



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados  
del Instituto Politécnico Nacional  
Unidad Zacatenco**

**Departamento de Toxicología**

**“Metilación dinámica del DNA como mecanismo de regulación epigenética en  
células gliales en condiciones de excitotoxicidad”**

Tesis que presenta:

**M. en C. Ada Génesis Rodríguez Campuzano**

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias

En la especialidad de Toxicología

**Director de tesis**

Dr. Arturo Ortega Soto

Comité Académico:

Dra. Libia Vega Loyo

Dr. Olivier Christophe Barbier

Dr. Gabriel Roldán Roldán

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la tutoría del Dr. Arturo Ortega Soto.

Este trabajo fue financiado por el proyecto No. 255087 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) otorgado al Dr. Arturo Ortega Soto y Ada Génesis Rodríguez Campuzano fue becada por Conacyt-México con la beca de doctorado No. 487731

## RESUMEN

La exposición a xenobióticos tiene un impacto significativo en la fisiología del cerebro, particularmente con un proceso llamado excitotoxicidad inducida por una liberación masiva del principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central, el L-glutamato. La sobreestimulación de receptores de glutamato extra-sinápticos, principalmente del subtipo N-metil-D-aspartato, lleva a una alteración en la homeostasis de calcio intracelular que está críticamente involucrado en la muerte neuronal. Por ello, los niveles extracelulares de glutamato están altamente regulados a través de su captura por los transportadores gliales de glutamato. Se ha observado que el glutamato regula su propia captura, tanto a corto plazo a través de una disminución en la captura mediada por transportador, como a largo plazo a través del control transcripcional de su expresión génica, un proceso mediado por receptores de glutamato que involucran a la proteína cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$  / diacilglicerol y el factor de transcripción Yin Yang 1 (YY1). Considerando que este factor de transcripción es un miembro del complejo Polycomb, y forma parte de factores activadores y represores remodeladores de la cromatina, YY1 pudiera dirigir la interacción entre proteínas tales como las DNA metiltransferasas o dioxygenasas de citosinas metiladas hacia sus secuencias blanco dado que estas enzimas no tienen sitios consenso de unión al DNA. En este proyecto, exploramos el papel de la metilación dinámica en la expresión y función de transportadores gliales de glutamato. Para este fin, usamos el bien caracterizado cultivo primario de Células de Bergmann de cerebelos de embriones de pollo y la línea celular de glía de Müller, MIO-M1. Se evidenció un aumento en la metilación global del DNA cuando se expone la glía a L-Glutamato, este efecto fue dosis y tiempo dependiente. Bajo condiciones de hipometilación, los transportadores gliales de glutamato aumentaron en niveles de proteína y de actividad. Estos resultados favorecen la idea de la participación de un programa de metilación en las células gliales activado por el glutamato, dicho programa es reversible lo cual lo vuelve dinámico, modulando la función principal de estas células: remover el glutamato extracelular.

## ABSTRACT

Exposure to xenobiotics has a significant impact in brain physiology, that could be linked to an excitotoxic processes induced by a massive release of the main excitatory neurotransmitter, L-glutamate. Overstimulation of extra-synaptic glutamate receptors, mainly of the N-methyl-D-aspartate subtype leads to a disturbance of intracellular calcium homeostasis that is critically involved in neuronal death. Hence, glutamate extracellular levels are tightly regulated through its uptake by glial glutamate transporters. It has been observed that glutamate regulates its own removal, both in the short-time frame via a transporter-mediated decrease in the uptake, and in the long-term through the transcriptional control of its gene expression, a process mediated by glutamate receptors that involves the  $Ca^{2+}$ /diacylglycerol-dependent protein kinase and the transcription factor Yin Yang 1. Taking into consideration that this transcription factor is as a member of the Polycomb complex and thus, part of repressive and activating chromatin remodeling factors, it might direct the interaction of DNA methyltransferases or dioxygenases of methylated cytosines to their target sequences. Here we explored the role of dynamic DNA methylation in the expression and function of glial glutamate transporters. To this end, we used the well-characterized models of primary cultures of chick cerebellar Bergmann glia cells and a human retina-derived Müller glia cell line. A time and dose-dependent increase in global DNA methylation was evident upon glutamate exposure. Under hypomethylation conditions, the glial glutamate transporters protein levels and uptake activity were increased. These results, favor the notion that a dynamic DNA methylation program triggered by glutamate in glial cells modulates one of its major functions: glutamate removal.

## **DEDICATORIA**

*A mi familia*

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, le agradezco estar presentes en todo momento de mi crecimiento personal y profesional, brindándome su cariño y apoyo, llenándome de mucha alegría y satisfacción en cada visita con palabras dulces y alentadoras.

A mis amigos, por estar siempre a mi lado, en las buenas y en las malas, su presencia ha sido verdaderamente invaluable, por apoyarme, por escucharme y tratar de comprenderme, por sacarme una sonrisa cuando todo tiende a ir mal, por acompañarme en la alegría cuando todo es felicidad, y por simplemente estar cuando el mundo se te derrumba en tu proceso de aprendizaje y crecimiento personal.

Particularmente, agradezco a mi papá, por apoyarme incondicionalmente en mis transiciones personales y profesionales, sin él no hubiera podido terminar ninguna de mis metas, siempre presente, él siempre encuentra las palabras para motivarme y apoyarme.

Al grupo de trabajo al que pertenezco, el Laboratorio 31 del departamento de Toxicología, gracias a todos. A Clara, Luis y Blanca por su apoyo técnico, a mis compañeros por muchas veces hacer amenas las horas de trabajo, sobre todo cuando se extendían demasiado.

Agradezco a mi Tutor, el Dr. Arturo Ortega, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo. Es una persona que admiro mucho profesionalmente, y que me ha impulsado incesantemente a alcanzar más metas profesionales y personales. Por su paciencia, su tolerancia, su confianza, su apoyo, su guía y sus consejos que, si bien generacionalmente no nos entendemos mucho, siempre existió una buena química de trabajo que nos permitió ir paso a paso modelando el presente trabajo, nunca me dejó sola, pero sí que me permitió formar un criterio a la hora de tomar decisiones, permitiéndome con ello, madurar mis ideas ante los retos que surgen a la hora de hacer ciencia. Muchas gracias doctor.

Especiales agradecimientos a mis tutores: la Dra. Libia Vega, el Dr. Olivier Barbier, el Dr. Gabriel Roldán y el Dr. Daniel Hernández, quienes me acompañaron durante el desarrollo de este proyecto, y cuyas aportaciones y observaciones siempre fueron de gran ayuda para ir delineando las ideas entorno a este trabajo.

Agradezco a Cinvestav y al Departamento de Toxicología por todo el apoyo brindado durante mi formación en el posgrado, también, agradezco al Conacyt por la beca otorgada para que pudiera realizar mis estudios, de otra manera hubiera sido imposible lograrlo.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Sistema nervioso central .....	1
1.1.1 Cerebelo: Organización celular .....	1
1.1.2 Glía de Bergmann .....	3
1.2 Glutamato .....	4
1.2.1 Sinapsis glutamatérgica .....	5
1.2.2 Receptores de glutamato .....	6
1.2.3 Transportadores de glutamato .....	8
1.3 Regulación epigenética.....	11
1.3.1 Metilación del DNA.....	11
1.3.2 DNA metiltransferasas (DNMTs).....	13
1.3.3 Regulación de las DNMTs .....	15
1.3.4 Interacción de DNMT3s con factores de transcripción.....	16
1.3.5 DNMT3s en el SNC.....	17
1.4 Antecedentes directos: Señalización acoplada a la posible regulación epigenética de la expresión del transportador de Glutamato GLAST en células gliales .....	18
1.5 Justificación .....	20
1.6 Hipótesis.....	20
1.7 Objetivos .....	21
1.7.1 Objetivo General .....	21
1.7.2 Objetivos particulares.....	21
2. MÉTODOS.....	22
2.1 Materiales .....	22
2.2 Cultivo primario de células de Glía de Bergmann.....	22
2.3 Cultivo de línea celular MIO-M1 .....	23
2.4 SDS-PAGE e Inmunodetección en fase sólida: Western blot .....	23
2.4.1 Principio.....	23
2.4.2 Procedimiento .....	23
2.5 Obtención de DNA genómico .....	24
2.5.1 Principio.....	24
2.5.2 Procedimiento .....	25
2.6 Cuantificación de DNA metilado.....	26

2.6.1 Principio.....	26
2.6.2 Procedimiento .....	26
2.7 Extracción de RNA y ensayo RT-qPCR.....	27
2.7.1 Principio.....	27
2.7.2 Procedimiento .....	27
2.8 Ensayos de captura de [ <sup>3</sup> H]-D-aspartato.....	28
2.8.1 Principio.....	28
2.8.2 Procedimiento .....	28
2.9 Análisis Estadístico .....	29
3. RESULTADOS .....	30
3.1 Metilación del DNA dependiente de glutamato en células de glía de Bergmann (CGB).....	30
3.2 La hipometilación del DNA aumenta la actividad de los transportadores de glutamato en CGB31	
3.3 El Glutamato disminuye la expresión de GLAST a través de un evento de metilación modulado por las DNMTs <i>de novo</i> .....	33
3.4 Aumento de la metilación del DNA dependiente de Glutamato en Células MIO-M1.....	35
3.5 YY1 participa en la represión transcripcional de GLAST en células MIO-M1 .....	36
3.6 Regulación del transporte de [ <sup>3</sup> H]-D-Asp en células MIO-M1.....	39
4. DISCUSIÓN.....	41
5. CONCLUSIONES .....	45
6. PERSPECTIVAS .....	46
7. REFERENCIAS.....	47
8. APÉNDICE .....	56

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
Figura 1. Sistema Nervioso Central.....	2
Figura 2. Relación morfológica entre las células de Glía de Bergmann y neuronas de Purkinje .....	3
Figura 3. Receptores de glutamato.....	7
Figura 4. Estructura funcional de los transportadores de glutamato, EAATs.....	10
Figura 5. Dominios estructurales y reacción de metiltransferasa de las DNMTs .....	15
Figura 6. La exposición a L-Glutamato aumenta la metilación del DNA en las CGB...	30
Figura 7. La actividad de GLAST aumenta en condiciones de hipometilación en CGB.....	32
Figura 8. El estado de metilación del DNA modifica los niveles de proteína de GLAST y YY1.....	34
Figura 9. El Glutamato modula la expresión de las DNMTs <i>de novo</i> en CGB.....	35
Figura 10. Niveles globales de metilación del DNA en células MIO-M1.....	36
Figura 11. YY1 participa en la expresión de GLAST bajo estimulación glutamatérgica en células MIO-M1.....	38
Figura 12. Evaluación de la actividad de los transportadores de glutamato en condiciones hipometilantes en la línea celular MIO-M1.....	40

## ABREVIATURAS

[ <sup>3</sup> H]-D-Asp	D-Aspartato tritiado
5-Aza	5-aza-2'-desoxicitidina
5mC	5-metil-citosina
AC	Adenilato ciclasa
ALS	esclerosis lateral amiotrófica
AMPA	α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxasol-4-propiónico
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
BER	Reparación por escisión de base
Bis 1	Bisindolilmaleimida 1
CGB	Células de Glía de Bergman
<i>Chglast</i>	Gen de GLAST de pollo (chick)
CpG	Dinucleotidos CG
DAG	Diacilglicerol
D-Asp	D-Aspartato
DHK	Ácido dihidrokaínico (Dihidrokaínato)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAg	Ácido Desoxirribonucleico genómico
DNMTs	DNA metil-transferasas (1, 3A o 3B)
EAATs	Transportadores de Aminoácidos excitadores
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
GABA	ácido γ-aminobutírico
GLAST	Transportador de Glutamato-Aspartato (EAAT1)
Gln	Glutamina
GLT-1	Transportador de glutamato 1 (EAAT2)
GS	Glutamina sintetasa
HDAC	Histona des-acetilasa
iCa <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup> intracelular
ICG	Isla CpG
iGluRs	Receptores ionotrópicos de glutamato
IP <sub>3</sub>	1,4,5-trifosfato
KA	Kainato
L-Glu / Glu	L-Glutamato
lncRNA	RNA largo no codificante
MAPK	Proteína cinasa activad por mitógenos
MBPs	Proteínas de unión metilos
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato
miRNA	Micro RNA
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ncRNA	RNAs no codificantes
NMDA	N-metil-D-Aspartato

PcG	Grupo Polycomb
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 cinasa
PKC	Proteína Cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PRC2	Complejo Represivo Polycomb 2
RNA	Ácido ribonucleico
SAH	S-Adenosil homocisteína
SAM	S-Adenosil-L-metionina
SLC1	Acarreadores de soluto 1
<i>slc1A2</i>	Gen humano de GLT-1 /EAAT2
<i>slc1A3</i>	Gen humano de GLAST/EAAT1
SNC	Sistema Nervioso Central
snRNA	RNA corto no codificante
TDG	Timina DNA glicosilasa
Tet1	Dioxigenasa Ten Eleven Translocation
TPA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetato
VGLUTs	Transportadores vesiculares de glutamato
$V_{Max}$	Velocidad Máxima
VPA	Ácido Valproíco
YY1	Yin Yang 1

