN enriquecidas en guanina y citosina

**DNMTs:** ADN metiltransferasas

**E2:** 17 $\beta$ -estradiol o estradiol

**ER $\alpha$ :** receptor de estrógeno alfa

**E17:** 17 días de edad gestacional

**EDTA:** ácido etilen-diamino-tetraacético

**GADD45:** proteínas inducidas por el crecimiento y reparación de daño del ADN

**LH:** hormona luteinizante

**OTR:** receptor de oxitocina

**OXT:** oxitocina

**PFA:** paraformaldehído

**PFC:** corteza prefrontal

**PN0:** día de nacimiento

**PN7:** día postnatal

**PN10:** día postnatal 10

**PN18:** día postnatal 18

**PN20:** día postnatal 20

**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa

**PVN:** núcleo paraventricular del hipotálamo

**qPCR:** PCR cuantitativa en tiempo real

**RT-PCR:** PCR de retrotranscripción

**SON:** núcleo supraóptico del hipotálamo

**Sry:** región determinante de sexo del cromosoma Y

**T:** Testosterona

**TBS:** solución salina tamponada con Tris

**TDG:** ADN glicosilasa de timina

**TET:** metilcitosina dioxigenasas de translocación diez-once

**VMH:** hipotálamo ventromedial

## **LISTA DE GENES**

**18S o Rn18:** ARN ribosomal 18S

**Gadd45a:** proteína de detención del crecimiento y daño del ADN alfa

**Gadd45b:** proteína de detención del crecimiento y daño del ADN beta

**OTR:** receptor de oxitocina

**OXT:** oxitocina

**Tdg:** timina ADN glicosilasa

**Tet1:** tet metilcitosina dioxigenasa

**Tet2:** tet metilcitosina dioxigenasa 2

**Tet3:** tet metilcitosina dioxigenasa 3

## RESUMEN

**Palabras claves:** Oxitocina, diferenciación sexual, hormonas gonadales, demetilación activa del ADN.

Las diferencias sexuales en el fenotipo neuroquímico tienen profundas consecuencias y subyacen a diferencias en la función neuronal, la morfología, la conectividad y la producción de neurotransmisores en machos y hembras. Estudios recientes muestran que la expresión de enzimas que colocan o eliminan marcas de metilación del ADN es mayor en ratones neonatales durante el período crítico de diferenciación sexual y una inhibición neonatal de la metilación o demetilación del ADN suprime las diferencias sexuales en ciertos fenotipos celulares. En esta tesina, exploramos cómo las diferencias sexuales tempranas en la expresión génica de TET 1-2-3, GADD45a-b y TDG (implicados en la remoción de marcas de metilación en el ADN) pueden correlacionarse con la expresión génica de oxitocina (OXT) y su receptor (OTR) en regiones específicas del cerebro de ratón. La expresión de ARNm se evaluó mediante qPCR a partir de micropunch de corteza prefrontal (PFC), área preóptica (POA) y núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) en el día posnatal (P)7 y 18-20. En PFC, encontramos diferencias de sexo (machos>hembras) en la expresión de TET1-2-3, TDG y Gadd45a-b y una mayor expresión de OTR en los machos a PN7 ( $p<0,05$ ). También evaluamos la expresión de OXT mediante inmunohistoquímica a PN18-19 en POA, PVN y el núcleo supraóptico del hipotálamo, encontrando una mayor expresión de OXT en hembras en POA. Los resultados obtenidos sugieren que un patrón de expresión específico de sexo en la maquinaria de demetilación activa del ADN podría mediar los efectos organizacionales de las hormonas sexuales en fenotipo neuroquímico.

**ABSTRACT**

**Keywords:** Oxytocin, sexual differentiation, gonadal hormones, active DNA demethylation.

Sex differences in neurochemical cell phenotype have broad consequences and underlie differences in neuronal function, morphology, connectivity, and neurotransmitter production in males and females. Recent studies have shown that the expression of enzymes that place or remove DNA methylation marks is highest in neonatal mice during the critical period of sexual differentiation and a neonatal inhibition of DNA methylation or demethylation suppresses sex differences in certain cell phenotype. In this thesis, we explore how early sex differences in the gene expression of TET 1-2-3, GADD45a-b and TDG (involved in the removal of DNA methylation marks) may correlate with gene expression of oxytocin (OXT) and the oxytocin receptor (OTR) in specific regions of the mouse brain. mRNA expression was evaluated by qPCR in brain punches of prefrontal cortex (PFC), preoptic area (POA), and paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) at postnatal day (P)7 and 18-20. In PFC, we found sex differences (males>females) in TET1-2-3, TDG and Gadd45a-b expressions and higher OTR expression in males at PN7 ( $p<0.05$ ). We also evaluated the expression of OXT by immunohistochemistry at PN18-19 in the POA, PVN and the supraoptic nucleus of the hypothalamus (SON) and found higher expression of OXT in female POA. Overall, these results suggest that a sex-specific pattern of active DNA demethylation machinery during neonatal life could underline the organizational effects of hormones on neurochemical phenotype.

## INTRODUCCIÓN

Cuando hablamos de diferenciación sexual estamos definiendo un proceso complejo que ocurre temprano en el desarrollo y en el cual participan factores organizacionales y activacionales necesarios para la organización y expresión de características sexualmente dimórficas en el organismo. Este dimorfismo se puede observar en múltiples tejidos y órganos no gonadales, como el cerebro. Podemos decir, entonces, que existen diferencias sexuales entre el cerebro de machos y hembras, las cuales se encuentran a distintos niveles químicos, arquitectónicos, fisiológicos, y que a su vez determinan diferencias sexuales a nivel del comportamiento e incluso en la susceptibilidad a padecer enfermedades del neurodesarrollo, psiquiátricas y neurodegenerativas. Por esta y muchas otras razones, la magnitud y alcance biológico de esas diferencias es foco de análisis y debates, los cuales buscan comprender los mecanismos celulares que participan en la organización de los circuitos neuronales en el cerebro.

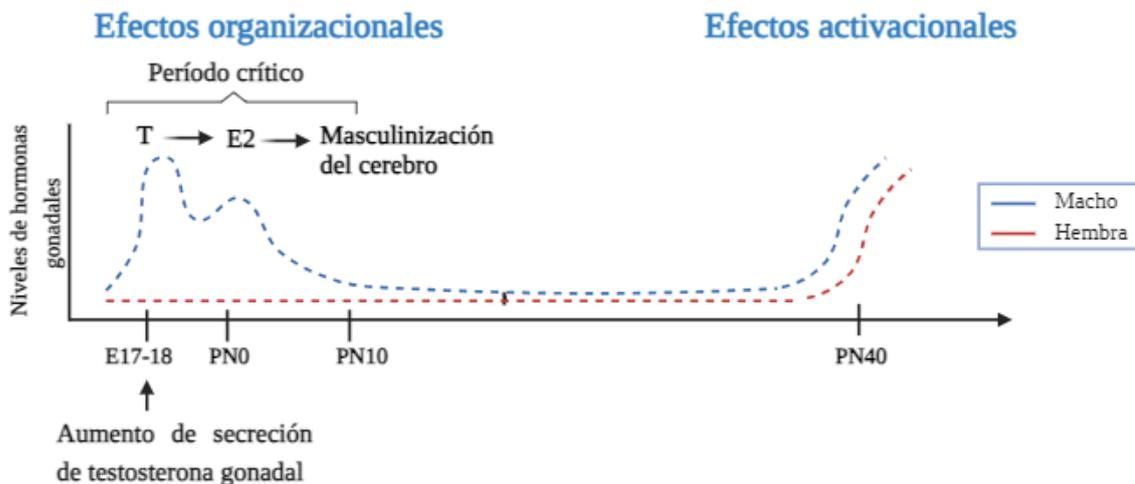
En la actualidad se conoce que el establecimiento de dimorfismos sexuales en el cerebro durante el desarrollo está influenciado por el ambiente trófico particular de cada sexo debido a diferencias en la secreción de hormonas gonadales y por un patrón genético y epigenético distinto para machos y hembras generado por la diferencia en la expresión de genes ligados a los cromosomas sexuales X e Y (Arnold et al., 2016; Arnold, 2017; McCarthy et al., 2011).

### **Rol de las hormonas gonadales en la diferenciación sexual**

Los primeros estudios realizados por Phoenix y colaboradores en la década de los cincuenta sentaron la base para entender como las hormonas gonadales influyen sobre la diferenciación sexual del cerebro, proporcionando un marco teórico y experimental que luego sería replicado en muchos otros estudios.

De acuerdo con estos trabajos, en el proceso de diferenciación sexual del cerebro, la testosterona (T) y el estradiol (E2) actúan durante el periodo temprano por medio de efectos llamados organizacionales (Phoenix et al., 1959). Dicho proceso ocurre secundariamente a la determinación sexual que deriva del sexo cromosómico o sexo genético del individuo (XX para hembras y XY para machos) y que determina que la gónada inicialmente bipotencial se diferencie a testículos u ovarios por la presencia específica del gen *Sry* (del inglés “Sex

determinig región Y”) en el cromosoma Y en roedores (Koopman et al., 1991), induciendo la secreción de testosterona producida por los testículos fetales. Estas hormonas gonadales masculinizan el cerebro durante el período crítico para la diferenciación sexual mediada por hormonas, que se extiende desde el pico de secreción testicular, alrededor del día embrionario (E) 17 hasta el día posnatal (P) 10 aproximadamente en ratones (O’Shaughnessy, 2006, Figura 1).



**Figura 1. Efectos organizacionales y activacionales de los esteroides gonadales sobre el cerebro.** El establecimiento de las diferencias sexuales en la fisiología y la conducta ocurre en función de la exposición a esteroides gonadales durante el período crítico perinatal. En roedores el pico en la secreción de T a E17-18 define el inicio del periodo crítico. En hembras el ovario en desarrollo permanece inicialmente latente y determina un ambiente temprano libre de T y E2. El final del período crítico perinatal se caracteriza por la pérdida de sensibilidad del cerebro de hembras a la T exógena (adaptado de McCarthy, 2008). **E2:** estradiol. **E17-18:** 17-18 días de edad gestacional. **PN0:** día de nacimiento. **PN10:** día postnatal 10. **PN40:** día postnatal 40. **T:** testosterona.

Una vez secretada en las gónadas, la T atraviesa la barrera hematoencefálica ocasionando que el cerebro y las estructuras sensibles a esteroides que estén expuestos a ellos se diferencien. Es importante destacar que la mayoría de los efectos organizacionales de la testosterona sobre el encéfalo de los roedores se deben en realidad a los estrógenos o, más precisamente, al E2 formado a partir de la conversión (aromatización) a nivel intracelular de la testosterona, el cual es el estrógeno más abundante y biológicamente activo en mamíferos (Lephart, 1996). Luego, posterior a la pubertad y durante la vida adulta, las acciones agudas de los esteroides sobre el cerebro son llamadas activacionales (Arnold & Gorski, 1984; Lephart, 1996).

Phoenix y colaboradores evaluaron la hipótesis organizacional/activacional sobre dos dimorfismos sexuales estrechamente relacionados con la reproducción: la conducta de lordosis y la secreción de la hormona luteinizante (LH) pulsátil en machos y cíclico en hembras. Dicho estudio fue realizado en conejillas de indias hembra preñadas a las cuales inyectaron testosterona para masculinizar el cerebro de las crías hembra. Cuando las conejillas de indias hembra son expuestas a T exógena antes de PN10 no solo carecen de receptividad sexual en la vida adulta, sino que también son estériles y si además son tratadas con andrógenos en la vida adulta exhiben un aumento en el número de montas en presencia de una hembra receptiva. En otras palabras, el cerebro de las hembras es masculinizado cuando es expuesto a esteroides exógenos durante el período crítico (McCarthy, 2008; Fig. 1).

De esta manera se marcó el camino que permitió formular lo que hoy se conoce como hipótesis clásica de la diferenciación sexual: la testosterona producida por los testículos en desarrollo llega al cerebro y organiza los circuitos cerebrales en machos que luego en la adultez responden a los efectos activacionales. En hembras, por el contrario, la ausencia de secreciones gonadales durante el periodo de sensibilidad perinatal conduce al desarrollo de un cerebro típicamente femenino el cual en la adultez será capaz de generar respuestas fisiológicas y comportamentales distintas a los machos ante la influencia de las hormonas (McCarthy, 2008; Negri-Cesi et al., 2008).

### **Rol de los cromosomas sexuales en la diferenciación sexual**

A finales del siglo XX la idea de que las hormonas gonadales eran las principales protagonistas de los dimorfismos sexuales fenotípicos en vertebrados fue dando lugar a la idea de que no todas las diferencias sexuales son dependientes de las hormonas gonadales o bien no pueden explicarse únicamente por acción de estas como planteaba la hipótesis clásica (Arnold & Burgoyne, 2004; Arnold, 2017, Caeiro et al., 2011; Dadam et al., 2014), sino que existen diferencias intrínsecas entre las células XX vs. XY antes de haber sido expuestas a los esteroides in útero (Cambiasso et al., 2000; Cabrera Zapata et al., 2021; 2022; Cisternas et al., 2015; Scerbo et al., 2014).

En mamíferos, el complemento cromosómico XX y XY es el encargado de iniciar el proceso de la determinación sexual durante el desarrollo temprano del cigoto. Esto es así por

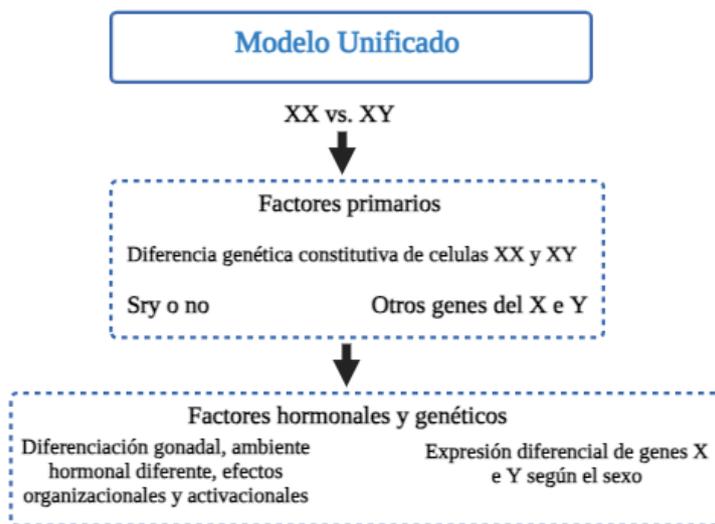
la existencia únicamente en el cromosoma Y del gen *Sry* el cual comienza a expresarse en la embriogénesis temprana en las gónadas indiferenciadas de los individuos XY iniciando el proceso de diferenciación testicular y en los individuos XX la diferenciación de los ovarios (en conjunto con ciertos genes autosómicos y otros ligados al cromosoma X) (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 comienzan a manifestarse tan pronto como se activa el transcriptoma embrionario y continúan a lo largo de toda la vida regulando la expresión de genes autosomales e interviniendo también en la modulación y definición de circuitos neuronales (Arnold, 2017; Burgoyne & Arnold, 2016).