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Sistema nervioso central**

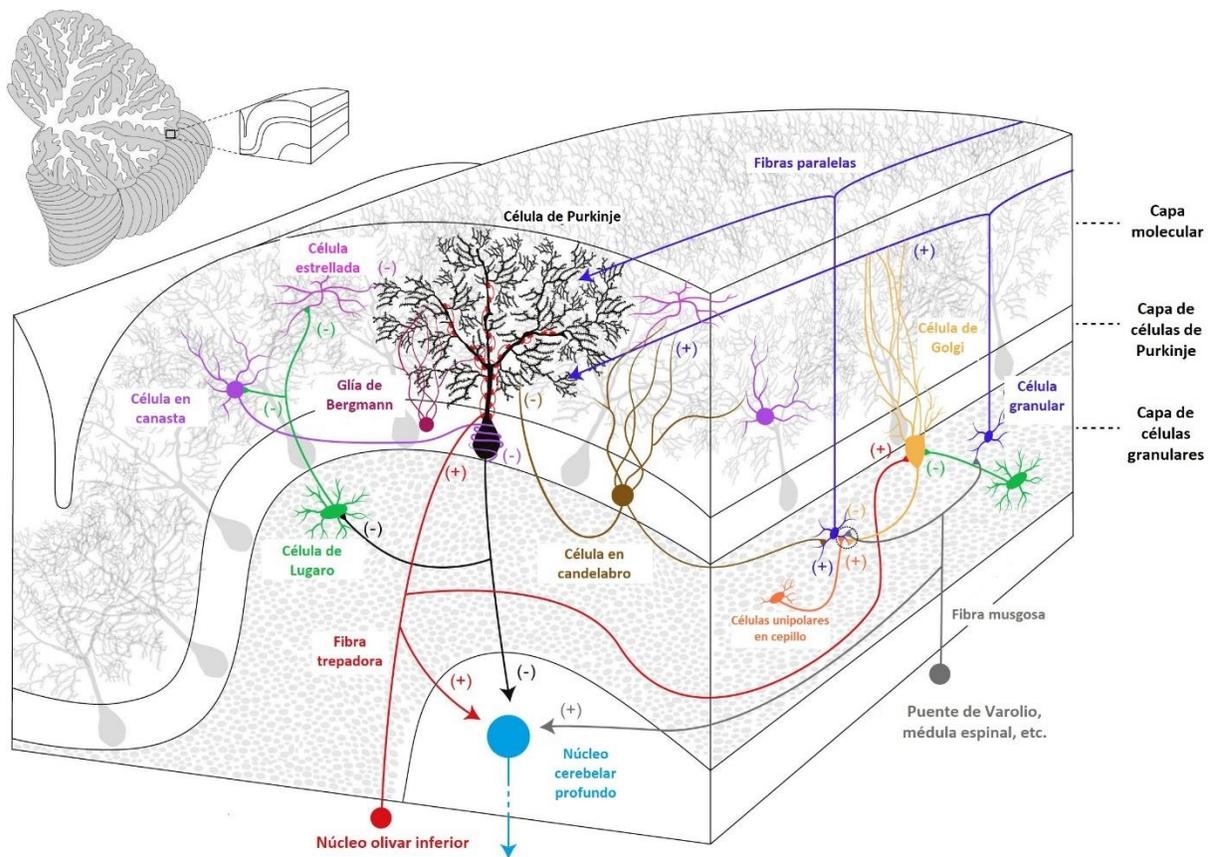
El sistema nervioso central (SNC) es el centro fisiológico donde se correlaciona, integra y procesa la información en forma de impulsos nerviosos en respuesta a estímulos internos y externos (Brodal, 2016). Existen dos clases principales de células en el SNC, en un orden de magnitud de  $10^{11}$  células, la (1) neurona es la unidad funcional básica (células excitables) que, de manera general se encargan de la recepción de estímulos y en la conducción del impulso nervioso, estas se encuentran rodeadas de una variedad de células no excitables que en conjunto se denominan (2) glía o neuroglía, en algunas regiones del SNC las células gliales superan de 5 a 10 veces el número de neuronas constituyendo aproximadamente el 50% del volumen total del encéfalo y médula espinal (Snell, 2007; Kandel *et al.*, 2012). Las células gliales tienen funciones altamente especializadas que van desde aislar procesos neuronales, controlar el microambiente neuronal manteniendo la homeostasis de iones y neurotransmisores, brindar soporte metabólico, también forman parte de procesos de reparación, producen mielina, forman la barrera hematoencefálica (BHE) y durante el desarrollo cerebral dirigen la migración neuronal y crecimiento axonal (Kandel *et al.*, 2012; Brodal, 2016; Farmer & Murai, 2017).

Las células gliales se clasifican de acuerdo a su diversidad funcional y morfológica en: 1) astrocitos fibrosos en forma de estrella de la materia blanca, 2) astrocitos protoplásmicos de la materia gris, 3) astrocitos endodiales localizados en los nichos de células tallo del cerebro, 4) glía radial que está inmersa en la corteza cerebral contactando a la membrana pial (en la retina son células gliales de Müller y en el cerebelo son células de glía de Bergmann), y 5) astrocitos perivasculares los cuales están en contacto con la neurovasculatura vía sus pies terminales (Claycomb *et al.*, 2013).

#### **1.1.1 Cerebelo: Organización celular**

Del SNC, la citoarquitectura de la corteza cerebelar es la que se conoce a más detalle haciendo de ella el área más adecuada para realizar estudios bioquímicos y moleculares sobre la neurotransmisión (Levi & Gallo, 1986); particularmente en esta estructura la

neurotransmisión está mediada por dos neurotransmisores, uno excitador (ácido glutámico/L-glutamato) y otro inhibitor (ácido  $\gamma$ -aminobutírico/GABA). La citoarquitectura del cerebelo consta de tres capas: la capa molecular, que contiene dos tipos de interneuronas inhibitoras denominadas estrelladas y en canasta, dispersas entre los axones excitadores de células granulares (fibras paralelas) y las dendritas de las células de Purkinje inhibitoras; la capa intermedia, donde se encuentran los cuerpos neuronales ( $\Theta$  50-80  $\mu\text{m}$ ) de las células de Purkinje con arborizaciones dendríticas en abanico que se extienden hacia arriba; y la capa interna o granular, que contiene principalmente células granulares y unas pocas interneuronas de Golgi (Figura 1B) (Kandel *et al.*, 2012; Binda *et al.*, 2020).

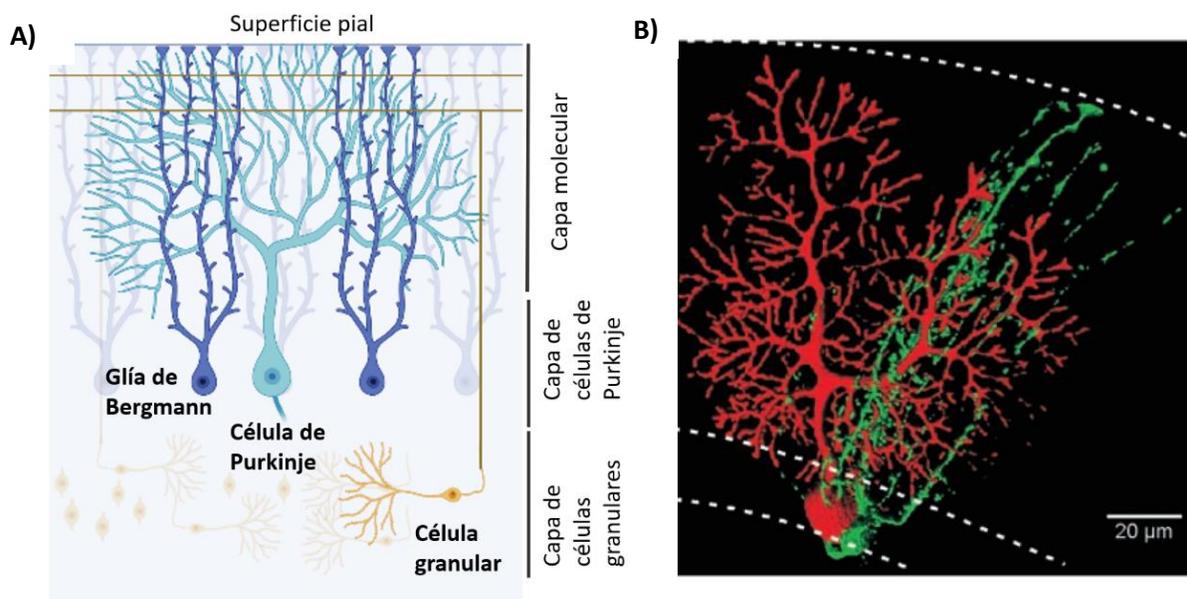


**Figura 1.** Corteza cerebelosa organizada en tres capas: corte vertical de una sola lámina cerebelosa, mostrada en el plano longitudinal y el transversal, ilustra la organización general de la corteza cerebelosa. Los componentes excitadores (+) e inhibitorios (-) están representados de forma simplificada. Imagen modificada de Binda *et al.*, 2020.

### 1.1.2 Glía de Bergmann

Las células de glía de Bergmann (CGB) están confinadas al cerebelo, presentan cuerpos celulares alineados a los somas de las células de Purkinje y forman varios procesos ascendentes que atraviesan radialmente la capa molecular, hasta sus pies terminales en contacto con la membrana basal supial (Figura 2)(Kandel *et al.*, 2012).

Las CGB y su orientación típica son parte del sistema glial radial que se encuentra en muchas áreas del cerebro en desarrollo incluyendo la retina. En los primeros días posnatales, las CGB son un requerimiento necesario en el desarrollo adecuado del cerebelo. Forman estructuras radiales que se extienden a lo largo de la capa granular externa sobre las cuales las células granulares migran hacia su destino final (Buffo & Rossi, 2013).



**Figura 2.** Relación morfológica entre las células de Glía de Bergmann y neuronas de Purkinje.

A) Dibujo esquemático de las neuronas de Purkinje (Pc) y las células de Glía de Bergmann (CGB) (azul). B) Reconstrucción tridimensional (Brockhaus & Deitmer, 2002) utilizando doble inmunocitoquímica, marcando CGB con Alexa 488 (verde), y Pc con Alexa 658 donde se observa que los procesos de las CGB se sobrelapan en parte del árbol dendrítico de las Pc en la capa molecular del cerebelo.

En contraste con la mayoría de las células gliales presentes en el desarrollo temprano, las CGB están presentes aún en el cerebro maduro, esto implica que las células adquieren funciones posteriores a su papel durante el desarrollo (Muller & Kettenmann, 1995). Las CGB en la corteza cerebelar poseen una morfología compleja con un plexo de finos procesos que restringen a un área limitada la liberación de glutamato de las fibras paralelas de las células granulares (Grosche *et al.*, 1999). La estimulación de las entradas sinápticas a las neuronas de Purkinje, formadas por las fibras paralelas y las fibras trepadoras, inducen respuestas membranales complejas en las células de la Glía de Bergmann (Gallo & Ghiani, 2000). En principio, el glutamato liberado de las fibras paralelas despolariza a las CGB disparando no solo un influjo significativo de  $Ca^{2+}$  sino también cascadas de señalización membrana-núcleo que participan en la regulación transcripcional de estas células (Brockhaus & Deitmer, 2002; Verkhatsky, 2010; Martinez-Lozada *et al.*, 2011)

Dada la evidencia de que las células gliales pueden responder a la actividad neuronal existiendo una comunicación bidireccional glía-neurona, surge el término “sinapsis tripartita” en donde los procesos gliales rodean a las sinapsis, de tal manera que previenen que el glutamato difunda de una hendidura sináptica a otra, ya que las células gliales tienen transportadores con mayor capacidad de captura que los transportadores encontrados en las neuronas glutamatérgicas (Rothstein *et al.*, 1996; Hertz *et al.*, 1999).

## **1.2 Glutamato**

El ácido L-glutámico, o en su forma ionizada, glutamato (Glu) es el principal aminoácido transmisor de las señales excitadoras del SNC (Danbolt, 2001), participa en la transmisión sináptica normal, en la potenciación y depresión a largo plazo, en otras palabras, en el fenómeno básico involucrado en el aprendizaje y la memoria, y en la maduración neuronal y sinaptogénesis (Marmioli & Cavaletti, 2012).

Además de su papel como neurotransmisor el Glu es el precursor inmediato del neurotransmisor inhibitor GABA, es un componente esencial del metabolismo intermediario

(P.ej.: fijación de amonía), una unidad de formación de proteínas, un substrato energético y, paradójicamente, una potente neurotoxina (Bak *et al.*, 2006).

De manera general las concentraciones de Glu en el cerebro son muy elevadas, van de 5-15 mmol/kg de peso (dependiendo de la región) (Danbolt, 2001). Estudios de microdiálisis sugieren que el Glu extracelular está en el rango micromolar, sin embargo, estudios de voltametría *in vivo* usando biosensores acoplados a glutamato oxidasa han estimado concentraciones sinápticas basales tan bajas como 25 nM en rebanadas de hipocampo (Herman & Jahr, 2007). De forma intracelular, las neuronas glutamatérgicas tienen de 5 a 10 mM de Glu concentrado principalmente en las terminales axónicas (Osen *et al.*, 1995); mientras que los astrocitos tienen de 1 a 3 mM de Glu disperso en el citoplasma (Lehmann *et al.*, 2009). Ante la multitud de procesos de los que es participe el Glu, su homeostasis es bastante compleja e involucra varios elementos celulares específicos incluyendo transportadores de membrana y enzimas tanto en neuronas como en la neuroglía (Danbolt, 2001).

### **1.2.1 Sinapsis glutamatérgica**

Las sinapsis glutamatérgicas son las principales sinapsis excitadoras en el SNC, y son muy abundantes en el cerebelo (Kandel *et al.*, 2012). Estas ocurren en 4 pasos principales: **(1)** una vez sintetizado, el Glu citoplasmático en las terminales neuronales es concentrado dentro de vesículas sinápticas por proteínas de antiporte protón/Glu llamadas transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs) (Takamori, 2006), la energía motora de estos transportadores surge de una ATPasa vesicular dependiente de  $Mg^{2+}$  que bombea los  $H^+$  (Danbolt, 2001). Estas vesículas (30-45 nm) contienen concentraciones de glutamato en el orden de 100 mM que se traduce en aproximadamente 400-5000 moléculas de Glu por vesícula, las vesículas liberan su contenido por exocitosis dependiente de  $Ca^{2+}$  (Danbolt, 2001). **(2)** Una vez liberado el Glu en la hendidura sináptica (<1  $\mu m$ ) su concentración extracelular aumenta de forma transitoria en el orden milimolar (0.24-11 mM). El Glu difunde en la hendidura sináptica interaccionando con sus blancos moleculares, principalmente con los receptores glutamatérgicos localizados en las terminales postsinápticas transduciendo las

señales químicas de la sinapsis, aunque también existen receptores de Glu en las presinápsis glutamatérgicas y en algunas terminales nerviosas GABAérgicas que aparentemente modulan la liberación del neurotransmisor por un mecanismo de retroalimentación negativa (Niciu *et al.*, 2012). **(3)** Las altas concentraciones de Glu extracelular, y especialmente de Glu extrasináptico, llevan a daño celular (hiper-excitabilidad que desencadena en un proceso de excitotoxicidad) por lo que el Glu es removido activa y rápidamente en una escala de milisegundos por los transportadores de aminoácidos excitadores (EAATs por su siglas en inglés) localizados principalmente en los procesos astrocíticos asociados sinápticamente (O'Shea, 2002). **(4)** Por último después de capturar todo el Glu del medio extracelular de la hendidura sináptica continua metabolismo y/o reciclamiento de Glu dentro de los astrocitos (Danbolt, 2001).

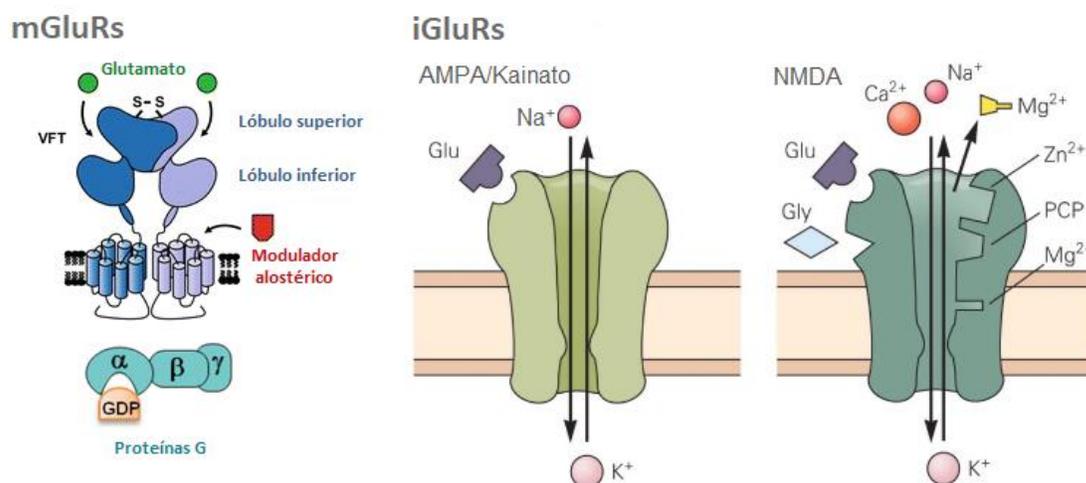
La inducción excesiva de señal glutamatérgica se ha asociado a la progresión de desórdenes neurodegenerativos crónicos, incluyendo esclerosis lateral amiotrófica (ALS), esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, isquemia, lesión cerebral traumática, además, existe evidencia indirecta de un posible papel del Glu en neuropatías periféricas de distintos orígenes (Lewerenz & Maher, 2015).

### **1.2.2 Receptores de glutamato**

La neurotransmisión glutamatérgica ocurre a través de receptores específicos, subdivididos en dos clases: receptores ionotrópicos (iGluRs) que actúan como canales iónicos abiertos por ligando, y receptores metabotrópicos (mGluRs) que están ligados a proteínas G como segundos mensajeros intracelulares (Marmioli & Cavaletti, 2012).

Los iGluRs están subdivididos en tres subclases con base en sus afinidades farmacológicas a ligando sintéticos: receptores N-metil-D-aspartato (NMDA-R), receptores  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoaxazol-4-propiónico (AMPA-R) y receptores kainato (KR), estos receptores median la transmisión neuronal excitadora rápida (escala de milisegundos), resultando en conductancia iónica de  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{Ca}^{2+}$ . En general, los receptores AMPA y KA tienden a abrirse al  $\text{Na}^+$  más ávidamente, mientras los NMDA-R muestran entrada preferente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Harves & Shahid, 2012).

Los mGluRs se agrupan constitutivamente en dímeros, estructuralmente constan de un dominio C terminal intracelular que modula el acoplamiento a proteínas G, siete dominios transmembranales y un dominio N terminal extracelular que contiene un dominio VFD (Venus flytrap domain) que consiste en dos lóbulos que se posicionan uno sobre otro y que unen al glutamato en la hendidura que se forma entre ambos lóbulos (Niswender & Conn, 2010). Los mGluRs están subdivididos en tres grupos basados en sus propiedades farmacológicas y segundos mensajeros. De forma clásica, el Grupo I (mGluR1 y mGluR5) están ligados a proteínas G tipo  $G\alpha_q$  que activan a la fosfolipasa C (PLC) para generar inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG), los cuales estimulan la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular del retículo endoplásmico y activan a la proteína cinasa C (PKC), respectivamente; estos receptores están expresados principalmente en sitios postsinápticos (Pin *et al.*, 2004). En contraste, el Grupo II (mGluR2 y mGluR3) y Grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) están ligados a proteínas G tipo  $G\alpha_{i/o}$  los cuales inhiben la formación de AMP cíclico (AMPc) al inhibir a la adenilato ciclasa (AC) y con ello disminuye la actividad de los canales iónicos de  $Ca^{2+}$ , activan los canales de  $K^+$  e inhiben otras vías de señalización río abajo; los mGluRs del grupo II se localizan tanto en sitios pre- como post-sinápticos, mientras los mGluRs del grupo III son expresados predominantemente en los sitios presinápticos, en donde regulan la liberación del neurotransmisor por la neurona (Kim *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Receptores de Glutamato. A) Esquema de los receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs) acoplados a proteínas G que señalizan río abajo activando diversas

cascadas de señalización; B) Esquema de receptores ionotrópicos (iGluRs), los cuales son canales iónicos abiertos por ligando, dividiéndose en tres grupos con base a sus afinidades farmacológicas: AMPA, Kainato y NMDA.

Estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares han demostrado que tanto los iGluRs como los mGluRs están presentes *in vivo* en distintas poblaciones de células gliales a una densidad similar a la encontrada en las neuronas (Steinhauser & Gallo, 1996). También expresan receptores AMPA permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  y varios mGluRs, por lo que la liberación de Glu (sináptica o axonalmente) pueden activar a receptores de Glu en la glía para provocar: a) modulación de la captura del neurotransmisor hacia la glía participando en la terminación de la transmisión sináptica; b) modulación las conductancias de  $\text{K}^+$  dentro de las células gliales, modificando el ambiente iónico extracelular; y c) liberando sustancias neuroactivas desde la glía que puede retroalimentar o modular la transmisión sináptica (Verkhratsky, 2010; Danbolt *et al.*, 2016).

### **1.2.3 Transportadores de glutamato**

Hasta el momento no se ha reportado la presencia de alguna enzima extracelular que metabolice al Glu, por lo que la única forma rápida de inactivar el Glu liberado sinápticamente es removerlo del medio extracelular por difusión, o bien, siendo capturado por las neuronas y astrocitos vía EAATs (Rodríguez-Campuzano & Ortega, 2021). Estos utilizan los gradientes electroquímicos a través de las membranas plasmáticas como fuerzas motoras para la captura, dichos gradientes son mantenidos por la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y/o el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Danbolt, 2001; Robinson & Jackson, 2016).

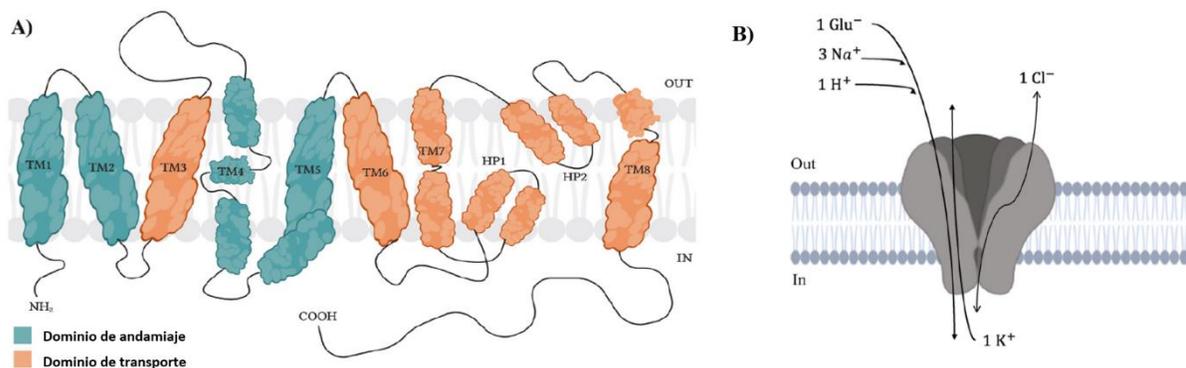
Se han identificado y clonado cinco subtipos de transportadores (EAAT 1-5) pertenecientes a la familia de transportadores Acarreadores de soluto 1 (SLC1) (aproximadamente 65% de homología entre transportadores), comparten propiedades estructurales y moleculares, pero difieren en características funcionales tales como las tasas de transporte y afinidad por el substrato. Los valores de  $K_m$  para el transporte de Glu son diferentes entre transportadores: EAAT1 (SLC1A3) tiene una  $K_m$  que ronda entre 7 y 20  $\mu\text{M}$ , para EAAT2 (SLC1A2) va de 12 a 18  $\mu\text{M}$ , EAAT3 (SLC1A1) de 8 a 30  $\mu\text{M}$ , las cinéticas para EAAT4 (SLC1A6) y EAAT5 (SLC1A7) son algo diferentes, EAAT4 posee la afinidad más alta con valores en  $K_m$  en el rango de 0.6 a 3.3

$\mu\text{M}$ , mientras EAAT5 tiene la afinidad más baja con  $K_m$  de entre 61 y 63  $\mu\text{M}$  (Arriza *et al.*, 1994; Fairman *et al.*, 1995; Wadiche *et al.*, 1995; Wadiche & Kavanaugh, 1998; Bergles *et al.*, 2002; Mim *et al.*, 2005). De acuerdo a los tiempos de rotación, es decir, el tiempo que le toma al transportador mover una sola molécula de Glu a través de la membrana plasmática los EAAT4 y EAAT5 son los transportadores más lentos con tiempos de rotación de 300 milisegundos o más, pero dejan fluir fácilmente corrientes de  $\text{Cl}^-$ , haciendo que estos transportadores funcionen más como receptores inhibidores en lugar de acarreadores de Glu (Arriza *et al.*, 1997; Gameiro *et al.*, 2011). El resto de los transportadores EAAT1-3 tienen tiempos de rotación de 10-50 milisegundos (Mim *et al.*, 2005).

La estequiometría de estos transportadores consiste en el co-transporte de una molécula de Glu, tres moléculas de  $\text{Na}^+$  y un protón ( $\text{H}^+$ ) con el contra-transporte de una molécula de  $\text{K}^+$  en cada ciclo (Figura 4B) (Robinson & Jackson, 2016). Esta compleja estequiometría libera la energía suficiente para permitir el transporte activo de Glu dentro de las células contra el gradiente de concentración, soportando un gradiente de Glu de hasta  $10^6$  veces a través de la membrana plasmática, asegurando que las concentraciones extracelulares de Glu se mantengan en el rango nanomolar, permitiendo además que el transporte de Glu solo se revierta bajo condiciones extremas (Rose *et al.*, 2018).

La mayoría de los transportadores de glutamato se agrupan en complejos homotriméricos, aunque se han reportado algunos complejos heterotriméricos (Nothmann *et al.*, 2011). La expresión de cada transportador varía a lo largo del SNC, la expresión de EAAT4 está enriquecida en las células de Purkinje en el cerebelo (Massie *et al.*, 2008); EAAT5 se encuentra en la terminal presináptica de células bipolares de la retina (Schneider *et al.*, 2014); EAAT3/EAAC1 (Kanai & Hediger, 1992) se encuentra tanto en las neuronas excitadoras como inhibitoras de todo el cerebro, con altas concentraciones en el hipocampo, cerebelo y ganglio basal (Rothstein *et al.*, 1994), se expresa predominantemente en dendritas y soma lo que sugiere que juega un papel homeostático o en el metabolismo celular en lugar de regular directamente la neurotransmisión.

Por su parte EAAT1 y EAAT2, cuyos homólogos en rata son el Transportador de Glutamato-Aspartato o GLAST (Storck *et al.*, 1992) y el Transportador de Glutamato o GLT-1 (Pines *et al.*, 1992), respectivamente, son los principales transportadores gliales. EAAT1 se localiza en el oído interno, la retina, en la zona subventricular y es muy abundante en el cerebelo en donde la máxima densidad de EAAT1 se localiza en las CGB, calculando que existen  $\sim 18\,000$  transportadores/ $\mu\text{M}^3$  (Lehre & Danbolt, 1998), de igual manera se expresa en la región CA1 del hipocampo con una densidad de  $\sim 3\,200$ / $\mu\text{M}^3$  principalmente en los astrocitos y a menudo coexpresan con EAAT2 sin formar complejos heteroligoméricos (Haugeto *et al.*, 1996). Mientras, el EAAT2 es responsable de cerca del  $\sim 90\text{-}95\%$  de la captura de Glu en el cerebro anterior, predominantemente se expresa en astrocitos pero cerca del  $10\%$  es expresado en las terminales neuronales presinápticas en el hipocampo en donde hay una densidad de  $\sim 12\,000$  transportadores/ $\mu\text{M}^3$ , mientras en el cerebelo hay solo alrededor de  $2\,800$  transportadores/ $\mu\text{M}^3$  (Lehre & Danbolt, 1998; Furness *et al.*, 2008).



**Figura 4.** Estructura funcional de los transportadores de glutamato, EAATs. A) El modelo más aceptado de la topología de los EAATs con 8 dominios transmembranales, 2 bucles en horquilla y ambos extremos terminales (NH<sub>2</sub> y COOH) intracelulares. B) Estequiometría de estos transportadores que consiste en el co-transporte de una molécula de Glu, tres moléculas de Na<sup>+</sup> y un protón (H<sup>+</sup>) acoplado al contra-transporte de una molécula de K<sup>+</sup> en cada ciclo, además de una conductancia aniónica (Cl<sup>-</sup>) desacoplada que puede ocurrir entre los transportadores (Editada de Rodríguez-Campuzano and Ortega, 2021).

### **1.3 Regulación epigenética**

El término epigenética se refiere a cualquier proceso que altere la regulación de la expresión génica sin cambiar la secuencia de nucleótidos del DNA. Dentro de los procesos epigenéticos más representativos están los mecanismos de regulación de la cromatina vía modificaciones covalentes del DNA como la metilación e hidroximetilación; y en las proteínas histonas (acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinación, sumoilación, ADP ribosilación, desaminación, isomerización de prolina, etc.) (Rudenko & Tsai, 2014).

Otro proceso epigenético importante es la regulación mediada por RNAs no codificantes (ncRNAs) que se caracteriza por dos mecanismos principales: (i) silenciamiento genético postranscripcional y (ii) silenciamiento genético transcripcional. Además, completamente opuesto al silenciamiento, recientemente se ha propuesto que los ncRNAs también pueden tener actividad de activadores transcripcionales (Turner & Morris, 2010).

Es así como el control epigenético de todo el genoma se compone de mecanismos altamente sofisticados que requieren una gran comunicación y múltiples circuitos de retroalimentación intrínsecos y extrínsecos en los que participan diferentes modificaciones epigenéticas, dando un grado de complejidad mayor a la expresión genética convencional (Gibney & Nolan, 2010). A diferencia del genoma, que es esencialmente idéntico en todas las células y estable a lo largo de la vida del individuo, el epigenoma difiere de célula a célula y es plástico, cambiando con el tiempo y la exposición al ambiente (Jirtle & Skinner, 2007).