Algunas de las variables que difieren según el sexo y están influenciadas por el complemento cromosómico sexual descritas hasta el momento son la expresión diferencial de genes, conductas sociales complejas, el comportamiento agresivo y parental, nocicepción, abuso de alcohol y susceptibilidad a enfermedades neurales (Abel et al., 2011; Barker et al., 2010; Chen et al., 2008, 2009; De Vries et al., 2002).

### **Modelo unificado de diferenciación sexual**

Como se mencionó anteriormente, la hipótesis clásica plantea que los efectos diferenciadores de los cromosomas sexuales se reducían a la determinación del sexo gonadal mediante la presencia/ausencia del gen *Sry*: de allí en adelante, eran los ambientes hormonales masculino o femenino los encargados de establecer las diferencias fenotípicas en los tejidos no gonadales. Sin embargo, nuestro conocimiento actual nos permite entender que desde el preciso momento en el que se establece el cigoto y el complemento cromosómico sexual del nuevo individuo queda definido como XX o XY, 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 (Arnold, 2017; Burgoyne & Arnold, 2016; Pfaff & Christen, 2013). De esta manera, hoy en día se plantea un modelo unificado de la diferenciación sexual en donde la participación de los cromosomas X e Y en la diferenciación sexual del cerebro y otros tejidos no gonadales comienza en el cigoto mismo y continúa a lo largo de toda la vida del individuo, mediante la expresión diferencial de los genes ligados a dichos cromosomas y su influencia sobre la expresión de genes

autosomales (Wijchers et al., 2010). A su vez, la presencia del gen *Sry* durante el desarrollo embrionario conducirá a la diferenciación testicular o, en su ausencia, a la formación de ovarios, introduciendo así el segundo gran factor generador de dimorfismos sexuales: un ambiente hormonal de tipo masculino o femenino, el cual también aportará a la diferenciación sexual del fenotipo durante el resto de la vida. Por último, es importante mencionar que ambos factores (complemento cromosómico sexual y hormonas sexuales) pueden confluir e interactuar sobre un carácter dado de modo sinérgico o antagónico, estableciendo diferencias entre los sexos o compensando sus efectos, lo cual resulta en la atenuación/anulación de las diferencias (Arnold, 2019; Arnold et al., 2013; McCarthy & Arnold, 2011; Figura 2).



**Figura 2. Modelo unificado de diferenciación sexual.** El modelo unificado actual reconoce múltiples factores codificados por los cromosomas sexuales actuando en paralelo y activando numerosas vías secundarias, hormonales y genéticas, para causar o reducir las diferencias sexuales en el fenotipo del organismo. El modelo unificado reconoce a las hormonas gonadales con un rol dominante dentro del grupo de factores secundarios que causan las diferencias sexuales en mamíferos (tomado y adaptado de Arnold et al., 2013).

### Rol de la epigenética en la diferenciación sexual

Los esteroides gonadales establecen la organización de los circuitos cerebrales en machos y hembras, siendo sus efectos en muchos casos permanentes y capaces de persistir aún en la ausencia de la señal que le dio origen. Esto se conoce como memoria celular a largo plazo por la exposición transitoria a las hormonas y actualmente las evidencias sugieren que los mecanismos epigenéticos están involucrados en la regulación de estos efectos (Auger & Auger, 2011; Cisternas et al, 2020b; Forger, 2017; Nugent et al., 2015; Mosley et al., 2017; Murray et al., 2009; Schwarz et al., 2010).

El estudio de la epigenética se basa en las modificaciones covalentes del ADN o histonas que influyen la expresión de los genes sin alterar la secuencia de ADN, y en el contexto de la diferenciación sexual del cerebro como proceso del desarrollo temprano, se enfoca

principalmente en los mecanismos reguladores que establecen y/o mantienen la expresión de los genes para comprender el origen de las diferencias sexuales. Estudios han demostrado que existen diferencias sexuales en el patrón de acetilación o metilación de histonas en algunas regiones antes del nacimiento por lo cual estaría actuando como un factor sexo-específico (Matsuda et al., 2011). Dentro de las marcas epigenéticas, la más estudiada y estable es la metilación del ADN en donde la 5-metilcitosina (5mC) es controlada por ADN metiltransferasas o DNMTs. Las enzimas *Dnmt3a* y *Dnmt3b* colocan marcas 5mC nuevas, mientras que la enzima *Dnmt1* participa en el mantenimiento del patrón de metilación entre cadenas complementarias de ADN (Hata et al., 2002; Klose & Bird, 2006). La relevancia de la metilación del ADN en los efectos organizadores de las hormonas sexuales radica en que es uno de los procesos que mejor explica la regulación a largo plazo de la expresión génica y el establecimiento de diferencias sexuales durante el desarrollo. Se han reportado diferencias sexuales en el patrón de metilación global en el hipotálamo y estriado de roedores neonatales y adultos (Ghahramani et al., 2014; Nugent et al., 2015) y la alteración del patrón de metilación en el área preóptica/núcleo del lecho de la estría terminalis (POA/BNST) al día postnatal 4 en hembras tratadas con testosterona al nacer siendo el número de genes afectados a corto plazo menor que el número de genes afectados en la adultez (Ghahramani et al., 2014). Estos resultados nos indican que la programación epigenética a largo plazo está regulada por hormonas sexuales, siendo la testosterona gonadal durante el periodo perinatal quien masculiniza el patrón de metilación y cuyos efectos son en mayor medida evidenciables en animales adultos. Otro estudio realizado en ratas proporcionó una evidencia similar, pero se administró estradiol en lugar de testosterona en hembras, sugiriendo entonces que es el estradiol formado en el cerebro por aromatización de la testosterona gonadal quien regula estas diferencias sexuales en metilación (Nugent et al., 2015).

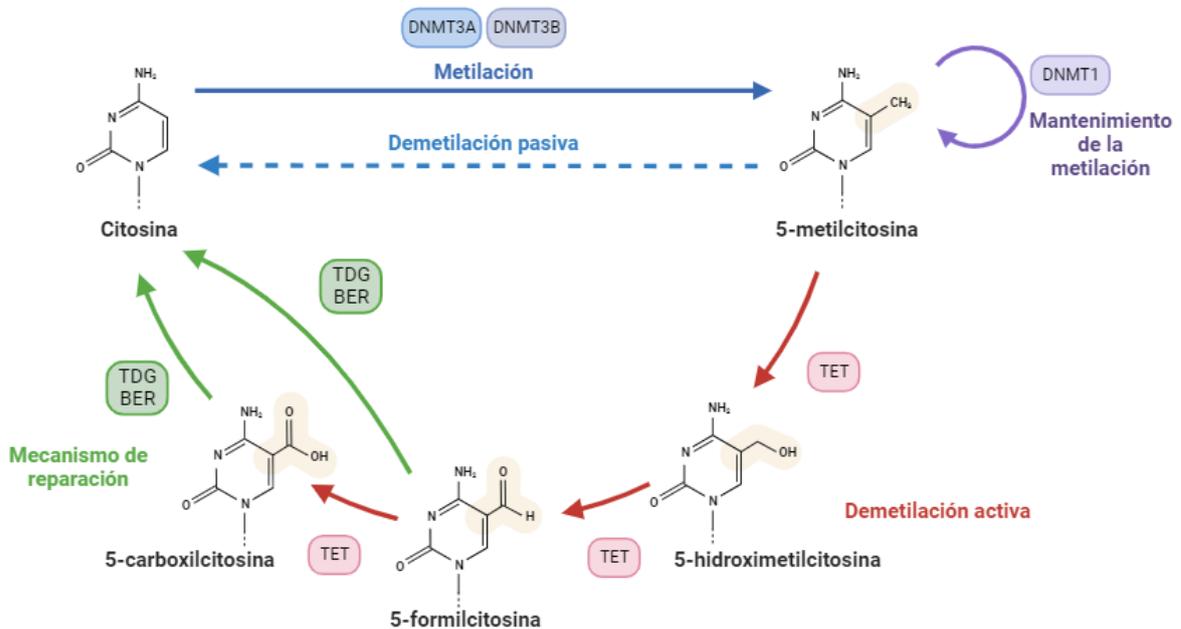
En línea con estas evidencias, la inhibición neonatal de la metilación del ADN tiene efectos a largo plazo y elimina diferencias sexuales morfológicas como por ejemplo en el patrón de espinas dendríticas del POA en ratas (Nugent et al., 2015) y las diferencias sexuales en fenotipo neuronal en POA e hipotálamo ventromediano (VMH) de ratón (Mosley et al., 2017) y masculiniza la conducta de cópula en ratas hembra (Nugent et al., 2015). Estudios similares se realizaron sobre neuronas que expresan calbindina en el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica y células que expresan el receptor de estrógeno alfa ( $ER\alpha$ ) en la porción ventrolateral del hipotálamo ventromedial (Cisternas et al., 2020b). En los resultados se evidenció que el número de neuronas que expresan calbindina en machos es

mayor, mientras que el número de células que expresan ER $\alpha$  es menor por la exposición perinatal a las hormonas sexuales (Cisternas et al., 2020b; Mosley et al., 2017). Ratonas hembras masculinizadas al nacer por el tratamiento con testosterona presentan al día postnatal 25 valores similares a machos controles en el número de neuronas positivas para calbindina y ER $\alpha$  en estas regiones del cerebro (Cisternas et al., 2020b). La inhibición de la metilación del ADN a través de inyecciones intracerebroventriculares del inhibidor de la metilación del ADN, zebularina, al nacer masculiniza el número de neuronas que expresan calbindina en hembras, mientras que en machos altera esa masculinización aumentando significativamente el número de células que expresan ER $\alpha$  en VMHvl (Cisternas et al., 2020b; Mosley et al., 2017). Estos hallazgos indican que la inhibición de la metilación del ADN al nacer masculiniza o feminiza la expresión génica dependiendo del gen y región del cerebro.

La metilación del ADN fue considerada por largo tiempo una marca represiva de carácter permanente, siendo la demetilación pasiva durante la replicación el único mecanismo para quitarla. Sin embargo, los niveles de 5mC en el cerebro de mamíferos son dinámicos durante el desarrollo (Lister et al., 2013; Ooi & Bestor, 2008; Schwarz et al., 2010), por lo que debe entenderse al mecanismo de remoción de marcas de metilación como un proceso activo.

Las enzimas que forman parte del mecanismo activo de demetilación del ADN son las proteínas TET (*Tet1*, *Tet2* y *Tet3*). Durante el proceso que involucra la oxidación de citosinas, las TET catalizan la oxidación de 5mC a 5hmC (5-hidroximetilcitosina) y posteriormente participan en la formación de 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxicitosina (5caC) (Ito et al., 2011). *Tet1-3* se expresan en cerebro siendo *Tet3* la más abundante, seguida por *Tet2* (Szwagierczak et al., 2010). Al igual que su precursora, 5hmC se encuentra enriquecida en cerebro de mamíferos comparado con otros tejidos, con una vida media larga especialmente en neuronas (Mellén et al., 2012; Yu et al., 2012). Esos niveles de 5hmC en el cerebro aumentan a lo largo del desarrollo, particularmente en la corteza prefrontal de humanos (Lister et al., 2013) y en hipocampo e hipotálamo de ratones (Cisternas et al., 2020a). Además, presenta una alta expresión génica (Mellén et al., 2017), lo que indica que 5hmC es un intermediario en el proceso de la demetilación activa y también permanece en el epigenoma como marca epigenética (Fig. 3). A continuación de la demetilación iniciada por las TETs, puede ocurrir un mecanismo de escisión y reparación del ADN (BER, por sus siglas en inglés) que remueve las citosinas metiladas y las reemplaza por citosinas no modificadas mediante BER (Barreto et al., 2007; Niehrs & Schäfer, 2012). En este

mecanismo participan una familia de proteínas nucleares llamadas Proteína 45 (GADD45) inducida por crecimiento y daño en el ADN (Gadd45a, Gadd45b y Gadd45g) que reclutan e interactúan con una desaminasa y timina ADN glicosilasa (TDG) quienes remueven las citosinas metiladas o hidroximetiladas y las convierten en timina o hidroximetiluracilo que luego son eliminados por BER (Gavin et al., 2013; Li et al., 2015; Niehrs and Schäfer, 2012) (Fig. 3). Tanto Gadd45 como TDG se unen a receptores nucleares, incluyendo al ER $\alpha$ , actuando como co-activadores nucleares (Yi et al., 2000).

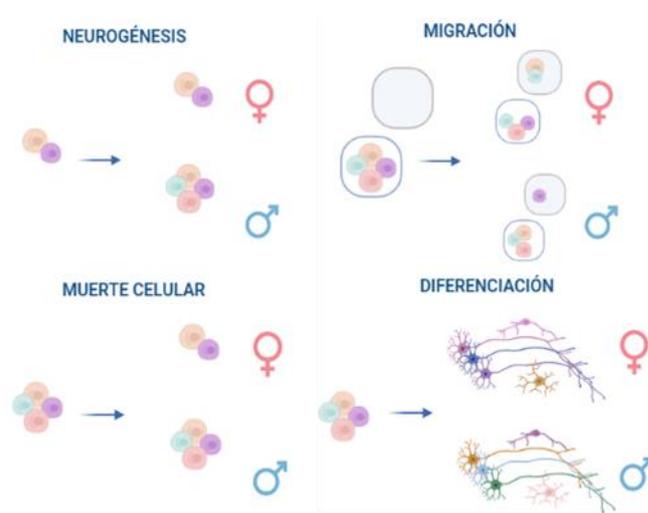


**Figura 3. Mecanismo de metilación/demetilación del ADN y mecanismo de reparación.** Las enzimas DNMTs facilitan la metilación de la citosina y su mantenimiento. Las proteínas TET (*Tet1*, *Tet2* y *Tet3*) catalizan la oxidación de 5mC a 5hmC (5-hidroximetilcitosina) y posteriormente participan en la formación de 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxilcitosina (5caC) participando en el mecanismo de demetilación activa del ADN. La vía de sustitución de citosinas metiladas u oxidadas y reemplazo por citosinas no modificadas mediante BER (mecanismo de reparación del ADN) coordina el proceso de demetilación al reclutar una timina ADN glicosilasa (TDG) por Gadd45.

Por lo tanto y con la información obtenida hasta el momento, la participación de la metilación del ADN en los efectos organizadores de las hormonas sexuales en conjunto con los cambios dinámicos que experimenta la misma durante el desarrollo postnatal, involucran la demetilación activa del ADN, aunque no se conoce su función en la diferenciación sexual del cerebro ni el rol de la hidroximetilación como marca epigenética en sí misma.