#### **1.3.1 Metilación del DNA**

La metilación del DNA consiste en la unión covalente de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) en el carbono 5 de residuos de citosinas precedidas de guaninas, comúnmente denominados dinucleótidos CpG (en donde la "p" representa el enlace fosfodiéster que une a la citosina y la guanina) (Gibney & Nolan, 2010). Aproximadamente el 3% de las citosinas del DNA están metiladas, y aproximadamente el 60% de los genes tienen secuencias promotoras con densas regiones de dinucleótidos CpG, denominadas islas CpG (ICG), las cuales deben tener por definición una longitud de entre 200-1000 pb, una composición CG  $\geq$  50% y una tasa CpG  $\geq$  0.60 (Deaton & Bird, 2011).

En los vertebrados, cerca del 80% de los dinucleótidos CpG que se localizan fuera de ICG comúnmente están metiladas, en contraste, los CpGs dentro de ICG generalmente no están metilados o tienen relativamente bajos niveles de metilación (Nafee *et al.*, 2008). Además de las ICG asociadas a regiones promotoras, el resto de las ICG se distribuyen de forma equitativa entre los cuerpos de los genes (intragénicas) o entre genes (intergénicas), se les conoce como ICG *huérfanas (orphan)*, presentan actividad transcripcional conservada entre especies y se ha sugerido que las de localización intergénica pueden marcar el sitio de inicio de transcripción de RNAs no codificantes (Illingworth *et al.*, 2010). Interesantemente, las ICG huérfanas exhiben patrones de metilación dinámicos y son metilados preferencialmente durante el desarrollo, sugiriendo que están regulados y pueden participar en la especificación de tejidos (Illingworth *et al.*, 2008).

De manera general la metilación de DNA se asocia al silenciamiento transcripcional con un estado represivo de la cromatina y la inhibición de la actividad del promotor; esto se logra a través de dos modelos de represión: 1) Dado que los grupos metilo se proyectan hacia dentro del surco mayor del DNA existe una interferencia directa para la unión de algunos factores de transcripción, y 2) la metilación del DNA puede afectar los estados de la cromatina indirectamente a través del reclutamiento de proteínas de unión a CpGs metiladas (MBPs, methyl-CpG-binding proteins)(Klose & Bird, 2006). Las proteínas reclutadas generalmente son represoras transcripcionales como MeCP2, MBD1, MBD2 y MBD3 cuya característica en común es el reclutamiento de correpresores y desacetilasas de histonas (Newell-Price *et al.*, 2000). Por esto, se dice que la metilación del DNA es un evento íntimamente relacionado con la modificación de histonas y consecuentemente con el estado de compactación de la cromatina (Bird, 2007).

La metilación del DNA se puede revertir a través de un proceso pasivo que ocurre con la división celular y pérdida de las marcas de metilación en las hebras hijas. Sin embargo, en células somáticas con bajas tasas de división celular, la eliminación de las marcas de metilación puede ocurrir por desmetilación activa, que consiste en una serie de oxidaciones consecutivas por las enzimas ten-eleven translocation (TETs) sobre las 5mC, estas oxidaciones producen tres intermediarios: 5-hidroximetilcitosinas, 5-formilcitosinas y 5-carboxilcitosinas. Estos

derivados de oxidación pueden ser reconocidos y escindidos por una timina-DNA glicosilasa, restaurando la citosina no metilada vía Reparación por Escisión de Bases (BER) (Ito *et al.*, 2011).

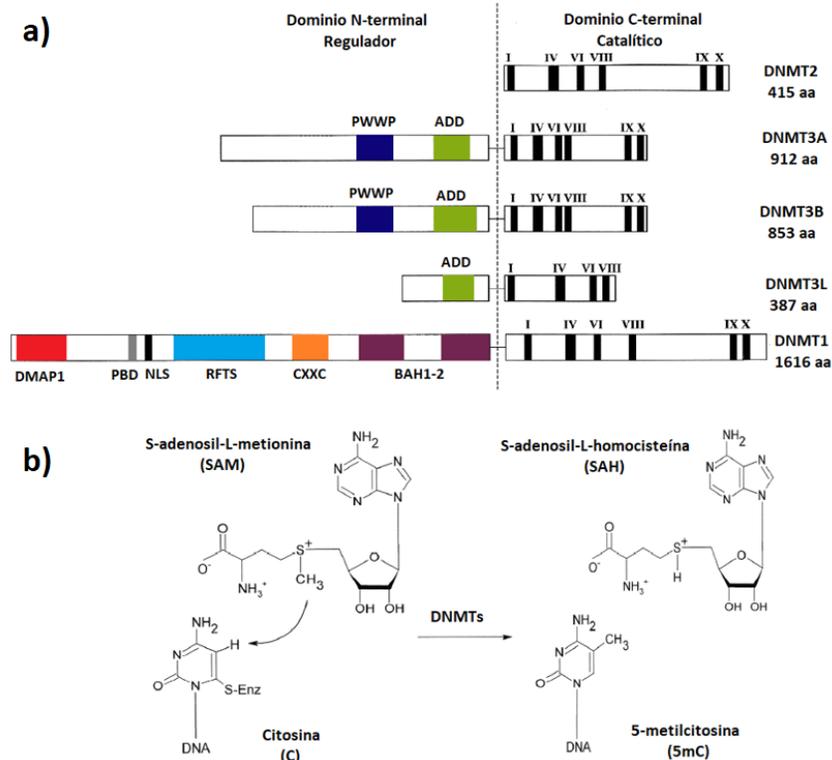
### 1.3.2 DNA metiltransferasas (DNMTs)

Las DNA metiltransferasas (DNMTs) forman una familia de enzimas responsables de la metilación del DNA; éstas se agrupan en tres sub-familias: DNMT1, DNMT2 y DNMT3, esta agrupación se basa en propiedades distintivas de sus regiones N-terminal y diferencias en sus preferencias por el DNA sustrato. La DNMT1 cataliza principalmente reacciones de hemimetilación ya que mantiene la metilación durante la replicación al copiar los patrones de metilación de la cadena guía del DNA en la cadena recién sintetizada (Newell-Price *et al.*, 2000). La DNMT2 posee baja habilidad para metilar el DNA, sin embargo, puede metilar débilmente sustratos que incluyen sitios CG localizados en la secuencia consenso TTNCGGAR, además, participa en la metilación de RNA, específicamente de la C38 del tRNA<sup>Asp</sup> (Hermann *et al.*, 2003; Goll *et al.*, 2006). La familia DNMT3 incluye a DNMT3A y DNMT3B que son responsables de catalizar reacciones de metilación *de novo* por lo que sus blancos son dinucleótidos CpG no metilados. Participan en el establecimiento de patrones de metilación durante la pre-implantación/embriogénesis y gametogénesis, también están frecuentemente asociados a la represión de genes en muchas patologías (Okano *et al.*, 1999). DNMT3L es una variante catalíticamente inactiva de la familia DNMT3 que interactúa con la DNMT3A y la DNMT3B estimulando la actividad de ambas enzimas o cambiando su localización sub-nuclear llevándolas de la heterocromatina a la eucromatina para metilar regiones diferencialmente (Jurkowska *et al.*, 2011; Neri *et al.*, 2013).

Estructuralmente las DNMTs constan de un dominio regulador N-terminal que contiene varios subdominios conservados que median las interacciones moleculares y un dominio catalítico C-terminal con actividad de metiltransferasa (Figura 5A). La DNMT1 contiene una larga región reguladora de ~1000 aminoácidos con un dominio DMAP1 (DNMT1-associated protein 1) que permite la unión de DNMT1 con el represor transcripcional DMAP1 y con la desacetilasa de histonas HDAC2 (Rountree *et al.*, 2000); un dominio RFTS (Replication foci targeting sequence)

específico de la DNMT1 que dirige a la enzima hacia los focos de replicación y con ello promueve el mantenimiento de la metilación posreplicativa (Leonhardt *et al.*, 1992); un dominio CXXC de la familia de dedos de zinc que contiene ocho residuos de cisteína altamente conservados y que media su unión con dinucleótidos CpG no metilados (Song *et al.*, 2011); y por último contiene dos dominios BAH (bromo-adjacent homology) necesarios en el plegamiento de la proteína y potencialmente de unión a la cromatina (Jeltsch & Jurkowska, 2016). Los subdominios cambian en las DNMT3s que incluyen un dominio PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) que permite la interacción proteína-proteína entre las DNMT3s y las histonas H3 trimetiladas en la lisina 36, H3K36me3 (cromatina activa)(Maurer-Stroh *et al.*, 2003), también puede servir de interacción con otras proteínas como factores de transcripción; y, tienen un dominio ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) importante para las interacciones con la cromatina ya que permite la interacción de las DNMT3s con las histona H3 que están desmetiladas en la lisina 4 (marca de cromatina activa) (Lyko, 2018); La DNMT3L carece de la región N-terminal y parte de la parte C-terminal. La DNMT2, una proteína relativamente pequeña, contiene solo el dominio de DNA metiltransferasa y su función es poco clara (Lyko, 2018).

Para producir la actividad enzimática de metiltransferasa las DNMTs tienen seis motivos altamente conservados en el extremo C-terminal (I, IV, VI VIII, IX, X) usan la molécula S-adenosil-L-metionina (SAM) como donadora de grupos metilo y un mecanismo de volteo de base (*base-flipping*) que rota la base nitrogenada blanco hacia dentro del centro catalítico de la enzima (Klimasauskas *et al.*, 1994). La reacción de metilación inicia cuando un residuo conservado de cisteína en el motivo IV (motivo PCQ) media un ataque nucleofílico sobre el C6 de la citosina, este ataque es facilitado por la protonación del N3 de la citosina por un residuo conservado de ácido glutámico del motivo VI (motivo ENV) de la enzima que participa en la eversión de la citosina blanco de la doble hélice del DNA hacia dentro del sitio activo de la enzima; la desprotonación del N3 activa la posición C5, llevando a un segundo ataque nucleofílico, esta vez sobre el grupo metilo que acarrea SAM, seguido de una desprotonación del C5 que libera a la enzima, dejando como producto una 5-metilcitosina (5mC) y S-adenosil-homocisteína (SAH) (Chédin, 2011) (Figura 5B).



**Figura 5.** Dominios estructurales y reacción de metiltransferasa de las DNMTs. a) Estructura de las diferentes DNMTs en donde se observan los dominios de unión a proteína y reguladores en las regiones N-terminal, y los seis motivos altamente conservados que confieren la actividad de metiltransferasa; b) reacción de metiltransferasa sobre las citosinas usando S-adenosil-L-metionina como donador de grupos metilo.

### 1.3.3 Regulación de las DNMTs

Hoy en día no se comprende completamente cómo funciona la regulación transcripcional y postranscripcional de las DNMTs. Sin embargo, la más estudiada ha sido la DNMT1 cuya transcripción se activa por factores de transcripción como JUN/FOS (AP-1), E2F y Sp1, cuyas vías de señalización río arriba de estos factores permanece poco elucidado (Rouleau *et al.*, 1995; McCabe *et al.*, 2005). Mientras que la DNMT3A y la DNMT3B son transcripcionalmente activada por los factores de transcripción Sp1 y Sp3 (Jinawath *et al.*, 2005).

Otra forma de regulación de las DNMTs ocurre de forma postranscripcional a través de miRNAs, como el miR-29b, el miR-29c y el miR148 que se alinean directamente al 3'-UTR de los mRNAs de DNMT3A y DNMT3B provocando una regulación a la baja y con ello causando

hipometilación global del DNA (Duursma *et al.*, 2008; Garzon *et al.*, 2009; Takada *et al.*, 2009). Estudios *in vitro* han demostrado que tanto DNMT3A como DNMT3B son capaces de formar complejos proteína-RNA, por ejemplo: se encontró que DNMT3A interactúa con RNA cortos no codificantes (sncRNAs) (Weinberg *et al.*, 2006) y con RNA largos no codificantes (lncRNAs) que se unen a su dominio catalítico provocando su inhibición (Holz-Schietinger & Reich, 2012); por su parte DNMT3B puede reconocer específicamente al ncRNA asociado a promotor (pRNA) formando un triplex DNA:RNA silenciando la expresión de genes ribosomales (Schmitz *et al.*, 2010).

Una forma de regulación ampliamente reconocida sobre las proteínas es a través de modificaciones postraduccionales. Se ha demostrado que las DNMTs se puede modificar alterando su actividad y estabilidad, siendo la DNMT1 la más estudiada, se ha demostrado que la metilación en sobre la K142 la vuelve menos estable y parece ser un marcador de ubiquitinación para su degradación proteosomal mientras que su fosforilación vía AKT en la S143 aumenta su vida media; la sumoilación por Ubc9 y SUMO-1 parecen aumentar su unión al DNA, lo que hipotéticamente intensificaría su actividad (Morey-Kinney & Pradhan, 2011). Los estudios sobre las modificaciones para DNMT3A y DNMT3B han sido pocos, sin embargo, en estudios independientes se demostró que ambas pueden ser sumoiladas por SUMO-1 inhibiendo su habilidad para interactuar con desacetilasas de histonas (Ling *et al.*, 2004)

#### **1.3.4 Interacción de DNMT3s con factores de transcripción**

Hoy en día se desconoce cómo las DNMT3s reconocen el DNA para metilarlo de manera diferencial, algunas investigaciones han observado secuencias consenso sobre las que actúan las DNMT3s; como la secuencia (T/A/C)(A/T) (T/G/A)**CG**(T/G/C)G(G/C/A) sobre la que actúa la DNMT3A y la secuencia (A/C)(C/G/A)(A/G)**CGT**(C/G)(A/G) sobre la que actúa la DNMT3B. Aunque estas secuencias tienen baja especificidad debido al gran número de posibilidades en la combinación de bases, siendo más restrictiva la secuencia consenso de la DNMT3B con 48 posibilidades contra las 162 posibilidades de la DNMT3A (Lin *et al.*, 2002; Oka *et al.*, 2006; Hervouet *et al.*, 2009).

En la búsqueda por determinar cómo las DNMTs direccionan la metilación se ha propuesto que deben existir interacciones entre las DNMTs y los factores de la transcripción, de tal manera que estos últimos puedan dirigir a las DNMTs sobre sitios específicos en regiones promotoras de los genes para metilar y por ende provocar su represión transcripcional (Hervouet *et al.*, 2009). Una de las primeras evidencias de que existía un proceso de interacción directa ocurrió en 2002 cuando se encontró que la DNMT3a se recluta al promotor RAR $\beta$ 2 por el factor de transcripción oncogénico PML-RAR (Di Croce *et al.*, 2002). En 2005 Brenner *et al.*, reportaron un silenciamiento transcripcional específico de p21 vía metilación dirigida por Myc; en el mismo año Wang *et al.*, observaron que la DNMT3a recluta a p53 reprimiendo la transactivación de p21 (Brenner *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). En 2009, Hervouet *et al.*, encontraron que 79 factores de transcripción conocidos interactúan directamente con las DNMT3s actuando como potenciales “anclas” de unión al DNA para que las DNMT3s catabolizan la metilación sitio-específica en regiones promotoras. La DNMT3A tiene una interacción fuerte con 55 factores de transcripción entre los que se encuentran AES, ATF2 y 4, CREB1 y L2, E2F5, ER- $\beta$ , FOSB, FOSL1, GATA1, HOXA5, JUN, JUNB, MECP2, NF $\kappa$ B-p50, p53, PAX5, v-myc y YY1. Por otra parte la DNMT3B tiene una interacción fuerte con 27 factores de transcripción como AES, ATF2 y 4, CREB1 y L2, E2F5, ER- $\beta$ , FOSB, ETS1, HOXA5, HAND1 y 2, MECP2 y YY1 (Hervouet *et al.*, 2009). Con esto podemos inferir que los factores de transcripción son jugadores integrales de la maquinaria de metilación del DNA, sin olvidar, que los patrones de expresión de algunos factores de transcripción pueden limitar su papel sobre la metilación en tejidos específicos.

### **1.3.5 DNMT3s en el SNC**

La expresión de las DNMTs es crucial durante desarrollo, siendo particularmente importante el caso de las DNMTs *de novo* (3A y 3B) que son responsables de la creación de los patrones de metilación en los estadios tempranos de la embriogénesis. A medida que progresa el desarrollo, ambos genes sufren represión tejido-específica y de tal manera que su expresión se vuelve casi indetectable pasada la gestación, con excepción del bazo, timo y el cerebro (Okano *et al.*, 1999). En el cerebro, expresión o actividad enzimática de las DNMTs está sujeta a regulación bajo condiciones fisiológicas y/o patológicas, en donde las DNMTs *de novo*

podieran regular la actividad neuronal normal. Miller y Sweatt en 2007, demostraron que la metilación del DNA es transitoria y plástica, al observar un aumento en la expresión de las DNMTs *de novo* (DNMT3A y DNMT3B) en el hipocampo de ratas expuestas a paradigmas conductuales (Miller & Sweatt, 2007), de esta manera se abrió paso al estudio de las DNMTs *de novo* en procesos superiores como el aprendizaje, memoria y plasticidad (Rudenko & Tsai, 2014). En este contexto, la metilación en respuesta a estímulos ambientales parece ser incluso más importante para la función celular normal y no solo patológica como se ha estudiado la metilación en las últimas décadas (Wu & Zhang, 2010).

#### **1.4 Antecedentes directos: Señalización acoplada a la posible regulación epigenética de la expresión del transportador de Glutamato GLAST en células gliales**

Las CGB de pollo son un excelente modelo en el cual se pueden analizar las interacciones glía-neurona; en primera instancia las CGB expresan un repertorio de receptores de Glu tanto ionotrópicos como metabotrópicos, así como transportadores de Glu que cambian como resultado de la estimulación glutamatérgica (López-Bayghen *et al.*, 2007).

Se ha documentado que el Glu regula la actividad de GLAST/EAAT1 en las CGB, principalmente su translocación a la membrana de una forma independiente de receptor, y dependiente de la proteína cinasa C (PKC) (González & Ortega, 2000). Esto se corrobora al exponer a las CGB de forma prolongada al activador de PKC, 12-tetradecanoil-13-acetato (TPA), resultando en una disminución en los niveles del mRNA de GLAST lo que sugiere una regulación a nivel transcripcional ya que la vida media del mRNA de GLAST no se afecta (Espinoza-Rojo *et al.*, 2000). Además, al evaluar la actividad del promotor *chGLAST* tras la exposición a Glu, se detecta una disminución en la actividad del promotor dependiente de PKC, un evento mediado a través de receptores AMPA permeables a  $Ca^{2+}$  (López-Bayghen *et al.*, 2003).

La activación de receptores AMPA en las CGB resulta en la activación de PKC (Cid & Ortega, 1993); y PKC $\alpha$  es la principal isoforma que participa en dicha señalización. Esta pertenece al subtipo clásico que se activa por esteroides de forbol y es dependiente de  $Ca^{2+}$ , y mimetiza el efecto del Glu al sobreexpresarse (López-Bayghen & Ortega, 2004).

Se ha mapeado un elemento responsivo a Glu en la región promotora de GLAST que contiene un sitio de unión para el factor de transcripción Yin Yang 1 (YY1), en CGB de pollo se ha

observado un aumento en la unión de YY1 al DNA dependiente de la dosis y el tiempo cuando se expone a Glu. Además, la sobreexpresión de YY1 lleva a una reducción sustancial de la actividad de captura de neurotransmisor mediado por GLAST y una disminución importante en los niveles de su mRNA, todo asociado con una represión transcripcional al observar la disminución de la actividad del promotor con un gen reportero (Rosas *et al.*, 2007). Se ha observado que la exposición aguda a Glu induce una regulación a la baja a largo plazo sobre la actividad de captura de GLAST/EAAT1 en CGB (Martínez *et al.*, 2014), por lo que la regulación negativa de GLAST puede mantenerse de forma estable. Sin embargo, se desconocen los mecanismos de la regulación transcripcional negativa mediada por YY1 sobre el promotor de GLAST.

YY1 es una proteína nuclear multifuncional que puede actuar como represor o activador transcripcional, de ahí su denominación *Yin* por represión y *Yang* por activación (Shi *et al.*, 1997). YY1 contiene cuatro dedos de zinc tipo C2H2 en su extremo C-terminal, que son responsable del reconocimiento de la secuencia de unión específica al DNA: 5'-(C/g/a)(G/t)(C/t/a)CATN(T/a)(T/g/c)-3', mientras que en el extremo N-terminal tiene dominios de activación (Hyde-DeRuyscher *et al.*, 1995).

Se ha descrito que los insultos excitotóxicos cambian los complejos YY1-DNA en cultivos primarios de neuronas de hipocampo o neuronas cerebelares sugiriendo que YY1 puede ser un blanco nuclear de vías de señalización activadas en procesos neurodegenerativos (Korhonen *et al.*, 1997). Al ser miembro de la familia de proteínas del grupo Polycomb, el reclutamiento de YY1 es dependiente de la modificación de proteínas histonas; por ejemplo, la marca represiva H3K27me3, una modificación mediada por complejos represivos Polycomb1/2 que contienen a la metiltransferasa de histonas EZH2, la cual interactúa con las DNMTs, pudiendo resultar a una metilación *de novo* en los genes aledaños (Viré *et al.*, 2005). Varios estudios sugieren que las funciones tanto de DNMT3A como de DNMT3B están integradas con modificaciones en la cromatina, particularmente con aquellas mediadas por el grupo de proteínas de la familia Polycomb (Jin *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010).

## 1.5 Justificación

La exposición del SNC a diversos xenobióticos genera un proceso de excitotoxicidad en el que existe muerte celular inducida por la liberación masiva del aminoácido excitador Glu al espacio extracelular en donde actúa como una potente neurotoxina al hiper-excitar a los receptores de glutamato extra-sinápticos, la remoción rápida y oportuna de Glu excedente se realiza por transportadores de glutamato astrocíticos en donde GLAST/EAAT1 juega un papel principal, sin embargo, se ha observado que el Glu regula su propia remoción de la hendidura sináptica, a través de un proceso mediado por PKC y receptores AMPA permeables a  $Ca^{2+}$ , en donde el factor de transcripción YY1 parece ser el blanco nuclear que regula a la baja la expresión de GLAST/EAAT1 en respuesta a concentraciones excitotóxicas de Glu, y cuya represión puede ser mantenida a largo plazo. Siendo YY1 parte de la familia Polycomb un mecanismo de represión transcripcional de GLAST/EAAT1 puede estar dado por el direccionamiento de DNA metiltransferasas *de novo* hacia el promotor del gen, evento que puede ser totalmente reversible al terminar el insulto, evento totalmente dinámico que juega un papel preponderante en la regulación del transportador GLAST en desordenes neurodegenerativos.

## 1.6 Hipótesis

Las DNMTs *de novo* participan en la regulación de la expresión del transportador GLAST, formando complejos con el factor de transcripción YY1 como parte del complejo proteico represor estimulado por la actividad de la transmisión glutamatérgica.

## 1.7 Objetivos

### 1.7.1 Objetivo General

Evaluar la participación de las DNMTs *de novo* en la regulación de la expresión del transportador GLAST dependiente de YY1 en células gliales

### 1.7.2 Objetivos particulares

- Determinar los niveles de metilación diferenciales que existen tras la estimulación con L-Glu y con su análogo no metabolizable D-Asp
- Evaluar la expresión de GLAST/EAAT1 tras el tratamiento con inhibidores de metilación (5-aza) e inhibidores de HDACs (Valproato)
- Evaluar el efecto de la desmetilación del DNA con 5-Aza sobre la actividad del transportador GLAST
- Determinar la expresión de DNMTs *de novo*, YY1 y Tet1 en células tratadas con L-Glu/D-Asp

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Materiales

El L-Glutamato, el Phorbol 12-miristato 12-acetato (TPA), el ácido valproico (VPA), el ácido dihidrokaínico (DHK) se obtuvieron de Tocris Biosciences (Ellisville, IL, EE. UU.). La 5-aza-2'-desoxicitidina (A3656), el ácido D-aspartico (A8881), la bisindolilmaleimida I (203290) y todos los demás productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El inhibidor de proteasas Complete™ Mini se obtuvo de Roche Diagnostics (Mannheim, DEU). Los anticuerpos Anti-YY1 (c-20) (sc-281), anti-TET1 (4F4) (sc-293186), anti-Laminin a / c (sc20681) se obtuvieron de Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, EE. UU.). Los anticuerpos anti-Dnmt3b (ab2851) y anti-EAAT1 / GLAST (ab416) de Abcam Inc. (Cambridge, Reino Unido). Se adquirieron los anticuerpos anti-TET1 (GTX627420), anti-GADPH (GTX239) y anti-Tubulina (GTX114) de GeneTex (Irvine, CA, EE. UU.). El anticuerpo monoclonal anti-actina fue un generoso regalo del Dr. Manuel Hernández (Cinvestav, Ciudad de México). Los anticuerpos secundarios ligados a peroxidasa de rábano picante y el reactivo de quimioluminiscencia mejorada (ECL), así como los reactivos de cultivo de tejidos, se obtuvieron de GE Healthcare (Carlsbad, CA, EE. UU.) y de Gibco by Life Technologies™ (Carlsbad, CA, EE. UU.). Todos los demás productos químicos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.).

### 2.2 Cultivo primario de células de Glía de Bergmann

Los cultivos primarios de CGB se prepararon a partir de embriones de pollo de 14 días (Avimex, Ciudad de México, México) como se describió y caracterizó previamente (Ortega *et al.*, 1991). Los cerebelos se diseccionaron, se cortaron en trozos pequeños y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C en el medio Puck que contenía tripsina (0.25 mg/mL) y DNasa (0.08 mg/mL) para disociar el tejido. Los medios se eliminaron y se sustituyeron con Opti-MEM que contenía suero bovino fetal al 2.5% (FBS), glutamina 2 mM y gentamicina (50 µg/mL) para realizar la disociación mecánica. Luego, las CGB se recuperaron mediante la eliminación repetida de células disociadas y se diluyeron a una densidad  $1 \times 10^6$  células/mL y se sembraron en placas de cultivo Corning Incorporated Costar (Kennebunk, ME, EE.UU.). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en condiciones estándar (5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad) y se utilizaron entre el 4° y 7° día después del cultivo.

### **2.3 Cultivo de línea celular MIO-M1**

La línea celular MIO-M1 se cultivó como se describió previamente (Limb *et al.*, 2002). En subcultivo, las células se separaron con Trypsina-EDTA 10X (5.0 g/L de tripsina, 2.0 g/L de EDTA y 8.5 g/L de NaCl). Después de la eliminación del medio de cultivo, se añadió 0.05% de tripsina-EDTA, las células se incubaron a 37° C durante 2-3 minutos hasta que las células se separaron sin perder características adherentes. La reacción se detuvo con 10% de suero fetal bovino en DMEM. Las células se separaron mediante pipeteo, se recogieron en un tubo cónico de 15 mL, se centrifugaron a baja velocidad y se descargó el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en DMEM suplementado con FBS al 10%, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL. Las células se tiñeron con azul de tripano y se contaron las células vivas por microscopía óptica de contraste de fases en una cámara de Neubauer. La viabilidad se expresó como porcentaje de células vivas con referencia al número total de células. Las células se sembraron en placas Corning Incorporated Costar (Kennebunk, ME, EE.UU.) de 6 pozos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pozo, en placas de cultivo p60 a  $1 \times 10^9$  células/placa o en placas de 24 pozos a 250 000-500 000 células/pozo y se incubaron a 37° C hasta alcanzar la confluencia deseada.

### **2.4 SDS-PAGE e Inmunodetección en fase sólida: Western blot**

#### **2.4.1 Principio**

La inmunodetección en fase sólida, también conocida como Western blot, tiene como principio la detección de proteínas específicas en homogenados proteicos complejos. Para ello se requiere separar por peso molecular a las proteínas de la muestra en un gel de poliacrilamida sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE), para después inmovilizar los antígenos sobre una fase sólida (membrana de nitrocelulosa) y exponer a anticuerpos específicos de la proteína buscada, la unión antígeno-anticuerpo se detecta usando un segundo anticuerpo acoplado a un marcador quimioluminiscente.

#### **2.4.2 Procedimiento**

Las monocapas confluentes tratadas previamente se cosecharon con solución salina tamponada con fosfato (PBS) ( $K_2HPO_4$  /  $KH_2PO_4$  10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) que contenía inhibidores de fosfatasas y proteasas (NaF 10 mM,  $Na_2MoO_4$  1 mM y  $Na_3VO_4$  1 mM,

fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM). La extracción total de proteínas se realizó con tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, 1 mg/mL de aprotinina, 1 mg/mL de leupeptina, 1% NP-40, 0.25% de desoxicolato de sodio, 10 NaF mM,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  1 mM y  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, pH 7.4). La extracción de proteína citoplasmática se realizó con tampón A (HEPES 10 mM, pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  completos) seguido de extracción de proteína nuclear usando tampón C (HEPES 20 mM, pH 7.9, NaCl 0.4 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM y 40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de Complete™). Los lisados celulares se desnaturalizaron en el tampón de muestra de Laemmli, y se separó la misma cantidad de proteínas (aproximadamente 70  $\mu\text{g}$  según lo determinado por el método de Bradford) en geles de SDS-PAGE en gradiente (6-12%) y electroblotados en membranas de nitrocelulosa. Las membranas se tiñeron con solución de Ponceau S para confirmar la transferencia y que el contenido de proteína era igual en todos los carriles. Las membranas se empaparon en PBS para eliminar el Ponceau S y se incubaron en TBS que contenía leche desnatada y deshidratada al 5% y Tween 20 al 0.1% durante 2 horas para bloquear el exceso de sitios de unión a proteínas no específicas. Las membranas fueron incubadas durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios como se indica en cada figura, seguido de la respectiva incubación de anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente. Los polipéptidos inmunorreactivos se detectaron por quimioluminiscencia con un dispositivo de imagen acoplado a carga (CCD) MicroChemi (DNR Bio-imaging System) (DNR; MahaleHaHamisha, Jerusalén, Israel). Los análisis de densitometría se realizaron con la aplicación Image J64 (NIH; Bethesda, Maryland, EE. UU.) Y los datos se analizaron con Prism 5, GraphPad Software (San Diego, CA, EE. UU.).