## Procesos involucrados en la diferenciación sexual y el rol de las hormonas gonadales sobre los mismos

El efecto de las hormonas gonadales en la diferenciación sexual del cerebro puede afectar uno de cuatro mecanismos: 1) nacimiento de células, 2) migración diferencial de neuronas hacia su destino final, 3) muerte celular o 4) diferenciación celular. Para comprender cómo actúan las hormonas esteroideas para diferenciar el cerebro es importante identificar cuál de los cuatro procesos clave está involucrado, aunque en ocasiones puede verse afectado más de un proceso o una combinación de varios según la región del cerebro en estudio (McCarthy & Arnold, 2011; Pfaff and Joels, 2016; Figura 4).



**Figura 4. Mecanismos clave por los que se establecen las diferencias sexuales en neuroanatomía.** Las diferencias sexuales en una región particular del cerebro pueden darse por el nacimiento de células nuevas (que eventualmente se diferenciarán en neuronas o glía); por una migración diferencial hacia esa región; por un mayor porcentaje de muerte celular en un sexo u otro durante el período crítico y también por diferenciación celular, lo cual involucra tanto al fenotipo neuroquímico de neuronas particulares como a la naturaleza y extensión de las conexiones sinápticas desarrolladas por neuronas particulares (tomado y adaptado de Pfaff, 2009).

En principio, la testosterona podría causar diferencias sexuales al influir en cualquiera de los cuatro procesos principales de desarrollo, pero a la fecha no existen evidencias que muestren claramente la generación de diferencias sexuales por parte de las hormonas gonadales mediante la regulación de los procesos de neurogénesis/gliogénesis y migración celular, ya que estos procesos normalmente han finalizado durante el desarrollo de las principales regiones sexualmente dimórficas antes de que la diferenciación testicular culmine o antes de que los niveles de testosterona aumenten significativamente (Han & De Vries, 1999). Por el contrario, en cuanto al proceso de muerte y diferenciación celular, existen numerosas evidencias que muestran una regulación hormonal sexo-específica sobre estos mecanismos, el cual ocurre naturalmente a lo largo del desarrollo de distintas regiones (Chung et al., 2000; Forger, 2006).

El proceso de la diferenciación celular en términos de la definición del fenotipo neuroquímico, el desarrollo neuritogénico y el establecimiento de sinapsis, es el mecanismo más estudiado y mejor caracterizado entre los mencionados, y quizás el que en mayor medida aporta al establecimiento de circuitos sexo-dimórficos. Si bien las diferencias sexuales en el cerebro se han estudiado intensamente durante los últimos cincuenta años, ofreciendo información sobre los fundamentos neuronales de las diferencias sexuales en el comportamiento y las vulnerabilidades a los trastornos neuropsiquiátricos, muchas de las primeras diferencias caracterizadas fueron principalmente estructurales. Particularmente, el laboratorio en donde se realizó esta tesina tiene una vasta experiencia en el tema, demostrando, por ejemplo, que E2 promueve la elongación axonal *in vitro* mediante la activación de una vía de señalización específica únicamente en neuronas hipotalámicas de embriones macho, sin observarse ningún efecto en las neuronas derivadas de hembra (Cabrera Zapata et al., 2019; Cambiasso & Carrer, 2001; Gorosito y Cambiasso, 2008). Con el advenimiento de las técnicas moleculares, se hizo posible la identificación de la diferenciación sexual en el fenotipo neuroquímico y los mecanismos por los que se constituyen patrones estables que persisten a largo plazo (Cortés & Forger, 2023). Muchos de esos patrones de expresión génica en las neuronas son orquestados por mecanismos epigenéticos durante el desarrollo (Hsieh & Gage, 2004; Iqbal et al., 2012), que funcionan como una memoria celular durante la exposición perinatal a la testosterona, persistiendo a la diferenciación sexual del fenotipo neuroquímico.

Como se mencionó antes, gran parte de la investigación de los mecanismos epigenéticos en la programación de las diferencias sexuales se centran en modificaciones post-traduccionales de las proteínas histonas que rodean las cadenas de ADN o modificaciones covalentes en el propio ADN, como la metilación llevada a cabo por las enzimas DNMT, también conocidas como “escritores” y su eliminación mediante la actividad de las enzimas TET, también conocidas como “borradores” de metilación del ADN. Uno de los estudios que evaluó el rol de la epigenética en la diferenciación sexual de fenotipos neuroquímicos utilizó zebularina para inhibir las DNMT al nacer en ratones (Cisternas et al., 2020b; Mosley et al., 2017), demostrando que la inhibición de la metilación del ADN al nacer altera la diferenciación sexual de grupos celulares definidos neuroquímicamente y feminiza o masculiniza el fenotipo, dependiendo de la región del cerebro o el tipo celular (Cisternas et al., 2020b; Mosley et al., 2017). Así mismo, los “borradores” de metilación del ADN también tienen un papel importante en la diferenciación sexual, alterando la expresión fenotípica de

genes como ER $\alpha$ , calbindina y kisseptina (Cisternas et al., 2020b; Cortés et al., 2022), y si esos mecanismos epigenéticos se encuentran regulados por las hormonas gonadales, ambos de alguna manera interactúan para dar forma al cerebro y definir patrones estables de expresión génica. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la diferenciación sexual del fenotipo celular siguen siendo poco estudiados (Cortés & Forger, 2023).

### **Oxitocina y su expresión sexualmente dimórfica**

La oxitocina (OXT) es un neuropéptido implicado en la regulación de conductas sociales complejas específicas de la especie y el sexo. Presenta diferencias sexuales en algunas regiones del cerebro y su expresión genética se encuentra regulada por las hormonas gonadales (testosterona/estradiol) (de Vries & Miller, 1998; Rood et al., 2013). Se considera que es uno de los sistemas altamente estudiado demostrando, por ejemplo, su participación en el reconocimiento social y la memoria, los comportamientos de los padres, los vínculos sociales y la cooperación (Donaldson & Young, 2008; Johnson & Young, 2017). A su vez, se cree que está desregulado en trastornos neuropsiquiátricos del desarrollo que presentan diferencias sexuales como el autismo, la ansiedad social y la esquizofrenia (Andari et al., 2016; Carter, 2007; Grinevich & Neumann, 2021; Miller et al., 2013), haciendo cada vez más importante su estudio. El mismo es producido en regiones discretas del hipotálamo incluyendo el núcleo supraóptico (SON) y el paraventricular (PVN).

Dicho neuropéptido contiene algunas características genéticas que lo hacen buen candidato para la regulación epigenética por T o E2, como la presencia de islas CpG (regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos) que podrían estar involucradas en regulación epigenética mediada por metilación/demetilación del ADN y a su vez existe un sitio compuesto de respuesta a hormonas localizado próximo al gen de OXT y que media su regulación por estradiol. Sin embargo, no queda claro cómo es mantenida la demetilación del ADN y más importante aún, cuál es el mecanismo por el cual estradiol regula la demetilación del ADN durante el desarrollo. Con respecto al sistema oxitocinérgico, se ha reportado que pacientes con trastorno del espectro autista presentan una disminución en la expresión del receptor de oxitocina (OTR) debido a incrementos en la metilación (Gregory et al., 2009) y ratones knockout para *Tet1* presentan menor expresión de OTR debido a hipermetilación, lo cual ha sido asociado a alteraciones en la conducta social y cuidado materno (Towers et al., 2018).

Esta tesina tiene como objetivo general evaluar el rol de la demetilación del ADN en el establecimiento de diferencias sexuales en la expresión génica durante el período crítico de diferenciación sexual del cerebro, poniendo a prueba la hipótesis de que estradiol regula la diferenciación sexual durante el desarrollo por medio de mecanismos de metilación/demetilación del ADN. Para encontrar el punto de interacción de la vía de señalización de estradiol sobre la regulación de la diferenciación sexual de un fenotipo neuroquímico se trabajó sobre el sistema oxitocinérgico por estar sujeto a regulación por hormonas sexuales durante el desarrollo perinatal.

## **HIPÓTESIS**

Los esteroides gonadales regulan la diferenciación sexual durante el desarrollo por medio de mecanismos de metilación/demetilación del ADN.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el rol de la demetilación del ADN en el establecimiento de diferencias sexuales en la expresión génica durante el período crítico de diferenciación sexual del cerebro.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Evaluar las diferencias sexuales en el mecanismo de demetilación basado en reparación del ADN durante el período crítico de diferenciación sexual del cerebro.
- 2) Evaluar las diferencias sexuales en la expresión de oxitocina y su receptor al día postnatal 18-20.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Mantenimiento y cría de animales

Los experimentos de la presente tesis fueron realizados en ratones de la cepa salvaje (*wild-type*) C57BL/6, alojados en el bioterio del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET-UNC). Los animales fueron mantenidos a temperatura constante (23°C), con agua y alimento *ad libitum* y con un ciclo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Los protocolos para el cuidado, bienestar y buen uso de todos los animales de experimentación fueron aprobados y controlados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) del Instituto Ferreyra, según normativas nacionales e internacionales en la materia (RES 1/2020). Los nacimientos de las camadas utilizadas en este estudio fueron programados realizando extendidos vaginales a las hembras para determinar la etapa del ciclo estral. Los apareamientos se realizaron en la noche del proestro de las hembras y al día siguiente se removió al macho de la caja. La mañana en la que se encontraron crías en la caja de maternidad se estableció como día de nacimiento (PN0).

### 2. Análisis de la expresión génica relativa por PCR en tiempo real

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo mediante PCR de retrotranscripción (RT-PCR) seguida de un análisis de cuantificación relativa por PCR en tiempo real (qPCR). Todo el procedimiento se realizó en un área limpia para el trabajo con ARN, empleando guantes sin polvo y reactivos y material descartable (puntas de micropipeta, microtubos, etc.) libres de nucleasas.

#### 2.1 Obtención de la muestra por la técnica del sacabocados o “punch”

Los cerebros de machos y hembras de PN7 y PN18-20 fueron extraídos e inmediatamente congelados por inmersión en isopentano mantenido a -20°C en hielo seco y luego almacenados a -80°C. De cada individuo se obtuvieron rodajas coronales de cerebro y por la técnica del sacabocados se obtuvo un “punch” individual para cada región de interés: corteza prefrontal (PFC), POA y PVN. Para la obtención de cada núcleo se realizaron cortes de 40 µm en criostato a -25°C hasta llegar a la altura correspondiente al área de interés. El

tamaño de cada punch fue de 1 mm de diámetro interno para PN7 y PN18-20, excepto para la región POA a PN7 que fue de 0,8 mm de diámetro interno. El procedimiento completo fue realizado adentro de la cámara del criostato (-25°C) para evitar la degradación del ARN. La identificación de las áreas de interés a PN7 se realizó de acuerdo con el *Atlas of the Developing Mouse Brain* (Paxinos et al., 2007): para la región PFC se realizó desde la Figura N°106 hasta la N°112, POA desde N°121 hasta la N°125 y PVN desde N°125 a N°131. Para las mismas áreas a PN18-20 se realizó de acuerdo con el atlas *The Mouse Brain in stereotaxic coordinates* (Paxinos y Franklin's, 2019): PFC desde la Figura N°6 hasta N°16, POA desde N°29 hasta N°32 y PVN desde N°33 hasta N°48. La obtención de todas las regiones se realizó bilateralmente para ambas edades.

## 2.2 Extracción y purificación de ARN

El tejido (“punch” de PFC, POA y PVN) se homogeneizó 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 temperatura ambiente, se agregó cloroformo frío a cada muestra, se agitó en vórtex y se centrifugó a 11400 rpm durante 15 min a 4°C. Posteriormente, se separó en un microtubo nuevo la fase superior transparente que contiene el ARN, se añadió isopropanol frío y se dejó precipitar el material 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. 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 para eliminar por evaporación el etanol remanente. El ARN purificado se disolvió en agua libre de nucleasas (Biodynamics, Argentina) incubando 10 min a 45 °C. Finalmente, se realizó una digestión con enzima ADNasa para eliminar posibles trazas remanentes de ADN genómico en las muestras. Para ello, a cada microtubo se agregó ADNasa I 1 U/μl (Invitrogen, Estados Unidos) y solución tampón de reacción conteniendo MgCl<sub>2</sub>, incubándose luego 15 min a 37 °C. Por último, se detuvo la reacción de digestión incubando 10 min en presencia de EDTA 3 mM a 65 °C.

## 2.3 PCR de retrotranscripción (RT-PCR)

Inmediatamente antes de realizarse la RT-PCR, se midió la concentración de ARN en las muestras por espectrofotometría a 260 nm utilizando un equipo NanoDrop 2000. A su vez,

se evaluó la pureza de éstas utilizando el índice de absorbancia 260/280, que permite conocer el grado de contaminación remanente con proteínas y/o fenoles (valores entre 1.8 y 2 indican una pureza alta para ácidos nucleicos). Conocidas las concentraciones de ARN de cada muestra, se realizaron los cálculos necesarios para retrotranscribir en todos los casos 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 5 U/µl (Promega, Estados Unidos), MgCl<sub>2</sub> 3 mM y desoxirribonucleótidos de adenina, timina, guanina y citosina 1 mM (Invitrogen, Estados Unidos). Se realizó la RT-PCR en un termociclador Eppendorf bajo las siguientes condiciones de ciclado: 60 min a 37°C, 5 min a 95°C.

#### **2.4 Determinación de la expresión génica de Tet1, Tet2, Tet3, Gadd45a, Gadd45b, TDG y OTR por PCR en tiempo real (qPCR)**

El ADN complementario (ADNc) obtenido a partir de la RT-PCR fue utilizado en la cuantificación relativa de la expresión génica por qPCR de los genes que participan en la demetilación activa del ADN (enzimas TET), proteínas involucradas en el mecanismo de reparación (Gadd45a, Gadd45b, TDG) y el receptor de oxitocina en machos y hembras a PN7 y PN18-20. Para ello, se utilizaron cebadores diseñados para la amplificación específica de cada uno de los genes de interés y se empleó 18S (codificante para el ARN ribosómico 18S) como gen endógeno (Tabla 1). La reacción se llevó a cabo utilizando FastStart Universal SYBR<sup>®</sup> Green Master (ROX) (Roche, Estados Unidos) en un volumen final de 10 µl y utilizando una concentración de oligonucleótidos de 800 nM para 18s, 500nM para Gadd45a y b, TDG y OTR y 250 nM para los genes Tet1, Tet2 y Tet3. La amplificación se realizó en el equipo Step One<sup>™</sup> Real Time PCR System (Applied Biosystems).