## **2.5 Obtención de DNA genómico**

### **2.5.1 Principio**

Obtener la mayor cantidad de DNA genómico totalmente puro, a partir de una pastilla de células. En la primera etapa, las células se deben lisar con detergentes y sales caotrópicas, enseguida comienza la digestión de proteínas y RNA, y continua con la separación de lípidos y proteínas con solventes orgánicos como el fenol, cloroformo y alcohol isoamílico. La extracción del DNA se logra gracias a las características fisicoquímicas de las moléculas de

DNA, los grupos fosfato le confieren una carga neta negativa lo que lo hace altamente polar, permitiendo disolver el DNA en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. En presencia de etanol, se rompe la capa hidratante quedando expuestos los grupos fosfato, bajo estas condiciones se favorece la unión con cationes como  $\text{Na}^+$  que reducen las fuerzas repulsivas entre las cadenas de nucleótidos y permiten que el DNA precipite. El DNA desala y se rehidrata, obteniendo DNA con una pureza óptima (Relación A260/280 1.8-2.0 y relación A260/230 1.8-2.2) y altamente concentrado.

### **2.5.2 Procedimiento**

El DNA genómico (DNAg) se extrajo utilizando el kit de purificación de DNA genómico Wizard® (Promega; Madison, WI, EE. UU.) De acuerdo con las instrucciones del fabricante: Las pastillas de células fueron lavadas con PBS, se centrifugó y descartó el PBS, para añadir 600  $\mu\text{L}$  de solución de Lisis Nuclear, después se añadieron 3.8  $\mu\text{L}$  de proteinasa K mezclando con pipeteo ligero, se incubó por 20 min a 65 °C. Después se añadieron 3  $\mu\text{L}$  de solución con RNAsas mezclando por inversión de 2 a 5 veces, se incubó por 20 min a 37 °C, después se dejó atemperar por 5 min a temperatura ambiente, para añadir 200  $\mu\text{L}$  de Solución de Precipitación de Proteínas agitando con vortex a alta velocidad por 20 seg seguido de una incubación en hielo por 5 min, después se centrifugó a 14 000 rpm durante 6 min. Las proteínas precipitadas forman una pastilla blanca, se transfirió el sobrenadante a otro tubo de 1.5 mL nuevo y estéril, se añadió 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló por inversión de 2 a 5 veces, se centrifugó a 14 000 rpm durante 5 min, en este paso el DNA se precipitará y formará una pastilla, se deshecho el sobrenadante y se añadieron 600  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% a temperatura ambiente, agitando con vortex ligero por 5 seg, se repite el paso de centrifugado y se aspira el etanol dejando el pellet seco, se rehidrató el DNA con 30 a 50  $\mu\text{L}$  de solución de Rehidratación. La calidad y la concentración de las muestras se evaluaron utilizando el espectrofotómetro Epoch (Bio-Tek, EE. UU.). Para evaluar la integridad del DNA se separó en geles de agarosa al 1.5%.

## **2.6 Cuantificación de DNA metilado**

### **2.6.1 Principio**

El kit de cuantificación de DNA metilado (Ab117128) (Cambridge, Reino Unido) contiene todos los reactivos necesarios para la cuantificación global del DNA metilado. En este ensayo, el DNA problema se une a una serie de pozos en tiras que son especiales para tener alta afinidad por el DNA. La fracción del DNA metilado es detectada usando anticuerpos de captura y detección y después es cuantificado colorimétricamente al leer la absorbancia en espectrofotómetro de microplacas, la cantidad de DNA metilado es proporcional a la densidad óptica (D.O.).

### **2.6.2 Procedimiento**

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron 80  $\mu\text{L}$  de la Solución de unión a cada pozo, luego se añadió un 1  $\mu\text{L}$  del control negativo, 1  $\mu\text{L}$  del control positivo diluido a una concentración de 5  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y 100  $\text{ng}$  de DNAG por reacción en un volumen final de 2  $\mu\text{L}$ . Se taparon los pozos utilizados con Parafilm M y se incubaron durante 90 min a 37 °C. Se desechó la solución de unión y se enjuagó tres veces cada pozo con 150  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado. Posteriormente, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de captura diluido (1:1000) en cada pozo, y se incubó a temperatura ambiente por 60 min, se desecha la solución con anticuerpo de captura de cada pozo y se lavaron tres veces con 150  $\mu\text{L}$  de tampón de lavado. Seguido, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de detección diluido (1:2000) en cada pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, se repitió el proceso de lavados de cada pozo, para enseguida, añadir 50  $\mu\text{L}$  de Solución potenciadora diluida (1:5000), incubando a temperatura ambiente durante 30 min, repitiendo el proceso de lavados 5 veces. A continuación, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de Solución desarrolladora a cada pozo, incubando a temperatura ambiente durante 1 a 10 min cubriendo de la luz, en este paso comienza a observarse una coloración azul que dependerá de la concentración de DNA metilado en cada muestra. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de Solución de paro a cada pozo para detener la reacción enzimática cuando el color del control positivo se tornó azul medio. El color azul, se torna amarillo una vez añadida la solución de paro y se leyeron los pozos en un lector de microplacas a 450 nm dentro de los primeros 2 a 15 min después de parar la reacción. Para determinar el estado relativo de metilación (porcentaje de 5 mC en el ADN total) en nuestras muestras, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% 5 - mC = \left( \frac{\frac{DO \text{ Muestra} - DO \text{ Control negativo}}{S}}{\frac{(DO \text{ Control positivo} - DO \text{ Control negativo}) \times 2^*}{P}} \right) \times 100\%$$

Donde: S- Cantidad de muestra de entrada de ADN en ng; P-Cantidad de control positivo de entrada en ng; 2 es un factor para normalizar 5-mC en el control positivo al 100%, ya que el control positivo contiene solo el 50% de 5-mC

## **2.7 Extracción de RNA y ensayo RT-qPCR**

### **2.7.1 Principio**

La extracción de RNA total usando el reactivo TRIzol (Invitrogen; Carlsbad, CA, EE. UU.) se fundamenta en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina que permite la obtención de moléculas de RNA de tamaño variado. El reactivo TRIzol mantiene la integridad del RNA al inhibir eficientemente la actividad de RNAsa al momento de romper y homogenizar las células. Se utiliza cloroformo para separar una fase acuosa, que contiene el RNA, una fase intermedia, y una fase inferior orgánica de color rosa, que contiene el DNA y proteínas. El RNA se precipita de la fase acuosa utilizando isopropanol, obteniendo una buena cantidad y calidad de RNA.

La extracción del RNA es la etapa previa para identificar un transcrito (mRNA) de interés y cuantificar sus niveles de expresión. Para determinar esto, se realiza una reacción de transcripción reversa (RT) para obtener el cDNA y posteriormente amplificar el transcrito deseado utilizando cebadores específicos a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, en esta se combina la amplificación y la detección en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia.

### **2.7.2 Procedimiento**

Se extrajo RNA total de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se determinaron las concentraciones de RNA mediante espectrofotometría con Nano-Drop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los niveles de mRNA se analizaron usando el kit KAPA SYBR FAST One-Step (KapaBiosystem; Boston, MA, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. Las condiciones de la transcripción reversa y amplificación fueron 37°C durante 30 s, 42 °C

durante 5 min y 95 °C durante 5 min, seguidos de 40 ciclos de amplificación: 5 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C; melt curve: 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C y 15 s a 95 °C. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City, California, EE. UU.). Los datos se normalizaron con GAPDH como control interno y la expresión relativa se calculó usando el método  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . Las secuencias de cebadores (primers) fueron: DNMT1 sentido GGTTCTTCCTCCTGGAGAATG, DNMT1 antisentido GTCTGGGCCACGCCGACTG; DNMT3A sentido GGTGCTGTCTCTTTGATG, DNMT3A antisentido ATGCTTCTGTGTGACGCTG; DNMT3B sentido ACCACCTGCTGAATTACTCACG, DNMT3B antisentido GATGGCATCAATCATCACTGG; and GAPDH sentido CCGGGAAACTGTGGCGTGATGG, GAPDH antisentido AGGTGGAGGAGTGGGTGTCGCTGT.

## **2.8 Ensayos de captura de [<sup>3</sup>H]-D-aspartato**

### **2.8.1 Principio**

Los ensayos de captura de radioligandos son procedimientos analíticos que se basan en la internalización de un ligando radiactivo al interior de las células expuestas por determinado tiempo, esto dependerá de la unión específica del ligando hacia su diana molecular en la membrana celular la cual idealmente debe tener alta afinidad por el ligando, baja unión no específica, alta especificidad, y alta actividad específica para detectar bajas densidades de transportadores. Los niveles de radiactividad de un radioligando (por mol) se denomina actividad específica, que se mide en Ci/mmol y que están determinadas por el fabricante dependiendo del stock. Una vez terminado el ensayo, se lavan y lisan las células, cuantificando la proteína total y analizando la radiactividad en un contador de centelleo. A través de una fórmula se relacionan, los niveles de radiactividad internalizados, de proteína total, del tiempo de captura, y de la actividad específica del radioligando, arrojando la cantidad exacta de radioligando internalizado ajustado con la concentración de proteína y tiempo. La cantidad de radioligando internalizado dependerá de la actividad y cantidad del transportador en la membrana.

### **2.8.2 Procedimiento**

Los ensayos de captura de D-Aspartato se llevaron a cabo como se describió anteriormente (Ruiz y Ortega 1995). Las monocapas cultivadas en placas de 24 pozos se trataron bajo

diferentes estímulos (indicados en las figuras) en los períodos de tiempo indicados. Todos los tratamientos se realizaron en DMEM suplementado. Una vez finalizados los tratamientos, las monocapas cultivadas se lavaron dos veces con solución de ensayo a 37 °C (solución tamponada con HEPES 25 mM, NaCl 130 mM, KCl 5.4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.8 mM, glucosa 33.3 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, pH 7.4) y se incubaron con tampón de absorción a 37 °C que contiene 0.4 µCi/mL de [<sup>3</sup>H] -d-aspartato ([<sup>3</sup>H] -d-Asp) (actividad específica: 16.5 Ci/mmol, Perkin Elmer, MA, EE. UU.). Se utilizó D-Asp (análogo del Glu) que usa el mismo sistema transportador que el Glu y que tiene la ventaja de no ser metabolizable. La captura se terminó después de 30 minutos de incubación y las monocapas se lavaron con solución de ensayo fría; las células se lisaron con NaOH 0.1 N incubando durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación vigorosa. La concentración de proteínas en los lisados se determinó con el ensayo de proteínas Bradford (Bio-Rad, CA, EE. UU.). Cada lisado se transfirió a viales de centelleo con un líquido de centelleo y 50 µL de ácido acético glacial. Se cuantificó la radiactividad en un contador PerkinElmer Tri-Carb 2810TR (PerkinElmer, MA, EE. UU.). Los recuentos de radiactividad se corrigieron con los niveles de proteína y se calcularon como [<sup>3</sup>H] -d-Asp pmol/mg de proteína/min). Los experimentos se realizaron por cuadruplicado en tres a cuatro cultivos independientes.

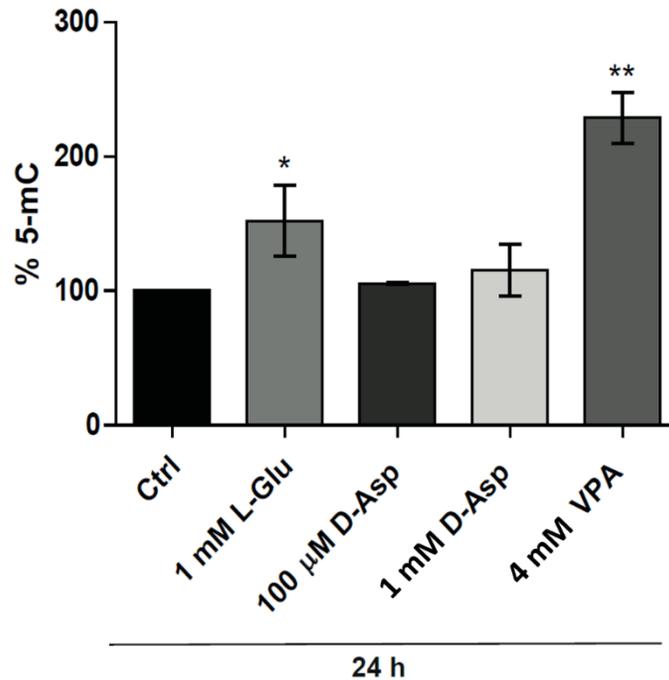
## **2.9 Análisis Estadístico**

Todos los datos se evaluaron primero con la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos tenían una distribución normal. Si los datos se distribuyeron normalmente, se utilizó una prueba ANOVA unidireccional en el análisis estadístico. Si los datos no se distribuyeron normalmente, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Cuando estos análisis indicaron significancia, se utilizó una prueba *post hoc* de Dunnett, Bonferroni o Dunn. Se utilizó el software Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, California, EE. UU.) Los datos se presentan como media ± desviación estándar (D.E.). En todos los casos, un valor de p inferior a 0.05 se consideró estadísticamente significativo.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Metilación del DNA dependiente de glutamato en células de glía de Bergmann (CGB)

Con la finalidad de determinar los niveles de metilación del DNA en las CGB tras la estimulación con Glu y con su análogo no metabolizable el D-Asp, expusimos monocapas confluentes de CGB a ambos aminoácidos durante 24 horas como se muestra en la Figura 7.



**Figura 6.** La exposición a L-Glutamato aumenta la metilación del DNA en las CGB. Se cuantificó el nivel de 5 metilcitosinas (5-mC) en CGB tratadas con L-Glutamato (L-Glu), D-Aspartato (D-Asp) y ácido valproico (VPA) durante 24 horas. El gráfico representa las medias  $\pm$  desviación estándar (D.E.), de tres experimentos independientes, analizadas por Anova de una vía y comparación múltiple de Dunnet donde \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.001$ .

La concentración de Glu utilizada fue 1 mM, pues a esta concentración, nuestro grupo de trabajo ha observado cambios significativos en la actividad y expresión de GLAST (González & Ortega, 2000; Rosas *et al.*, 2007). Además, las CGB expresan mayoritariamente iGluRs los cuales se desensibilizan rápido, al utilizar concentraciones saturantes del Glu (1mM) garantizamos su activación. Observamos que la metilación del DNA en las CGB aumenta significativamente respecto al control cuando se expone a Glu 1mM. Abriendo la posibilidad

de la participación de la metilación del DNA en la regulación génica de las CGB expuestas a Glu.

También, se evaluó el efecto de dos concentraciones de D-Asp (un saturante 1 mM y otra cercana a la constante de afinidad de GLAST, 100  $\mu$ M) en la metilación global del DNA en CGB, en donde no se observó un cambio respecto al control. Este hecho sugiere que el efecto del Glu sobre la metilación del DNA es una respuesta mediada por receptores, ya que el D-Asp no tiene la capacidad de activar receptores, pero si transportadores.

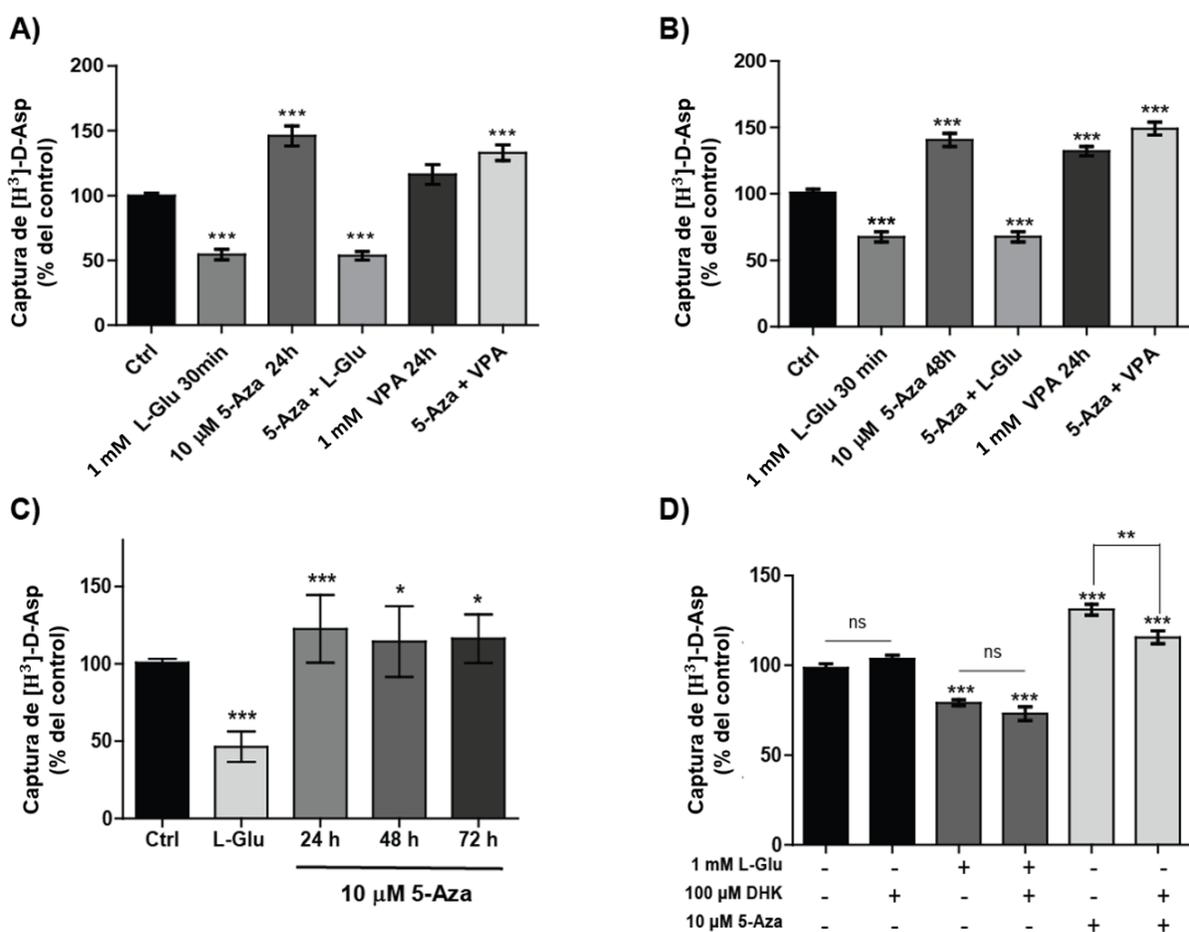
Para determinar si la metilación global del DNA era un evento mediado por el estímulo directo del Glu sobre estas células, o bien, si dependía de la actividad del transportador GLAST, utilizamos ácido valproico (VPA) como un control positivo de la actividad del transportador, ya que el VPA aumenta la actividad GLAST en dos niveles diferentes, un aumento en la disponibilidad de transportadores en la membrana plasmática y un aumento de la transcripción de *chglast* (Aguirre *et al.*, 2008). La exposición a 4 mM VPA resultó en un aumento en el porcentaje de 5-mC.

### **3.2 La hipometilación del DNA aumenta la actividad de los transportadores de glutamato en CGB**

Una vez determinado que el Glu aumenta la metilación global del DNA en las CGB, decidimos explorar la actividad del transportador GLAST en un escenario hipometilante. Para ello, tratamos a las CGB con el nucleósido hipometilante, la 5-Aza-desoxicitidina (5-Aza). Observamos que la exposición a 10  $\mu$ M de 5-Aza durante 24 y 48 horas aumentan la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Asp, evento que es sensible al efecto de la exposición a 1 mM de Glu durante 30 min que reduce dicha captura (Figura 7A y 7B). Por su parte, el aumento en la captura de [<sup>3</sup>H]-D-Asp mediado por el tratamiento con VPA que nuestro grupo previamente caracterizó (Aguirre *et al.*, 2008) es potenciado por 5-Aza, (Figura 7A y 7B), cabe mencionar que el VPA se utilizó como control positivo de la actividad de captura en estas células. Mientras, el efecto del 5-Aza se mantiene hasta 72 horas después (Figura 7C).

Las CGB tienen la característica de expresar únicamente al transportador GLAST (Ruiz & Ortega, 1995), para corroborar que el aumento en la actividad observada en los experimentos

de captura estaba siendo mediada por GLAST, decimos utilizamos al inhibidor no transportable de GLT-1, el ácido dihidrokaínico (Dihidrokainato) (DHK) 100  $\mu$ M para descartar que el transportador glial más abundante estuviera jugando un papel importante en el aumento de la captura de [ $^3$ H]-D-Asp en células tratadas con 5-Aza (Figura 7C), para nuestra sorpresa, observamos una disminución significativa de alrededor del 16% en las células tratadas con 5-Aza + DHK, comparadas con las células tratadas con 5-Aza, sugiriendo que ambos transportadores, GLAST y GLT-1 están siendo regulados a la alza cuando se tienen condiciones de hipometilación.



**Figura 7.** La actividad de GLAST aumenta en condiciones de hipometilación en CGB. A) y B) El estado de hipometilación del DNA promovido por 5-Aza-desoxicitidina (5-Aza) aumenta la captura de [ $^3$ H]-D-aspartato, a las 24 y 48 horas, respectivamente. C) El efecto de 10  $\mu$ M de 5-

Aza se mantiene a largo plazo hasta las 72 horas de tratamiento. D) Tratamientos con 5-Aza 10  $\mu$ M por 24 horas en co-tratamiento con ácido dihidrokaínico (DHK) 100  $\mu$ M durante 30 min. Resultados de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. Las barras representan medias  $\pm$  DE analizadas por ANOVA de una vía con una comparación múltiple de Dunnet, \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$ . En (D) comparamos todos los tratamientos con la comparación múltiple de Bonferroni donde \*\*\*  $P < 0.0001$  y \*\* $p < 0.007$ .

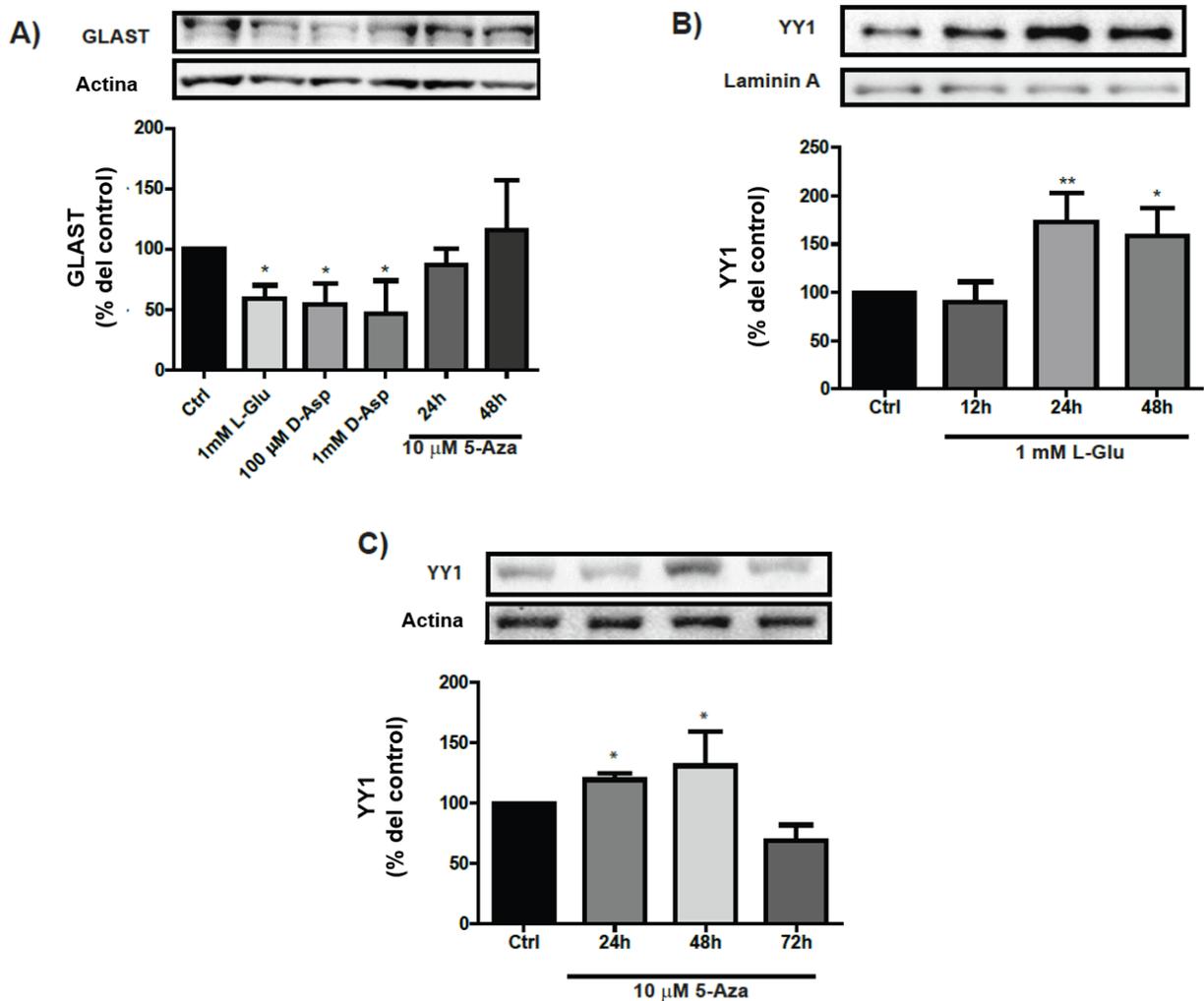
### **3.3 El Glutamato disminuye la expresión de GLAST a través de un evento de metilación modulado por las DNMTs *de novo***

Para determinar si el aumento en la captura de [ $^3$ H]-D-Asp es un evento mediado por el aumento en la cantidad de proteína del transportador GLAST, decidimos evaluar los niveles de proteína de dicho transportador después del tratamiento con 5-Aza (Figura 8A). El tratamiento con 5-Aza hasta las 48 horas, no aumentó los niveles proteicos de GLAST, de manera estadísticamente significativa, aunque observamos una tendencia al aumento en la cantidad de proteína. Los tratamientos con L-Glu, y D-Asp redujeron los niveles de GLAST de forma estadísticamente significativa.

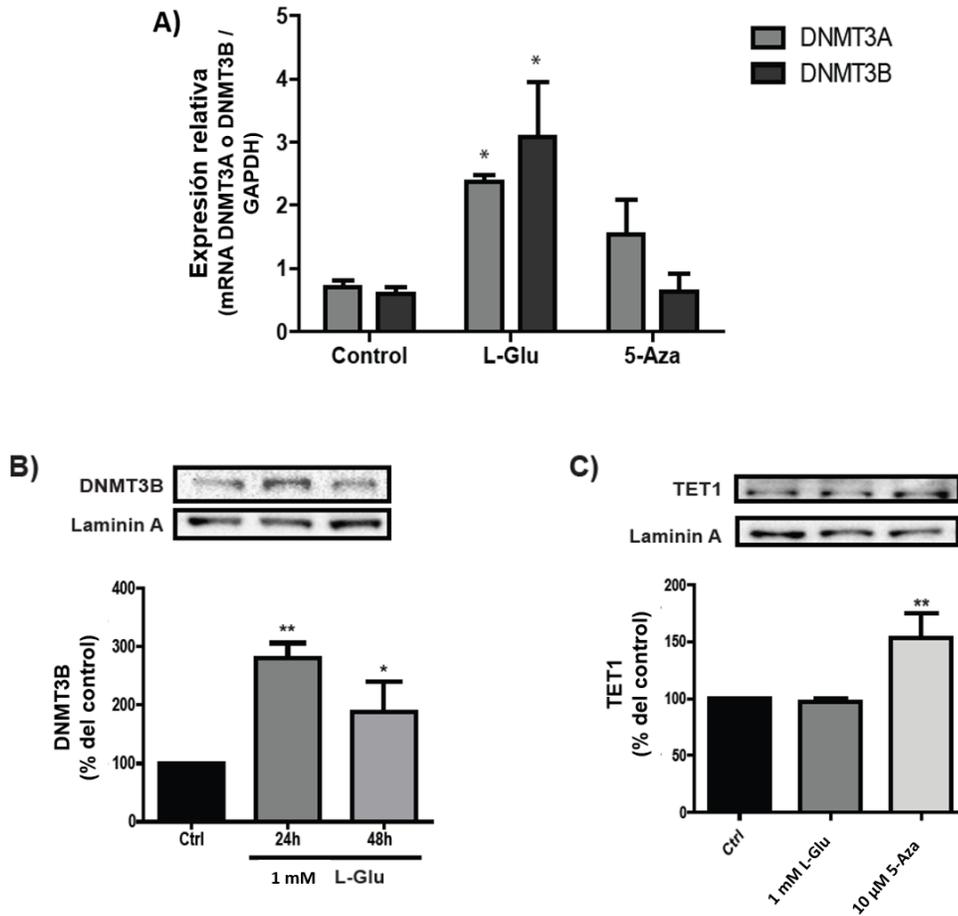
Tomando en consideración que YY1 participa en la regulación transcripcional de *slc1A3* (GLAST) y *slc1A2* (GLT-1), evaluamos el efecto de la exposición a 1mM de Glu durante 12, 24 y 48 horas en los niveles nucleares de YY1. Se observó un aumento en YY1 nuclear después de las 24 horas de tratamiento con Glu y se mantuvo hasta las 48 h (Figura 8B). Cuando se incubaron las CGB con 5-Aza, también se observó un aumento en el contenido de YY1 nuclear a partir de las 24 h de tratamiento (Figura 8C).