**Tabla 1:** Secuencias de oligonucleótidos usados en el análisis de la expresión génica mediante qPCR.

Gen	N° de acceso (GenBank, NCBI)	Secuencia sentido 5'-3'	Secuencia antisentido 5'-3'	Producto (pb)
<i>Tet1</i>	NM_001253857.2	ACCACAATAAATCAGGTTACACAC	AGGTAGATGTTTCTGCGGAGG	126
<i>Tet2</i>	NM_001040400.2	CCATCATGTTGTGGGACGGA	TCTGAGAACAGCGACGGTTG	111
<i>Tet3</i>	NM_183138.2	CTCCCTCGGCGGGGATAAT	AGCATTTATTTCCACCTCGGC	78
<i>TDG</i>	NM_011561.3	CCCCGATCCTGTGCTATTCTC	TTCTGTACAGGTTGCCATGT	146
<i>Gadd45a</i>	NM_007836.1	CTGCAGAGCAGAAGACCGAA	GGGTCTACGTTGAGCAGCTT	130
<i>Gadd45b</i>	NM_008655.1	GACATTGACATCGTCCGGGT	TTCGGTTGTGCCCAATGTCT	84
<i>OXR</i>	NM_001081147.2	CCGCACAGTGAAGATGACCT	AAGCTTCTTTGGGCGCATTG	113
<i>18 S</i>	NR_003278.3	CGCCGCTAGAGGTGAAATTCT	CATTCTTGCAAATGCTTTCG	64

## 2.5 Análisis mediante el modelo matemático de Pfaffl

Para validar el método se calculó la eficiencia (E) de amplificación de cada uno de los genes estudiados, para lo cual se realizó una curva estándar de los valores de 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 reacción de la PCR) obtenidos en función de diluciones seriadas del ADN complementario de una mezcla de muestras de los diferentes grupos experimentales, trazando así una relación lineal de cuya pendiente se obtiene el valor de E. Una vez corroboradas las eficiencias máximas (entre 90–110 %) para cada par de oligonucleótido se procedió al cálculo de expresión relativa en las muestras problema. A continuación, los cálculos de cuantificación relativa de cada gen se realizaron con el método de Pfaffl (2011), en el cual las diferencias cuantitativas en la expresión génica entre los grupos experimentales se calculan en base a la expresión de un gen endógeno calibrador y se incluyen en la fórmula las eficiencias de amplificación para cada gen. A partir de los resultados de la qPCR se obtiene, para cada muestra, un valor “Ct” (threshold cycle), el cual se define como el número de ciclo fraccionario en el cual la intensidad de fluorescencia del marcador alcanza un umbral (threshold) previamente fijado sobre el ruido de fondo, durante la fase exponencial de la reacción. Luego se calcula un índice de acuerdo a la siguiente fórmula  $Q = (E^{\text{target}})^{\Delta Ct(\text{target})} / (E^{18S})^{\Delta Ct(18S)}$ , donde E es la eficiencia de cada par de primers y  $\Delta Ct = Ct(\text{control}) - Ct(\text{experimental})$ . Para cada muestra, las cuantificaciones relativas de cada gen fueron normalizadas al promedio de Ct de los machos en cada edad postnatal.

### **3. Análisis de la expresión de oxitocina por inmunohistoquímica**

#### **3.1 Obtención de cerebros para inmunohistoquímica**

Los cerebros fueron obtenidos luego de la fijación por perfusión transcardíaca utilizando una solución lavadora conteniendo 0,14 M de cloruro de sodio, 0,02 M de sacarosa, 0,02 M de glucosa y 0,2 ml de heparina cada 100 ml de lavadora, administrada al momento, y 50 ml de una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) 4% en buffer borato pH 7.4. Previo a la perfusión, los animales se anestesiaron con hidrato de cloral 5% (0,2 ml por ratón) mediante inyección intraperitoneal. Finalizada la perfusión, se realizó una post-fijación del cerebro en PFA a 4°C por 24 h, para luego ser transferidos a una solución de sacarosa al 30% hasta el momento del corte con micrótomo.

#### **3.2 Inmunohistoquímica**

Los cortes coronales fueron obtenidos por micrótomo de congelación a 40 µm y se sometieron a inmunohistoquímica contra oxitocina. Cada cerebro fue cortado en dos series, una de las cuales se utilizó para la detección de oxitocina por inmunohistoquímica.

El primer día de la inmunohistoquímica el tejido fue lavado 3-5 veces por 5 minutos en solución tamponada con 0,2M de tris (hidroximetil) aminometano y 1,5M de cloruro de sodio (TBS 1X) pH 7,6. Una vez finalizados los lavados, se incubó con la solución de bloqueo (10% suero de caballo normal, 10% Triton X-100, 2% peróxido de hidrógeno en TBS 1X) por 30 minutos, seguido de una incubación durante la noche a 4°C en el anticuerpo primario anti-OXT (realizado en conejo, T4084-Península Labs, 1:10000). Al día siguiente, se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo realizado en burro y conjugado con biotina (1:500) (711-065-152 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc). La amplificación de la señal se realizó utilizando el complejo de avidina-biotina (1:500; Vectastain® ABC peroxidase kit, VECTOR) con una incubación de 1 hora, seguido de incubación de 2:30 minutos en diaminobencidina (DAB) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para revelar la reacción.

#### **3.3 Análisis de las imágenes**

El análisis de la expresión de OXT por inmunohistoquímica se realizó en secciones de cerebro PN18-20 de ratones macho y hembras. Lo núcleos que exhibían inmunorreactividad

a la OXT fueron identificados y delimitados según el atlas *The Mouse Brain in stereotaxic coordinates* (Paxinos y Franklin's, 2019) en tres áreas de interés: POA, PVN y SON. Las secciones se digitalizaron a través de un sistema computarizado que incluye un microscopio Zeiss equipado con una cámara digital Leica DC 200 acoplada a una cámara de contraste y se analizaron utilizando el software ImageJ PC (versión 1.53). Para cada animal, la inmunorreactividad específica para OXT se evaluó con un objetivo de 10x y en dos a tres cortes coronales conteniendo ambos hemisferios cerebrales por cada núcleo (n=3-4 animales por grupo). Para cada núcleo, se contó el número total de somas inmunorreactivos para OXT en cada corte coronal, los que fueron sumados y se expresaron como número total estimado de células OXT+ por ratón. Por otro lado, se determinó el área cubierta por fibras OXT+ utilizando el programa ImageJ. Para esto, cada imagen fue convertida a escala de grises y se aplicó el mismo umbral para todas las imágenes. Luego, empleando la misma área total para todas las imágenes (955771,5  $\mu\text{m}^2$ ), se midió el porcentaje de área cubierta por los píxeles con una intensidad de gris superior al umbral. El valor de área cubierta en cada corte coronal fue promediado con los demás cortes del mismo animal para obtener un valor promedio de área cubierta por ratón. Finalmente, con los valores promedio obtenidos de cada animal se determinó la media  $\pm$  SEM para cada grupo experimental tanto del número de células totales estimadas OXT+ como del área cubierta en cada región.

#### 4. Análisis estadístico

Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante la Prueba t de Student. 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 prueba t de Welch. Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron mediante el programa GraphPadPrism8.0.1.

## EXPERIMENTOS REALIZADOS

### 1. Expresión génica de la maquinaria de demetilación activa del ADN y el mecanismo de reparación durante el desarrollo

Con el propósito de evaluar la expresión de Gadd45a y Gadd45b, TDG, Tet1, Tet2, Tet3, antes y después de la exposición *in vivo* a las hormonas gonadales, se midió la expresión génica por qPCR en ratones wild type C57BL/6 macho y hembra a PN7 y PN18-20 en PFC, POA y PVN.

### 2. Expresión de OXT y su receptor durante el desarrollo

#### 2.1 Expresión de OXT por inmunohistoquímica después del periodo crítico.

Con el propósito de evaluar la expresión de OXT después de la exposición *in vivo* a las hormonas gonadales, se midió la expresión por inmunohistoquímica en ratones wild type C57BL/6 macho y hembra a PN18-20 en POA, PVN y SON.

#### 2.2 Expresión del receptor de OXT durante y después del periodo crítico.

Con el propósito de evaluar la expresión del receptor de OXT, antes y después de la exposición *in vivo* a las hormonas gonadales, se midió la expresión génica por qPCR en ratones wild type C57BL/6 macho y hembra a PN7 y PN18-20 en PFC, POA y PVN.

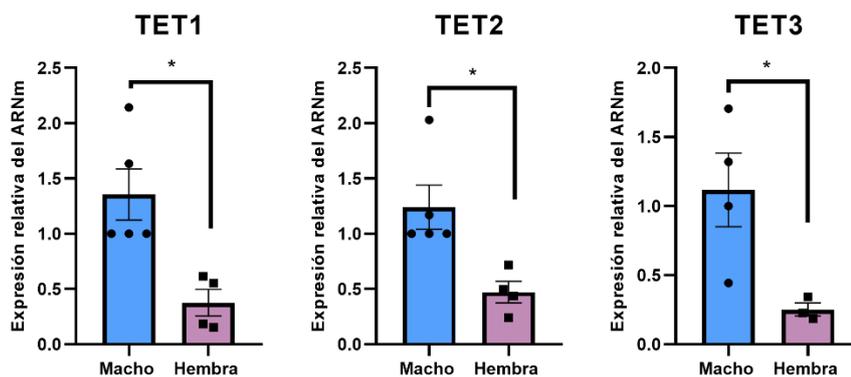
## RESULTADOS

### 1. Expresión génica de la maquinaria de demetilación activa del ADN y el mecanismo de reparación durante el desarrollo.

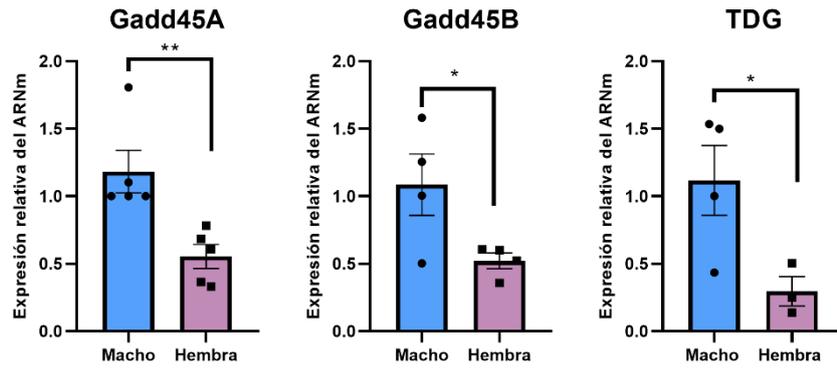
#### 1.1. Expresión de *Gadd45a* y *Gadd45b*, *Tdg*, *Tet1*, *Tet2*, *Tet3* durante del periodo crítico.

Con el objetivo de evaluar las diferencias sexuales en el mecanismo de demetilación activa basado en la reparación del ADN durante el período crítico de diferenciación sexual del cerebro, se determinaron mediante qPCR los niveles de expresión relativa de seis genes que participan en dicho mecanismo: *Gadd45a*, *Gadd45b*, *Tdg*, *Tet1*, *Tet2*, *Tet3*. El análisis se realizó en la corteza prefrontal, área preóptica y núcleo paraventricular a PN7.

Los resultados obtenidos en PFC, como se observa en las Figuras 1 y 2, mostraron una diferencia significativa en la expresión relativa de ARNm tanto de las enzimas que participan del mecanismo de demetilación activa (*Tet1*, *Tet2*, *Tet3*) como de las proteínas involucradas en la reparación del ADN (*Gadd45a*, *Gadd45b*, *Tdg*) a PN7 (Fig. 1, Test t de student:  $t_{Tet1} = 3,454$   $p = 0,0106$   $gl = 7$ ;  $t_{Tet2} = 3,161$   $p = 0,0159$   $gl = 7$ ;  $t_{Tet3} = 2,722$   $p = 0,0417$   $gl = 5$ ) (Fig. 2, Test t de Welch:  $t_{Gadd45a} = 3,474$   $p = 0,0084$   $gl = 8$ ;  $t_{Gadd45b} = 2,404$   $p = 0,0530$   $gl = 6$ ;  $t_{TDG} = 2,575$   $p = 0,0497$   $gl = 5$ ), siendo los machos en todos los casos los que presentaron mayores niveles de expresión de ARNm que las hembras.

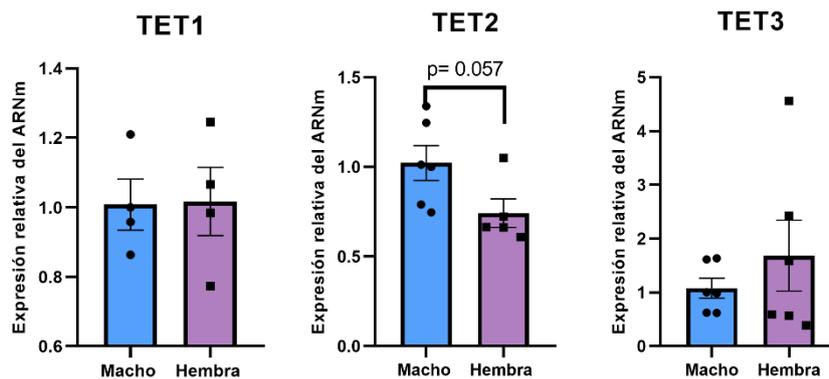


**Figura 1. Niveles relativos de ARNm de *Tet1*, *Tet2* y *Tet3* en PFC de ratones macho y hembra a PN7.** En todos los casos, los machos presentaron mayores niveles de expresión que las hembras. Los datos fueron normalizados con respecto al promedio de los machos PN7. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. Las diferencias significativas se muestran como: \* $p < 0,05$ .  $n = 4-5$  individuos para cada sexo.

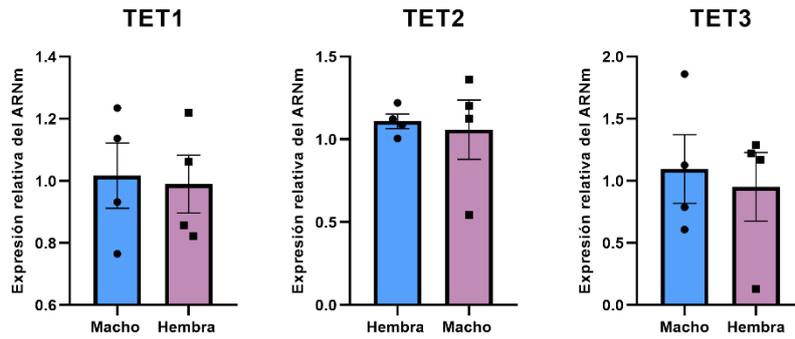


**Figura 2.** Niveles relativos de ARNm de *Gadd45A*, *Gadd45B* y *TDG* en PFC de ratones macho y hembra a PN7. En todos los casos, los machos presentaron mayores niveles de expresión que las hembras. Los datos fueron normalizados con respecto al promedio de los machos PN7. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. Las diferencias significativas se muestran como: \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ .  $n = 4-5$  individuos para cada sexo.

En cuanto a las otras dos áreas de interés, POA y PVN, los resultados obtenidos en la expresión relativa de ARNm de las enzimas involucradas en la demetilación activa no mostraron diferencias significativas a PN7. Sin embargo, se puede observar una tendencia en la expresión de *Tet2* en POA, los machos tienden a presentar una mayor expresión de ARNm respecto a las hembras, como se muestra en la Figura 3 (Fig. 3, POA, Test t de Welch:  $t_{Tet1} = 0,073$   $p = 0,9442$   $gl = 6$ ;  $t_{Tet2} = 2,182$   $p = 0,0570$   $gl = 9$ ;  $t_{Tet3} = 0,8893$   $p = 0,4093$   $gl = 10$ ) (Fig. 4, PVN, Test t de Welch:  $t_{Tet1} = 0,1974$   $p = 0,8501$   $gl = 6$ ;  $t_{Tet2} = 0,2768$   $p = 0,7912$   $gl = 6$ ;  $t_{Tet3} = 0,3664$   $p = 0,7266$   $gl = 6$ ).

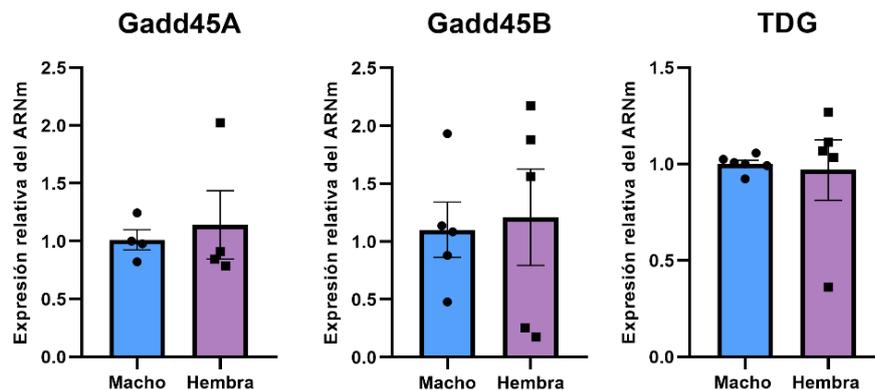


**Figura 3.** Niveles relativos de ARNm *Tet1*, *Tet2* y *Tet3* en el POA de ratones macho y hembra a PN7. Los datos fueron normalizados con respecto al promedio de los machos PN7. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p > 0,05$ ). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n = 4-6$  individuos para cada sexo.

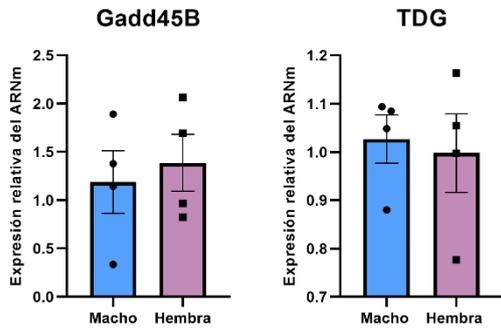


**Figura 4. Niveles relativos de ARNm de *Tet1*, *Tet2* y *Tet3* en el PVN de ratones macho y hembra a PN7.** Los datos fueron normalizados con respecto al promedio de los machos PN7. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p > 0,05$ ). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n= 4$  individuos para cada sexo.

Para las proteínas *Gadd45a*, *Gadd45b*, *Tdg* tampoco se encontraron diferencias significativas en ninguna de las dos regiones anteriormente mencionadas durante el periodo crítico (Fig.5, POA, Test t de Welch:  $t_{Gadd45A}= 0,4202$   $p= 0,6890$   $gl= 7$ ;  $t_{Gadd45B}= 0,2234$   $p= 0,8288$   $gl= 8$ ;  $t_{TDG}= 0,2007$   $p= 0,8505$   $gl= 9$ ). Con respecto a *Gadd45a*, no se detectó expresión génica a PN7 en el PVN (Fig. 6, PVN, Test t de Welch:  $t_{Gadd45B}= 0,4540$   $p= 0,6658$   $gl= 6$ ;  $t_{TDG}= 0,3017$   $p= 0,7730$   $gl= 6$ ).



**Figura 5. Niveles relativos de ARNm de *Gadd45A*, *Gadd45B* y *TDG* en el POA de ratones macho y hembras a PN7.** Los datos fueron normalizados con respecto al promedio de los machos PN7. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p > 0,05$ ). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n= 4-6$  individuos para cada sexo.

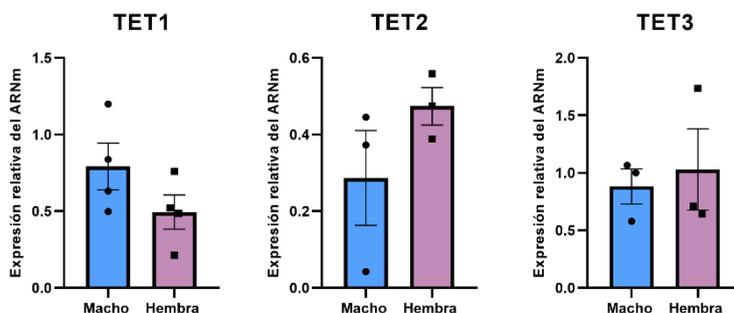


**Figura 6. Niveles relativos de ARNm de *Gadd45B* y *TDG* en el PVN de ratones macho y hembra a PN7.** Los datos fueron normalizados con respecto al promedio de los machos PN7. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p > 0,05$ ). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n=4$  individuos para cada sexo.

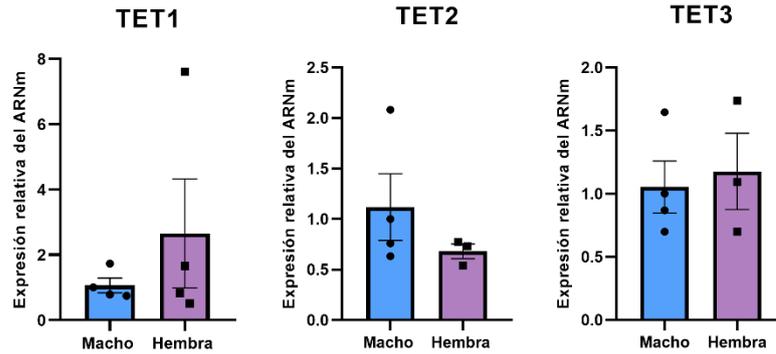
## 1.2 Expresión de *Gadd45a* y *Gadd45b*, *TDG*, *Tet1*, *Tet2*, *Tet3* después del periodo crítico.

Con el objetivo de comparar qué sucede durante y después del periodo crítico con los factores involucrados en el mecanismo de demetilación activa basado en la reparación del ADN, se realizó un análisis similar sobre la expresión relativa de ARNm de *Gadd45a*, *Gadd45b*, *Tdg*, *Tet1*, *Tet2*, *Tet3*, pero al día post natal 18-20 en PFC, POA y PVN a través de qPCR cuantitativa.

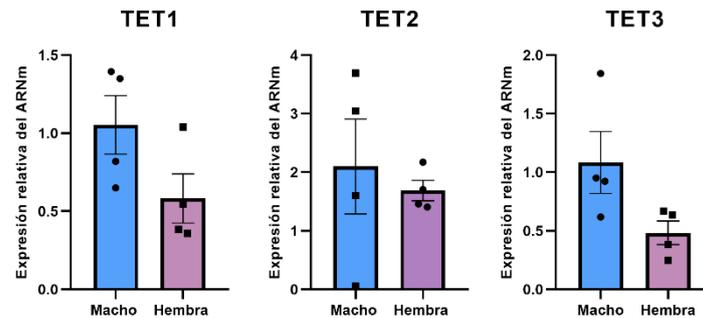
Para las enzimas que participan en la demetilación activa del ADN, *Tet1*, *Tet2*, *Tet3*, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las regiones analizadas (Fig. 7, PFC, Test t de Welch;  $t_{Tet1} = 1,566$   $p= 0,1683$   $gl= 6$ ;  $t_{Tet2} = 1,402$   $p= 0,2336$   $gl= 6$ ;  $t_{Tet3} = 0,3872$   $p= 0,7269$   $gl= 5$ ) (Fig. 8, POA, Test t de Welch:  $t_{Tet1} = 0,9431$   $p= 0,3820$   $gl= 6$ ;  $t_{Tet2} = 1,108$   $p= 0,3181$   $gl= 5$ ;  $t_{Tet3} = 0,3359$   $p= 0,7548$   $gl= 5$ ) (Fig. 9, PVN, Test t de Welch:  $t_{Tet1} = 1,921$   $p= 0,1031$   $gl= 6$ ;  $t_{Tet2} = 0,4983$   $p= 0,6360$   $gl= 6$ ;  $t_{Tet3} = 2,124$   $p= 0,1034$   $gl= 5$ ).



**Figura 7. Niveles relativos de ARNm de *Tet1*, *Tet2* y *Tet3* en la PFC al de ratones macho y hembra a PN18-20.** Los datos fueron normalizados con respecto al promedio de los machos PN18-20. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p>0,05$ ). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n=3-4$  individuos para cada sexo.

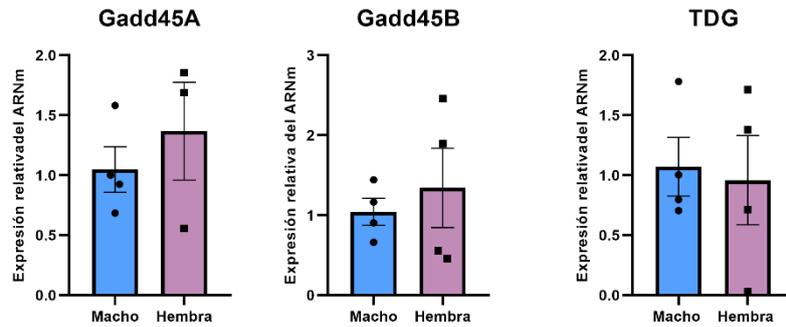


**Figura 8.** Niveles relativos de ARNm de *Tet1*, *Tet2* y *Tet3* en el POA de ratones macho y hembra a PN18-20. Los datos fueron normalizados con respecto al promedio de los machos PN18-20. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p > 0,05$ ). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n = 3-4$  individuos para cada sexo.

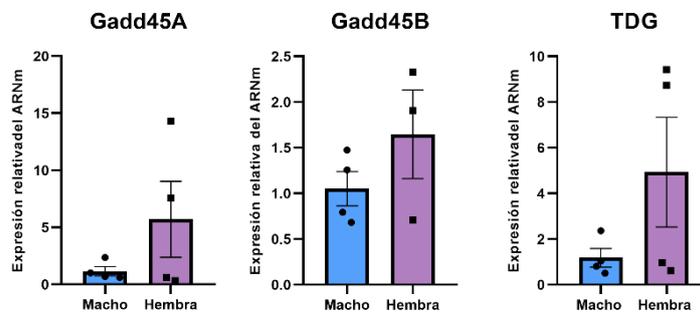


**Figura 9.** Niveles relativos de ARNm de *Tet1*, *Tet2* y *Tet3* en el PVN de ratones macho y hembra a PN18-20. Los datos fueron normalizados con respecto el promedio de los machos PN18-20. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p > 0,05$ ). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n = 3-4$  individuos para cada sexo.

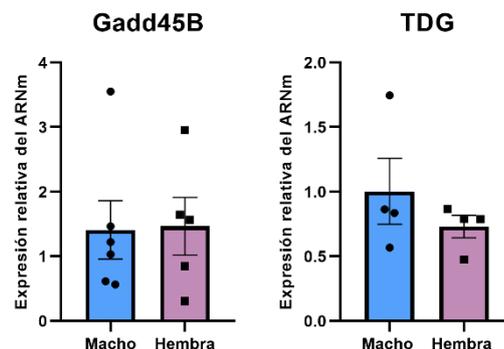
De manera similar y de acuerdo con lo antes mencionado, los resultados de la comparación en la expresión de las proteínas *Gadd45a*, *Gadd45b* y *Tdg* involucradas en el mecanismo de reparación del ADN no mostraron diferencias significativas en ninguna de las áreas de interés a esta edad postnatal (Fig. 10, PFC, Test t de Welch;  $t_{Gadd45A} = 0,1517$   $p = 0,8844$   $gl = 5$ ;  $t_{Gadd45B} = 0,5703$   $p = 0,5892$   $gl = 6$ ;  $t_{TDG} = 0,6332$   $p = 0,5500$   $gl = 6$ ) (Fig. 11, POA, Test t de Welch:  $t_{Gadd45A} = 1,356$   $p = 0,2238$   $gl = 5$ ;  $t_{Gadd45B} = 1,288$   $p = 0,2540$   $gl = 5$ ;  $t_{TDG} = 1,543$   $p = 0,2157$   $gl = 6$ ). Además, en PVN, no se encontró expresión de *Gadd45a* (Fig 12, PVN: Test t de Welch:  $t_{Gadd45B} = 0,08658$   $p = 0,9329$   $gl = 9$ ;  $t_{TDG} = 1,006$   $p = 0,3532$   $gl = 6$ ).



**Figura 10.** Niveles relativos de ARNm de *Gadd45A*, *Gadd45B* y *TDG* en la PFC de ratones macho y hembra a PN18-20. Los datos fueron normalizados con respecto al promedio de los machos PN18-20. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p > 0,05$ ). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n=4$  individuos para cada sexo.



**Figura 11.** Niveles relativos de ARNm de *Gadd45A*, *Gadd45B* y *TDG* en el POA de ratones macho y hembra a PN18-20. Los datos fueron normalizados con respecto al promedio de los machos PN18-20. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p > 0,05$ ). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n=4$  individuos para cada sexo.



**Figura 12.** Niveles relativos de ARNm de *Gadd45B* y *TDG* en el PVN de ratones macho y hembra a PN18-20. Los datos fueron normalizados con respecto al promedio de los machos PN18-20. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p > 0,05$ ). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar.  $n=4-6$  individuos para cada sexo.

## 2. Evaluación de las diferencias sexuales en la expresión de OXT y su receptor durante el desarrollo.

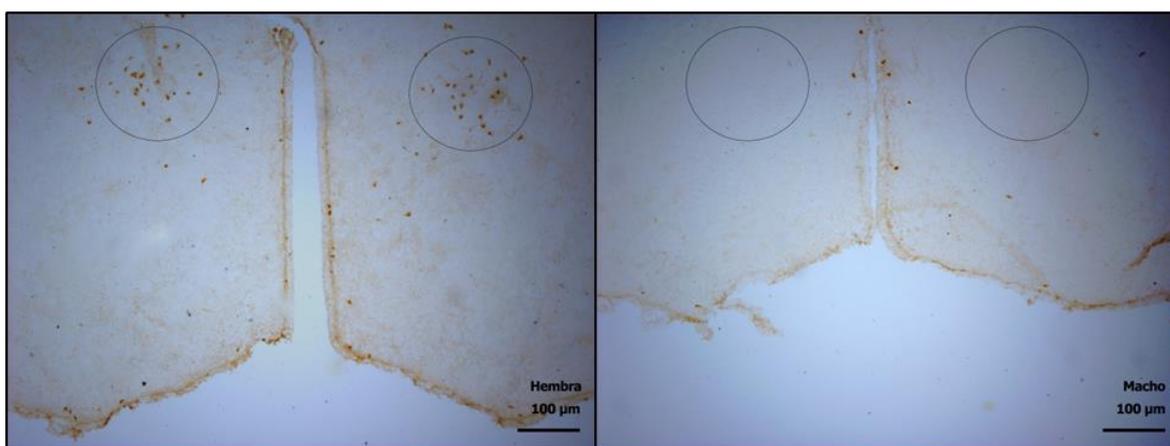
### 2.1 Análisis de la expresión de OXT por inmunohistoquímica.

Con el objetivo de explorar si existían diferencias sexuales en la expresión de OXT en machos y hembras al día postnatal 18-19 debido a la exposición transitoria a hormonas gonadales durante el desarrollo temprano, nos propusimos medir la expresión de dicho neuropéptido por inmunomarcación.

Como primer paso, se realizó un escaneo (valoración) general de todo el cerebro en búsqueda de expresión de OXT. Se observó inmunomarcación en somas y fibras ubicados en el núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo anteroventricular periventricular (AVPV), el área preóptica, el núcleo paraventricular y el núcleo supraóptico. En ausencia del anticuerpo primario no se detectó inmunomarcación.

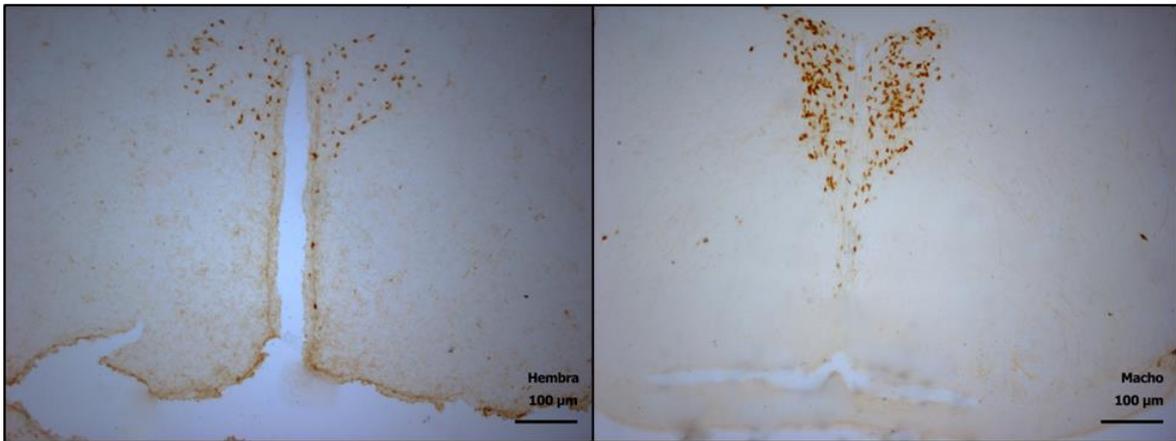
Con el fin de correlacionar la expresión de oxitocina con los resultados obtenidos en el objetivo específico N°1, se seleccionaron las siguientes regiones: POA, PVN y SON.

Respecto a POA, sorprendentemente no se observó ninguna neurona OXT+ en machos, mientras que en hembras se encontró un promedio de 18,25 neuronas OXT+ (Figura 13). De manera similar, cuando se evaluó el área cubierta, en machos no se observó marca alguna, mientras que en las hembras el área cubierta representa un promedio de 821,72  $\mu\text{m}^2$

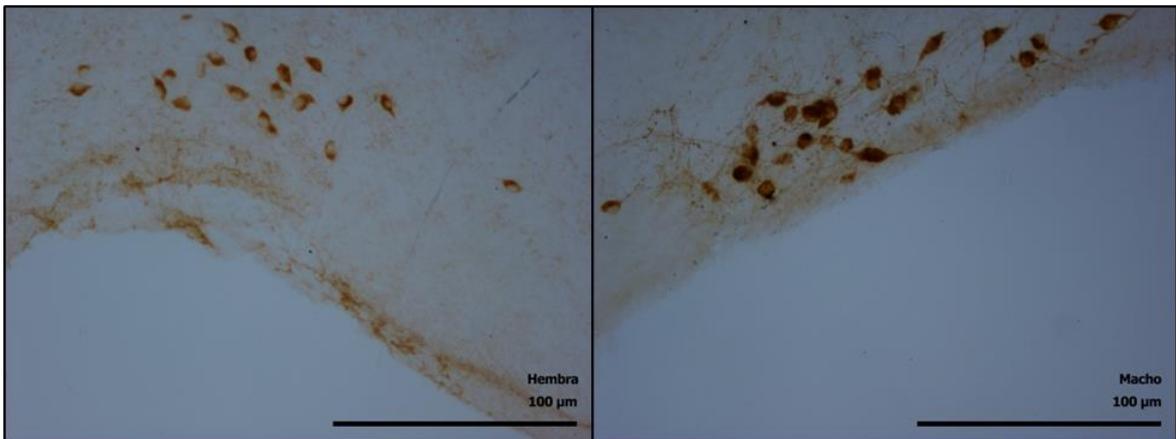


**Figura 13. Microfotografías representativas de la expresión de Oxitocina en POA en machos y hembras a PN18-19.** Imágenes tomadas a partir de un microscopio Zeiss equipado con una cámara digital Leica DC 200 acoplada a una cámara de contraste, con un objetivo 10x. La imagen de la izquierda corresponde a una hembra representativa y a la derecha, un macho. No se observaron células OXT ni proyecciones positivas en los machos en comparación con las hembras.

Por otro lado, en áreas como PVN y SON los resultados obtenidos no mostraron una diferencia significativa, pero se puede mencionar una tendencia a un menor número de neuronas OXT+ en hembras en comparación a los machos en dichas áreas (Figura 14 y 15).



**Figura 14. Microfotografías representativas de la expresión de Oxitocina en PVN en machos y hembras a PN18-19.** Imagen tomada a partir de un microscopio Zeiss equipado con una cámara digital Leica DC 200 acoplada a una cámara de contraste, con un objetivo 10x. La imagen de la izquierda corresponde a hembras y a la derecha, machos. Se observó inmunoreactividad específica para oxitocina en somas y proyecciones celulares en ambos sexos.



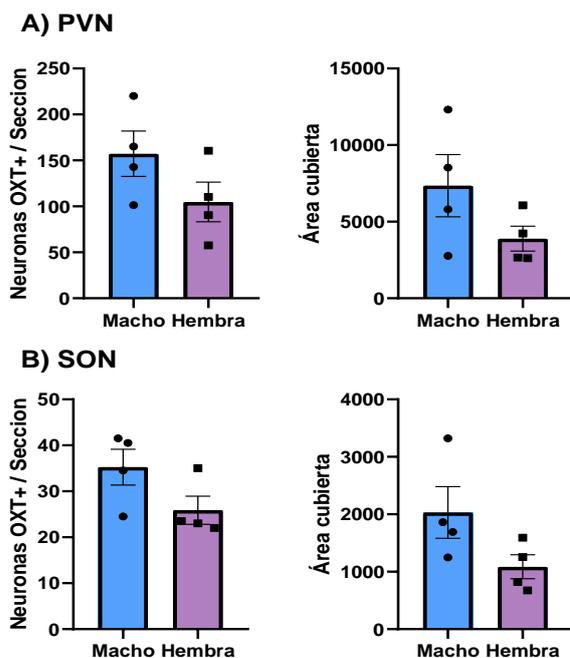
**Figura 15. Microfotografías representativas de la expresión de Oxitocina en SON en machos y hembras a PN18-19.** Imagen tomada a partir de un microscopio Zeiss equipado con una cámara digital Leica DC 200 acoplada a una cámara de contraste, con un objetivo 40x. La imagen de la izquierda corresponde a una hembra y a la derecha, un macho. Se observó inmunoreactividad específica para oxitocina en somas y proyecciones celulares en ambos sexos.

El análisis estadístico de la expresión de OXT en el PVN mostró que no hay diferencias significativas tanto en el número de células totales estimadas por región (Fig. 16 A, Test t de student:  $t = 1,602$   $p = 0,1612$   $gl = 6$ ), como en el área cubierta en dicha región (Fig. 16 A, Área cubierta, Test t de student:  $t = 1,583$   $p = 0,1896$   $gl = 4$ ). En forma similar, el análisis

estadístico en el SON, indicó que no hay diferencias significativas entre los sexos en ninguno de los parámetros analizados (Fig. 16 B, Neuronas OXT+ por región, Test t de student:  $t=1,891$   $p=0,1103$   $gl=6$ ) (Fig. 16 B, Área cubierta, Test t de student:  $t=1,907$   $p=0,1252$   $gl=4$ ).

## 2.2 Análisis de los niveles de expresión del receptor de OXT por qPCR durante el desarrollo.

En un segundo punto dentro de este objetivo se planteó analizar los niveles de expresión relativa del receptor de oxitocina por qPCR en machos y hembras al día post natal 7 y 18-20 para evaluar la existencia de diferencias sexuales en la expresión de dicho gen, en las mismas regiones planteadas en el objetivo específico 1: PFC, POA y PVN.

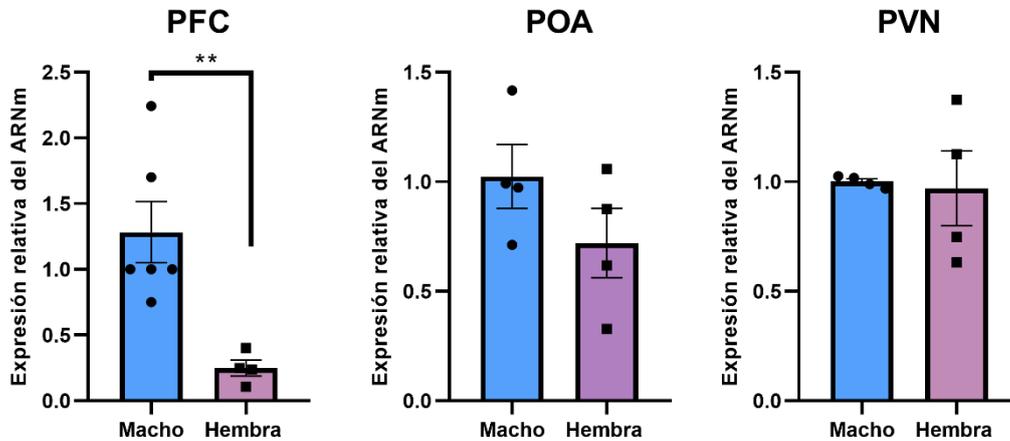


**Figura 16. Número de neuronas OXT positivas por sección y porcentaje de área cubierta en PVN (A) y SON (B) a PN18-19.** El número de células inmunorreactivas para OXT ubicadas dentro de cada área de interés se representa como número total estimado de células OXT+ por ratón. Por otro lado, la cantidad de inmunorreactividad de OXT se determinó midiendo el porcentaje de área cubierta por los píxeles con una intensidad de marca superior al umbral (aquellos píxeles con un nivel de gris superior a un umbral definido) utilizando ImageJ y los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM para cada grupo experimental en ambos casos. No se encontraron diferencias significativas entre los sexos ( $p>0,05$ ).  $n=3-4$  individuos para cada sexo y de tres a cuatro secciones por ratón.

### Análisis durante el periodo crítico

El análisis estadístico de la expresión génica a PN7, reveló diferencias sexuales significativas en OTR en PFC (Fig. 17, Test t de student:  $t_{OTR}=4,302$   $p=0,0058$   $gl=6$ ), las hembras tienen un menor nivel de expresión relativa de ARNm en comparación a los machos. Por lo que respecta a POA (Fig. 17, Test t de student:  $t_{OTR}=1,409$   $p=0,2088$   $gl=$

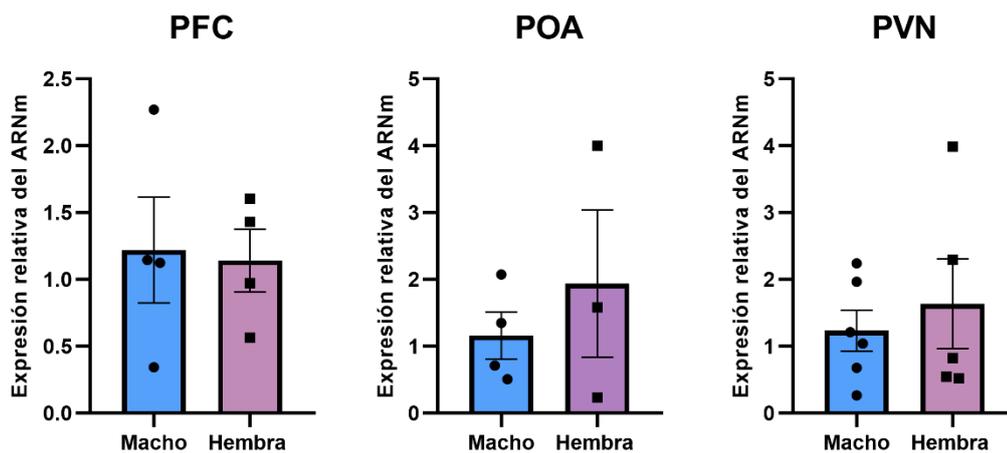
6;) y a PVN (Fig. 17, Test t de student:  $t_{OTR} = 0,1770$   $p = 0,8707$   $gl = 3$ ); no se encontraron diferencias significativas entre los sexos.



**Figura 17. Niveles relativos de ARNm de *ORT* en PFC, POA y PVN de ratones macho y hembra a PN7.** Los datos fueron normalizados con respecto el promedio de los machos PN7. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. Las diferencias significativas se muestran como: \*\* $p < 0,01$ . En PFC, los machos presentaron mayores niveles de expresión que las hembras. En POA y PVN, no se encontraron diferencias entre sexos.  $n = 4-6$  individuos para cada sexo.

#### Análisis después el periodo crítico

Con el objeto de comparar lo que sucede con los niveles de expresión relativa de ARNm de OTR durante el periodo crítico y después del mismo, se trabajó con ratones macho y hembras a PN18-20 sobre las áreas ya mencionadas. En esta última edad, no se encontraron diferencias significativas en PFC (Fig. 18, Test t de student:  $t_{OTR} = 0,1696$   $p = 0,8722$   $gl = 5$ ;) así como tampoco en POA (Fig. 18, Test t de student:  $t_{OTR} = 0,6722$   $p = 0,5600$   $gl = 3$ ;) y PVN (Fig. 18, Test t de student:  $t_{OTR} = 0,5386$   $p = 0,6107$   $gl = 5$ ;).



**Figura 18. Niveles relativos de ARNm de *ORT* en PFC, POA y PVN de ratones macho y hembra a PN18-20.** Los datos fueron normalizados con respecto el promedio de los machos PN18-20. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las regiones analizadas. n= 4-6 individuos para cada sexo.

## DISCUSIÓN

Una gran mayoría de las diferencias sexuales descritas en el cerebro de mamíferos dependen de la exposición transitoria a la testosterona gonadal o al E2 durante el periodo crítico de la diferenciación sexual del cerebro, que en roedores se extiende desde el día E17 hasta el día PN10 aproximadamente. Algunos de estos dimorfismos sexuales se evidencian después del periodo crítico, y persisten aún en ausencia de la señal que le dio origen. Las evidencias de los últimos años apuntan a ciertos mecanismos epigenéticos en la regulación de estos efectos.

En el presente trabajo de tesina de grado hemos evaluado los cambios durante el desarrollo temprano en los niveles de expresión de enzimas y proteínas que participan en mecanismos epigenéticos con potencialidad para regular la expresión de oxitocina y del receptor de oxitocina, en búsqueda de diferencias sexuales en sus perfiles de expresión durante el desarrollo. Para esto, comenzamos estudiando la expresión del ARN mensajero de las enzimas involucradas en el mecanismo de demetilación activa del ADN (Tet1, Tet2, Tet3) en conjunto con algunas proteínas que participan en el mecanismo de reparación del ADN (BER) (Gadd45a, Gadd45b y Tdg) en tres regiones sexualmente dimórficas como lo son la corteza prefrontal, el área preóptica y el núcleo paraventricular del hipotálamo, durante el periodo crítico perinatal (PN7), para luego correlacionar estos valores con la expresión de estos reguladores epigenéticos después de dicho periodo (PN18-20). Nuestros resultados indicaron que solo en la corteza prefrontal existen diferencias sexuales en la expresión de las enzimas Tet1, Tet2, Tet3 y en las proteínas implicadas en el mecanismo de reparación del ADN Gadd45a, Gadd45b y Tdg, siendo los machos en todos los casos los que presentaron mayores niveles de expresión de ARNm que las hembras a PN7. En cuanto al área preóptica los resultados no fueron significativos durante el periodo crítico, a excepción de la enzima Tet2 que mostró una tendencia similar a lo ocurrido en PFC, hacia una mayor expresión del ARNm de *Tet2* en los machos. Estos resultados van en concordancia con los obtenidos anteriormente por Cisternas y colaboradores (2020b), en donde se evaluaron los niveles de expresión de Tet1-3 y la actividad enzimática TET total en área preóptica, hipotálamo e hipocampo a PN1, PN7 y PN25. En dicho trabajo encontraron diferencias sexuales en la expresión de Tet2 y Tet3 únicamente durante el período crítico de diferenciación sexual (PN1 y PN7), siendo los niveles significativamente más altos en machos que en hembras en POA y en hipotálamo ventromedial (Cisternas et

al., 2020a). Por el contrario, en hipocampo los niveles de expresión de Tet1-3 así como la actividad enzimática total son mayores en ratones hembra a PN1 (Cisternas et al., 2020a), lo que sugiere una regulación específica de región durante el periodo crítico de diferenciación sexual del cerebro.

En el núcleo paraventricular, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para las enzimas implicadas en la demetilación activa ADN y tampoco en las proteínas que participan en el mecanismo de reparación del ADN a PN7. Además, cabe mencionar que la expresión génica de *Gadd45a*, no se detectó en esta área. En cuanto a los resultados después del periodo crítico (PN18-20), no se encontró diferencias en cuanto al sexo en ninguna de las enzimas TET ni las proteínas del mecanismo BER para las tres áreas de estudio.

Estos resultados representan un aporte importante al estudio de la regulación epigenética y la diferenciación sexual del cerebro. Si bien existen evidencias de la metilación del ADN como uno de los principales mecanismos que interviene en la regulación a largo plazo de la expresión génica para el establecimiento de diferencias sexuales durante el desarrollo (Schwarz et al., 2010; Ghahramani et al., 2014; Nugent et al., 2015; Mosley et al., 2017; Cisternas et al., 2020b), poco se sabe de la implicancia de la demetilación activa y del mecanismo de reparación del ADN en los efectos organizadores de los esteroides gonadales. Se han reportado diferencias sexuales en el patrón de metilación global en el estriado de roedores neonatales y adultos (Ghahramani et al., 2014; Nugent et al., 2015), área preóptica, (Cisternas et al., 2020a; Nugent et al., 2015) e hipotálamo ventromediano de ratón (Cisternas et al., 2020a). Además, la inhibición neonatal en la metilación del ADN tiene efectos a largo plazo anulando diferencias sexuales en el patrón de espinas dendríticas en el POA del hipotálamo (Nugent et al., 2015), en el número de neuronas que expresan calbindina en el núcleo sexualmente dimórfico del hipotálamo y que expresan ER $\alpha$  en VMH de ratón (Cisternas et al., 2020a). Con respecto al rol de la demetilación activa del ADN en la diferenciación sexual del cerebro, los resultados de Cisternas y colaboradores (2020a) demuestran diferencias sexuales en la expresión de enzimas TET durante el desarrollo sugiriendo que sus componentes están regulados sexualmente. Otro ejemplo involucra a *Gadd45b*, el cual presenta diferencias sexuales en amígdala de rata durante el desarrollo posnatal (Kigar et al., 2015). Es así que los resultados de esta tesis aportan nuevas evidencias, revelando que existe un dimorfismo sexual tanto en la expresión de las enzimas

TET como en el mecanismo BER en PFC y a su vez los resultados de expresión génica en POA van en concordancia con resultados previos (Cisternas et al., 2020a).

Los mecanismos epigenéticos están involucrados en la diferenciación del fenotipo celular durante el desarrollo y probablemente expliquen la memoria celular a los efectos organizadores de las hormonas sexuales durante el período crítico (Ariff et al., 2011; Cortes and Forger, 2023). Dado que algunas diferencias sexuales (como por ejemplo la diferenciación del fenotipo neuroquímico) son programadas durante el período crítico por acción de la testosterona o el E2, pero quedan latentes y se evidencian en el fenotipo mucho más adelante durante la vida posnatal o en la vida adulta, en el objetivo específico N°2 se evaluó la hipótesis de que las diferencias sexuales en la maquinaria de demetilación del ADN podrían actuar como un factor específico del sexo en la diferenciación de fenotipos neuroquímicos durante el período crítico neonatal.

El neuropéptido oxitocina es regulado por las hormonas gonadales (testosterona/estradiol) (de Vries and Miller, 1998; Rood et al., 2013), está implicado en la regulación de conductas sociales complejas y presenta diferencias sexuales en determinadas regiones del cerebro (Donaldson and Young, 2008; Johnson and Young, 2017). En general, OXT es producido en regiones discretas del hipotálamo como el núcleo supraóptico (SON) y el paraventricular (PVN), pero también estudios recientes mostraron que se pueden encontrar neuronas OXT en áreas no hipotalámicas como la amígdala medial (MeA) y, en particular, en el núcleo del lecho de la estría terminalis (BNST) (Madrigal and Jurado, 2021; Soumier et al., 2022). Por esta razón, en la presente tesina se realizó un escaneo completo del cerebro para corroborar el patrón de expresión de oxitocina descrito por la bibliografía. Se decidió evaluar diferencias sexuales en POA, PVN y SON para correlacionar la expresión de OXT con los resultados obtenidos en el objetivo específico 1. En POA, llamativamente, no se observaron neuronas ni fibras OXT positivas en machos en comparación con lo observado en las hembras. Si bien los resultados reportados en la bibliografía indican expresión de OXT en esta región, los autores no reportaron el sexo de los animales evaluados en el estudio (Madrigal and Jurado, 2021; Soumier et al., 2022). En PVN y SON, si bien los resultados obtenidos mostraron una tendencia a un mayor número de somas y área cubierta por OXT en machos, el análisis estadístico no reportó diferencias estadísticamente significativas. Trabajos previos similares al desarrollado en esta tesina sugieren que existen diferencias sexuales en septum lateral, el núcleo del lecho de la estría terminal e hipotálamo lateral en ratones, siendo las hembras las que exhiben un mayor

número de fibras inmunorreactivas a OXT que los machos (Qiao et al., 2014). En otras regiones del cerebro, como el núcleo central de la amígdala, no se observaron diferencias entre hembras y machos (Uhl-Bronner et al., 2005), debido quizá a que esta área es responsable de conductas que no presentan dimorfismo sexual tales como detectar el peligro y generar las reacciones adecuadas para la autoprotección. En conjunto, las diferencias sexuales podrían ser dependiente del área de estudio. De esta manera, los resultados obtenidos en esta tesina aportan evidencias muy importantes ya que, si bien la expresión de oxitocina ha sido extensamente evaluada por su implicancia durante el desarrollo y estar implicada en algunos desordenes neuropsiquiátricos, no es mucho lo que se conoce sobre su dimorfismo sexual.

OXT actúa como un neuromodulador y una hormona, siendo sus efectos mediados por su receptor (OTR) en diversas regiones del cerebro. De esta forma el circuito oxitocinérgico regula conductas sociales complejas, como la agresión, conductas de apego, memoria social y cuidado materno. Es por lo que, además de analizar la expresión de OXT, nos propusimos evaluar que sucedía con su receptor por medio de qPCR. Se trabajó sobre tres áreas específicas, PFC, POA y PVN durante y después del periodo crítico de diferenciación sexual (PN7 y PN18-20), en ratones macho y hembra. Encontramos que existen diferencias sexuales únicamente durante el período crítico en PFC, donde los machos presentaron mayores niveles de expresión que las hembras, mientras que en POA y PVN, no presentaron un dimorfismo sexual significativo. A PN18-20, no se observaron diferencias significativas para ninguna de las áreas analizadas.

En resumen, las diferencias sexuales en patrones estables de expresión génica, que determinan diferencias en el fenotipo neuroquímico pueden ser el tipo más común de diferencia sexual en el sistema nervioso, sin embargo, se sabe relativamente poco sobre los mecanismos moleculares subyacentes. Nuestros hallazgos indicaron que hay diferencias sexuales en los reguladores epigenéticos que participan en la remoción de marcas de metilación del ADN. A su vez, estas regiones del cerebro de machos presentan un desbalance hacia mayores niveles de demetilación del ADN durante el periodo crítico, resultados que coinciden a su vez con trabajos previos (Cisternas et al., 2020a). En cuanto al segundo objetivo, el OTR presentó dimorfismo sexual en PFC a día PN7 (machos > hembras) que sugiere que podría estar mediado por mayor demetilación del ADN en machos a PN7. A futuro sería interesante evaluar si las diferencias de sexo en la maquinaria de demetilación activa del ADN son dependientes de testosterona/estradiol y si la expresión de

OXT y OTR esta mediada por dicho mecanismo epigenético. Sería interesante entonces: 1) Evaluar el rol de testosterona/E2 en la masculinización de la maquinaria de demetilación durante el neurodesarrollo mediante inyecciones subcutáneas de E2 a PNO; 2) Inhibir las enzimas TETs y evaluar los efectos sobre los niveles globales de metilación e hidroximetilación durante el desarrollo; 3) Evaluar el efecto de dicha inhibición sobre la expresión de oxitocina (OXT) y del receptor de oxitocina; 4) Inhibir la vía de BER para evaluar su efecto sobre la expresión de OXT y su receptor.

Por otro lado, más allá de las diferencias sexuales encontradas, la variación de la expresión del mecanismo de demetilación activa indica que el epigenoma del cerebro es altamente dinámico durante el período crítico. Esto puede ser la base de la plasticidad del desarrollo y, al mismo tiempo, de su propia vulnerabilidad a la disrupción. Además, las diferencias de sexo en los procesos epigenéticos pueden contribuir de manera específica a trastornos neurológicos del desarrollo o del adulto. Algunos ejemplos son el desorden del espectro autista, el trastorno con déficit de atención por hiperactividad, el desorden de oposición desafiante, que son más comunes en varones (Rucklidge, 2010; Trepata and Ezpeleta, 2011; Werling and Geschwind, 2013; Mottron et al., 2015), o la esquizofrenia, cuyo diagnóstico es mayor en varones antes de la adolescencia con relación al diagnóstico en mujeres (Ochoa et al., 2012).

Por lo tanto, los resultados de esta tesina aportan información novedosa y contribuyen al conocimiento de los mecanismos epigenéticos que podrían participar en la regulación de la expresión de genes específicos como la OXT y el OTR. Es probable que el escenario tenga aún más matices e involucre factores no examinados durante este trabajo por lo que es necesario realizar estudios más detallados para identificar a través de qué mecanismos o procesos las hormonas gonadales establecen patrones de expresión génica sexualmente dimórficos y esclarecer el rol de la demetilación activa del ADN y el mecanismo de reparación del ADN por escisión sobre la regulación de OXT y su receptor.

## BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Andari, E., Richard, N., Leboyer, M., and Sirigu, A. (2016). Adaptive coding of the value of social cues with oxytocin, an fMRI study in autism spectrum disorder. *Cortex J Devoted Study Nerv Syst Behav.* 76, 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2015.12.010>.
- Ariff M.I., Mitra A., Basu A. (2011). Epigenetic regulation of self-renewal and fate determination in neural stem cells. *J Neurosci Res* 90(3):529-39. doi: 10.1002/jnr.22804.
- Auger AP, Auger CJ (2011) Epigenetic turn ons and turn offs: chromatin reorganization and brain differentiation. *Endocrinology* 152:349–353.
- 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. *Curr Top Dev Biol* 134, 289-315. doi: 10.1016/bs.ctdb.2019.01.003.
- Arnold, A.P., Burgoyne, P.S. (2004). Are XX and XY brain cells intrinsically different? *Trends Endocrinol Metab* 15(1), 6-11. doi: 10.1016/j.tem.2003.11.001.
- Arnold, A.P., Chen, X., Link, J.C., Itoh, Y., Reue, K. (2013). Cell-autonomous sex determination outside of the gonad. *Dev Dyn* 242(4), 371-379. doi: 10.1002/dvdy.23936.
- Arnold, A.P., Gorski, R.A. (1984). Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 7, 413-442. doi: 10.1146/annurev.ne.07.030184.002213.
- Arnold, A.P., Reue, K., Eghbali, M., Vilain, E., Chen, X., Ghahramani, N., et al. (2016). The importance of having two X chromosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371(1688), 20150113. doi: 10.1098/rstb.2015.0113.
- 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.

- Barreto G, Schäfer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, Döderlein G, Maltry N, Wu W, Lyko F, Niehrs C (2007). Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445:671–675.
- 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.
- Cabrera Zapata LE, Bollo M, Cambiasso MJ. (2019). Estradiol-Mediated Axogenesis of Hypothalamic Neurons Requires ERK1/2 and Ryanodine Receptors-Dependent Intracellular Ca<sup>2+</sup> Rise in Male Rats. *Front Cell Neurosci.* 13:122.
- Cabrera Zapata LE, Cisternas CD, Sosa C, Garcia-Segura LM, Arevalo MA, Cambiasso MJ. (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 sexdependent manner. *Frontiers in cell and developmental biology* 10.
- Cambiasso, M.J., Colombo, J.A., Carrer, H.F. (2000). Differential effect of oestradiol and astroglia-conditioned media on the growth of hypothalamic neurons from male and female rat brains. *Eur J Neurosci* 12(7), 2291-2298. doi: 10.1046/j.14609568.2000.00120.x.
- Caeiro, X.E., Mir, F.R., Vivas, L.M., Carrer, H.F., Cambiasso, M.J. (2011). Sex chromosome complement contributes to sex differences in bradycardic baroreflex response. *Hypertension* 58(3), 505-511. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175661.
- Carter CS (2007). Sex differences in oxytocin and vasopressin: implications for autism spectrum disorders? *Behav Brain Res* 176:170–186.
- Chen, X., Watkins, R., Delot, E., Reliene, R., Schiestl, R.H., Burgoyne, P.S., et al. (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. doi: 10.1002/dneu.20581.
- 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.
- Chung, W.C., Swaab, D.F., De Vries, G.J. (2000). Apoptosis during sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat brain. *J Neurobiol* 43(3), 234-243.

- Cisternas CD, Cortes LR, Bruggeman EC, Yao B, Forger NG (2020a). Developmental changes and sex differences in DNA methylation and demethylation in hypothalamic regions of the mouse brain. *Epigenetics* 15(1-2):72–84.
- Cisternas CD, Cortes LR, Golyner I, Castillo-Ruiz A, Forger NG (2020b). Neonatal inhibition of DNA methylation disrupts testosterone-dependent masculinization of neurochemical phenotype. *Endocrinol.* 161.
- Cisternas, C.D., Tome, K., Caeiro, X.E., Dadam, F.M., Garcia-Segura, L.M., Cambiasso, M.J. (2015). Sex chromosome complement determines sex differences in aromatase expression and regulation in the stria terminalis and anterior amygdala of the developing mouse brain. *Mol Cell Endocrinol* 414, 99-110. doi: 10.1016/j.mce.2015.07.027.
- Cortes, L.R., Cisternas, C.D., Cabahug, I.N.K.V., Mason, D., Ramlall, E.K., Castillo- Ruiz, A., Forger, N.G., (2022). DNA methylation and demethylation underlie the sex difference in estrogen receptor alpha in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 112, 636–648. <https://doi.org/10.1159/000519671>.
- Cortes, L.R., Forger, N.G., (2023). DNA methylation and demethylation shape sexual differentiation of neurochemical phenotype, *Hormones and Behavior* 151, 105349, ISSN 0018-506X, <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2023.105349>.
- Dadam, F.M., Caeiro, X.E., Cisternas, C.D., Macchione, A.F., Cambiasso, M.J., Vivas, L. (2014). Effect of sex chromosome complement on sodium appetite and Fosimmunoreactivity induced by sodium depletion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 306(3), R175-184. doi: 10.1152/ajpregu.00447.2013.
- Donaldson, Z. R, Young, L.J. (2008). Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* 322, 900-904. doi: 10.1126/science.1158668
- De Vries, G.J., Rissman, E.F., Simerly, R.B., Yang, L.Y., Scordalakes, E.M., Auger, C.J., et al. (2002). A model system for study of sex chromosome effects on sexually dimorphic neural and behavioral traits. *J Neurosci* 22(20), 9005-9014. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-20-09005.2002.
- de Vries GJ, Miller MA (1998). Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain. *Prog Brain Res* 119:3–20.

- Forger, N.G. (2006). Cell death and sexual differentiation of the nervous system. *Neuroscience* 138(3), 929-938. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.07.006.
- Forger NG (2017) Past, present and future of epigenetics in brain sexual differentiation. *J Neuroendocrinol.* 30: e12492.
- Gavin DP, Chase KA, Sharma RP (2013). Active DNA demethylation in post-mitotic neurons: a reason for optimism. *Neuropharmacology* 75:233–245.9
- Ghahramani NM, Ngun TC, Chen P-Y, Tian Y, Krishnan S, Muir S, Rubbi L, Arnold AP, de Vries GJ, Forger NG, Pellegrini M, Vilain E (2014) The effects of perinatal testosterone exposure on the DNA methylome of the mouse brain are late-emerging. *Biol Sex Differences* 5:8.
- Gorosito, S. V., Lorenzo, a. G., Cambiasso, M.J., (2008). Estrogen receptor alpha is expressed on the cell-surface of embryonic hypothalamic neurons. *Neuroscience* 154, 1173-1177. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.05.001
- Gregory SG, Connelly JJ, Towers AJ, Johnson J, Biscocho D, Markunas CA, Lintas C, Abramson RK, Wright HH, Ellis P, Langford CF, Worley G, DeLong GR, Murphy SK, Cuccaro ML, Persico A, Pericak-Vance MA (2009). Genomic and epigenetic evidence for oxytocin receptor deficiency in autism. *BMC Med* 7:62.
- Grinevich, V., and Neumann, I.D., (2021). Brain oxytocin: how puzzle stones from animal studies translate into psychiatry. *Mol Psychiatry* 26, 265-279.
- Han, T.M., De Vries, G.J. (1999). Neurogenesis of galanin cells in the bed nucleus of the stria terminalis and centromedial amygdala in rats: a model for sexual differentiation of neuronal phenotype. *J Neurobiol* 38(4), 491-498.
- Hata K, Okano M, Lei H, Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129:1983–1993.
- Hsieh, J., Gage, F.H., (2004). Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr. Opin. Genet Dev.* 14, 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.07.006>.
- Iqbal, M.A., Arinjay, M., Anirban, B., (2012). Epigenetic regulation of self-renewal and fate determination in neural stem cells. *J Neurosci. Res.* 90, 529–539. <https://doi.org/10.1002/jnr.22804>.

- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333:1300–1303.
- Johnson, Z.V., and Young, L.J. (2017). Oxytocin and vasopressin neural networks: implication for social behavioral diversity and translational neuroscience. *Neurosci Biobehav. Rev.* 76, 87-98. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.034>.
- Kigar SL, Chang L, Auger AP (2015). Gadd45b is an epigenetic regulator of juvenile social behavior and alters local pro-inflammatory cytokine production in the rodent amygdala. *Brain Behav Immun* 46:60–69.
- Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31:89–97.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R., (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351, 117121. doi:10.1038/351117a0
- Lephart, E.D. (1996). A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Brain Res Rev* 22(1), 1-26. doi: 10.1016/0165-0173(96)00002-1.
- Li Z, Gu T-P, Weber AR, Shen J-Z, Li B-Z, Xie Z-G, Yin R, Guo F, Liu X, Tang F, Wang H, Schär P, Xu G-L (2015). Gadd45a promotes DNA demethylation through TDG. *Nucleic Acids Res* 43:3986–3997.
- Lister R et al. (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* (80- ) 341:1237905.
- Madrigal, M.P., Jurado, S. (2021). Specification of oxytocinergic and vasopressinergic circuits in the developing mouse brain. *Commun Biol.* 4:586.
- Matsuda, K.I., Mori, H., Nugent, B.M., Pfaff, D.W., McCarthy, M.M., Kawata, M., (2011). Histone deacetylation during brain development is essential for permanent masculinization of sexual behavior. *Endocrinology* 152, 2760-2767. doi:10.1210/en.2011-0193
- Makela, J.A., Koskenniemi, J.J., Virtanen, H.E., Toppari, J. (2019). Testis development. *Endocr Rev* 40(4), 857-905. doi: 10.1210/er.2018-00140.

- McCarthy, M.M. (2008). Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev* 88(1), 91-124. doi: 10.1152/physrev.00010.2007.
- McCarthy, M.M., Arnold, A.P. (2011). Reframing sexual differentiation of the brain. *Nat Neurosci* 14(6), 677-683. doi: 10.1038/nn.2834.
- Mellén M, Ayata P, Dewell S, Kriaucionis S, Heintz N (2012). MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* 151:1417–1430.
- Mellén M, Ayata P, Heintz N (2017). 5-hydroxymethylcytosine accumulation in postmitotic neurons results in functional demethylation of expressed genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E7812– E7821.
- Miller M, Bales KL, Taylor SL, Yoon J, Hostetler CM, Carter CS, Solomon M (2013). Oxytocin and Vasopressin in Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorders: Sex Differences and Associations With Symptoms. *Autism Res* 6:91–102.
- Mosley M, Weathington J, Cortes LR, Bruggeman E, Castillo-Ruiz A, Xue B, Forger NG (2017) Neonatal inhibition of DNA methylation alters cell phenotype in sexually dimorphic regions of the mouse brain. *Endocrinology* 158:1838–1848.
- Mottron, L., Duret, P., Mueller, S., Moore, R.D., Forgeot d’Arc, B., Jacquemont, S., Xiong, L. (2015). Sex differences in brain plasticity: a new hypothesis for sex ratio bias in autism. *Mol Autism* 6:33.
- Murray, E.K., Hien, A., De Vries, G.J., Forger, N.G., (2009). Epigenetic control of sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Endocrinology* 150, 42414247. doi:10.1210/en.2009-0458
- Negri-Cesi, P., Colciago, A., Pravettoni, A., Casati, L., Conti, L., Celotti, F. (2008). Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: hormonal and environmental influences. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109(3-5), 294-299. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.03.003.
- Niehrs C, Schäfer A (2012). Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends Cell Biol* 22:220–227.
- Nugent, B.M., Wright, C.L., Shetty, A.C., Hodes, G.E., Lenz, K.M., Mahurkar, A., Russo, S.J., Devine, S.E., McCarthy, M.M., (2015). Brain feminization requires active repression of masculinization via DNA methylation. *Nat. Neurosci.* 18, 6907. doi:10.1038/nn.3988

- Ochoa, S., Usall, J., Cobo, J., Labad, X., Kulkarni, J. (2012). Gender Differences in Schizophrenia and First-Episode Psychosis: A Comprehensive Literature Review. *Schizophr Res Treatment* 2012:1–9.
- Ooi SKT, Bestor TH (2008) The Colorful History of Active DNA Demethylation. *Cell* 133:1145–1148.
- O'Shaughnessy, P.J., Baker, P.J., Johnston, H. (2006). The foetal Leydig cell-- differentiation, function and regulation. *Int J Androl* 29(1), 90-95; discussion 105-108. doi: 10.1111/j.1365-2605.2005.00555.x.
- Paxinos, G. and Franklin K.B.J. (2019). *Paxinos and Franklin's The Mouse Brain in stereotaxic coordinates*, Compact 5th Edition, San Diego, Elsevier Academic Press.
- Paxinos, G., Watson, C., Kassem, M.S., Halliday, G. (2007). *Atlas of the Developing Mouse Brain at E17.5, P0 and P6*, 2th Edition, San Diego, Elsevier Academic Press.
- Pfaff, D.W., Christen, Y. (2013). *Multiple origins of sex differences in brain: neuroendocrine functions and their pathologies*. Nueva York, Estados Unidos: Springer. ISBN: 978-3-642-33720-8. doi: 10.1007/978-3-642-33721-5
- Pfaff, D.W., (2009). *Hormones, brain and behavior*. Volume one, chapters 1-20. Academic Press/Elsevier, Amsterdam.
- Pfaff, D., Joels, M. (2016). *Hormones, brain, and behavior*. 3° ed. Amsterdam, Países Bajos; Boston, Estados Unidos: Elsevier/Academic Press. ISBN: 978-0128035924.
- Pfaffl, M.W., (2001). A new mathematical model for relative quantification in realtime RTePCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Phoenix, C.H., Goy, R.W., Gerall, A.A., Young, W.C. (1959). Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65, 369-382. doi: 10.1210/endo-65-3369.
- Qiao, X., Yan, Y., Wu, R., Tai, F., Hao, P., Cao, Y. (2014). Sociality and oxytocin and vasopressin in the brain of male and female dominant and subordinate mandarin voles. *J Comp Physiol A Neuroethol Sensory, Neural, Behav Physiol.* 200(2): 149-59.

- Rood BD, Stott RT, You S, Smith CJW, Woodbury ME, De Vries GJ (2013). Site of origin of and sex differences in the vasopressin innervation of the mouse (*Mus musculus*) brain. *J Comp Neurol* 521:2321–2358.
- Rucklidge, JJ. (2010). Gender Differences in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Psychiatr Clin North Am* 33:357–373.
- Scerbo, MJ, Freire-Regatillo, A, Cisternas, CD, Brunotto, M, Arevalo, MA, GarciaSegura, LM, et al. (2014). Neurogenin 3 mediates sex chromosome effects on the generation of sex differences in hypothalamic neuronal development. *Front Cell Neurosci* 8, 188. doi: 10.3389/fncel.2014.00188.
- Schwarz JM, Nugent BM, McCarthy MM (2010). Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology* 151:4871–4881.
- Soumier A, Habart M, Lio G, Demily C, Sirigu A. (2022). Differential fate between oxytocin and vasopressin cells in the developing mouse brain. *iScience*. 25(1):103655. doi: 10.1016/j.isci.2021.103655.
- Szwagierczak A, Bultmann S, Schmidt CS, Spada F, Leonhardt H (2010). Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 38:e181–e181.
- Towers AJ, Tremblay MW, Chung L, Li X-L, Bey AL, Zhang W, Cao X, Wang X, Wang P, Duffney LJ, Siecinski SK, Xu S, Kim Y, Kong X, Gregory S, Xie W, Jiang Y-H (2018). Epigenetic dysregulation of *Oxtr* in *Tet1*-deficient mice has implications for neuropsychiatric disorders. *JCI insight* 3.
- Trepat, E, Ezpeleta, L. (2011). Sex differences in oppositional defiant disorder. *Psicothema* 23:666–671.
- Uhl-Bronner, S, Waltisperger, E, Martínez-Lorenzana, G, Condes, LM, Freund-Mercier, MJ. (2005). Sexually dimorphic expression of oxytocin binding sites in forebrain and spinal cord of the rat. *Neuroscience*. 135(1):147-54.
- Werling, DM, Geschwind, DH. (2013). Sex differences in autism spectrum disorders. *Curr Opin Neurol* 26:146–153.

- Wijchers, PJ, Yandim, C, Panousopoulou, E, Ahmad, M, Harker, N, Saveliev, A, et al. (2010). Sexual dimorphism in mammalian autosomal gene regulation is determined not only by Sry but by sex chromosome complement as well. *Dev Cell* 19(3), 477-484. doi: 10.1016/j.devcel.2010.08.005.
- Yi YW, Kim D, Jung N, Hong SS, Lee HS, Bae I (2000). Gadd45 family proteins are coactivator of nuclear hormone receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 272:193–198.
- Yu M, Hon GC, Szulwach KE, Song C-X, Zhang L, Kim A, Li X, Dai Q, Shen Y, Park B, Min J-H, Jin P, Ren B, He C (2012). Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. *Cell* 149:1368–1380.