Estos resultados abren la posibilidad de que el tratamiento con L-Glutamato pudiera incrementar los niveles o actividad de DNA metiltransferasas, particularmente las DNMTs *de novo*, por ello, evaluamos la expresión del mensajero de estas enzimas a las 24 horas de tratamiento con L-Glu y con 5-Aza (Figura 9A). Encontramos que el RNA mensajero de ambas enzimas aumenta significativamente con el tratamiento con L-Glu, pero particularmente DNMT3B aumentó en mayor proporción, por lo que decidimos evaluar los niveles de proteína de esta. En las células tratadas 1 mM L-Glu durante 24 y 48 horas los niveles de DNMT3B aumentan (Figura 9B). Estos datos sugieren que la represión transcripcional desencadenada

por el tratamiento con Glu, que ya se ha reportado que ejerce YY1 sobre el gen de GLAST *chglast (slc1A3)*, es mediada parcialmente por un proceso de metilación dinámica. En concordancia con esta interpretación, está el hecho de que la exposición a Glu no cambia los niveles de TET1, mientras que con 5-Aza si lo hace (Figura 9C).



**Figura 8.** El estado de metilación del DNA modifica los niveles de proteína de GLAST y YY1. A) Evaluación de los niveles de proteína GLAST en CGB estimuladas con L-Glu y su análogo no metabolizable D-Asp durante 24h y 5-Aza durante 24 y 48 h. B) Los niveles nucleares de YY1 aumentan por exposición a largo plazo con L-Glu 1 mM C) Niveles totales de YY1 en CGB tratadas con 5-Aza en diferentes tiempos. Laminina A y  $\beta$ -actina se usaron como controles de carga para extractos de proteínas nucleares y totales, respectivamente. Resultados de al menos tres experimentos independientes, analizados con la prueba de Kruskal-Wallis y una comparación múltiple de Dunn donde \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.001$ .

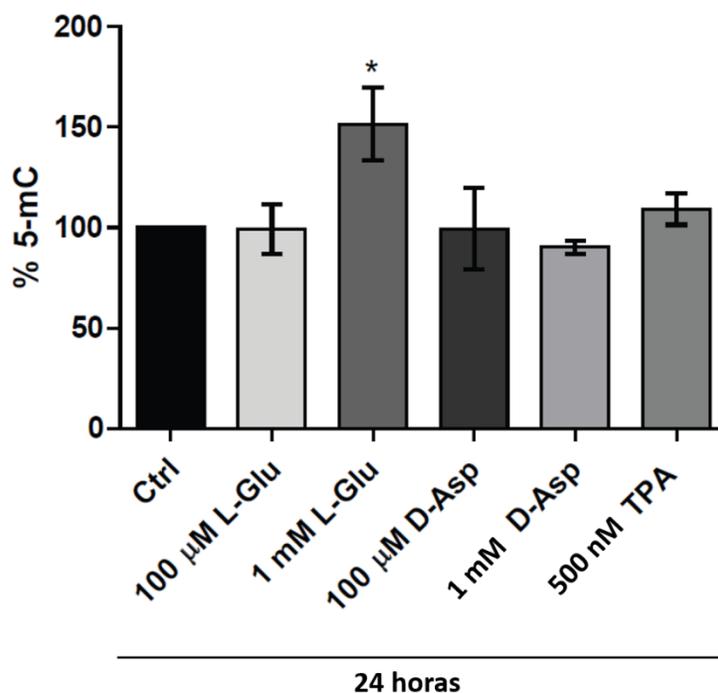


**Figura 9.** El Glutamato modula la expresión de las DNMTs *de novo* en CGB. A) Expresión relativa del mRNA de las DNMTs *de novo* después de 24 horas de tratamiento con L-Glu 1 mM y 5-Aza 10 μM. B) Niveles proteicos de DNMT3B en CGB tratadas por 24 y 48 horas con L-Glu 1mM. C) Niveles proteicos de TET1 en CGB tratadas con L-Glu 1mM y 5-Aza 10 μM durante 24 horas. Las barras representan las medias ± desviación estándar de al menos tres experimentos independientes analizados con la prueba de Kruskal-Wallis y una comparación múltiple de Dunnet donde \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.001$ .

### 3.4 Aumento de la metilación del DNA dependiente de Glutamato en Células MIO-M1

Para explorar la posibilidad de que los resultados hasta aquí descritos sean relevantes en otras especies además de en *Gallus gallus* (nuestro modelo de estudio), decidimos explorar el porcentaje de 5-mC después de la estimulación con Glu, Asp, y TPA en una línea de células de Müller humana derivada de retina, MIO-M1.

Tomando en consideración que estas células son células de glía radial, justo como las CGB y que nosotros y otros grupos de trabajo han demostrado que el Glu desencadena las mismas vías de señalización en ambos cultivos (Martínez-Lozada & Ortega, 2015), no fue sorprendente que pudiéramos detectar un aumento significativo en el porcentaje de 5-mC en células MIO-M1 expuestas a L-Glu 1mM durante 24 horas (Figura 10).

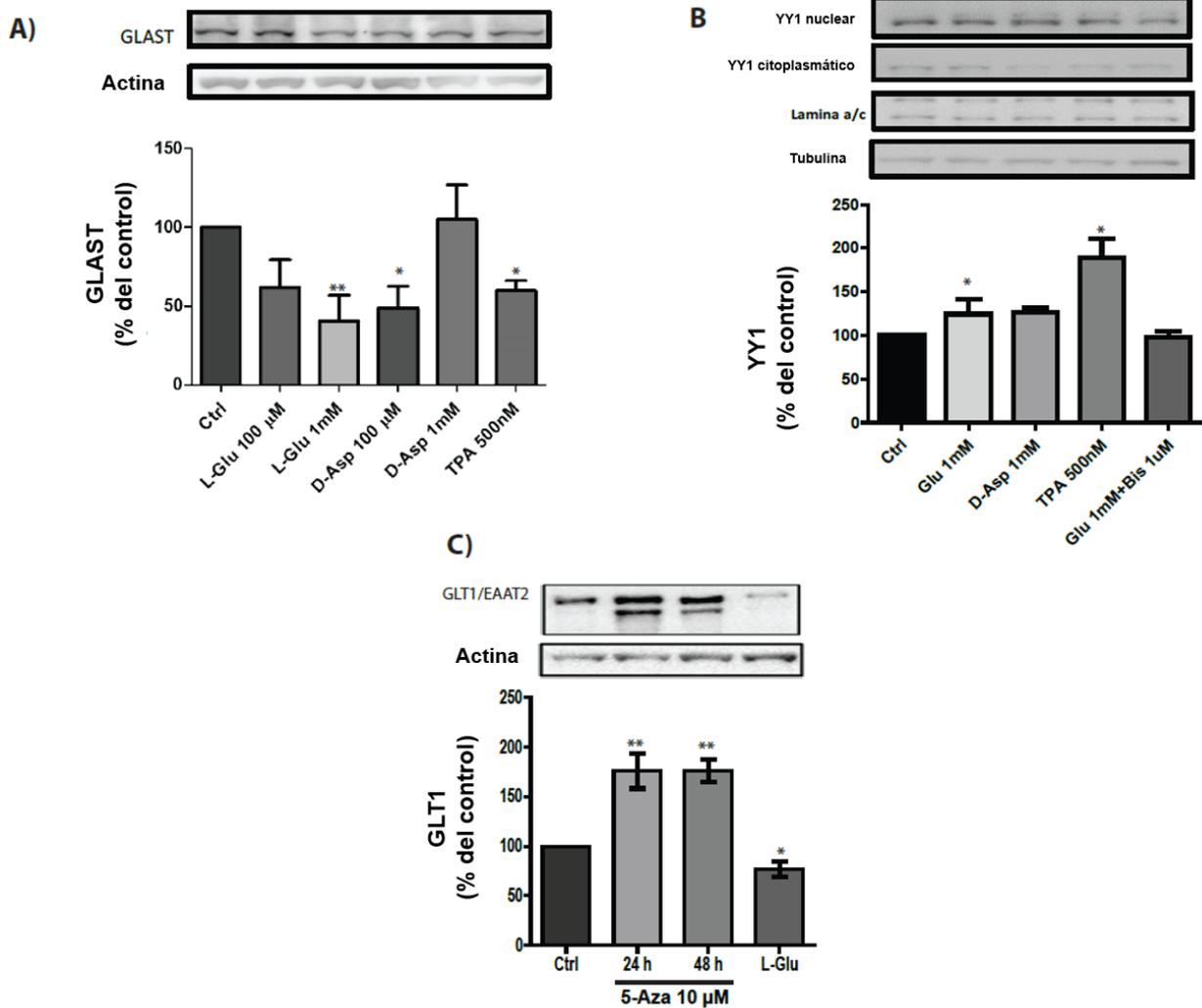


**Figura 10.** Niveles globales de metilación del DNA en células MIO-M1. Las células MIO-M1 fueron tratadas con diferentes estímulos durante 24 horas, usando dos concentraciones de L-Glu y de D-Asp, una saturante (1 mM) y una a niveles cercanos a la Km del transportador GLAST (100 μM). La grafica presenta los cambios en los porcentajes de citosinas metiladas. Los datos son las medias ± desviación estándar (D.E.), de al menos tres experimentos independientes, analizados con Anova de una vía y comparación múltiple de Dunnett, donde \* $p < 0.05$ .

### 3.5 YY1 participa en la represión transcripcional de GLAST en células MIO-M1

Al no estar del todo caracterizada la regulación transcripcional de GLAST en la línea MIO-M1, decidimos evaluar el comportamiento de GLAST en estas células estimuladas con L-Glu o D-Asp. Observamos que, al igual que en las CGB disminuye GLAST, particularmente en el

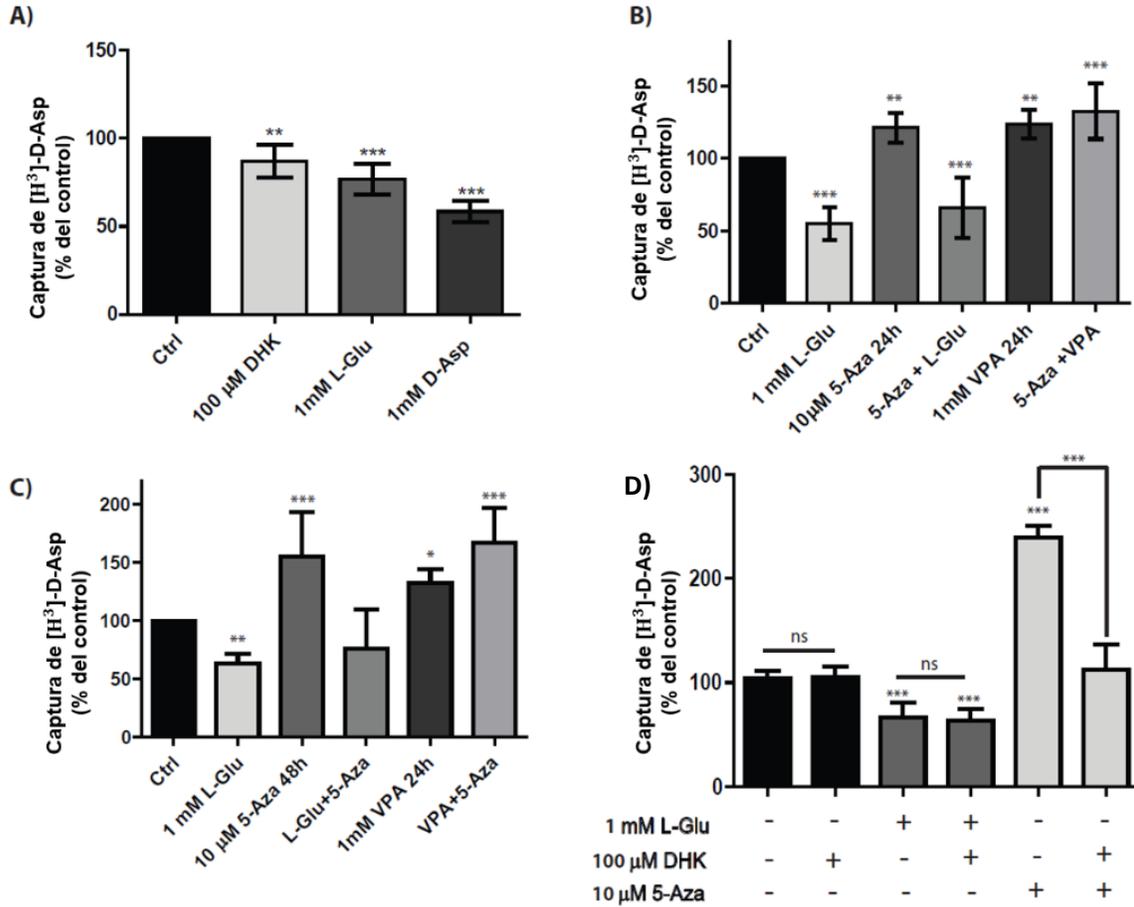
tratamiento con Glu 1mM y con D-Asp 100  $\mu$ M (Figura 11A). La activación de PKC por la exposición a TPA 500 nM, también disminuyó los niveles de PKC a las 24 h de tratamiento (Figura 11A), este resultado está en concordancia con lo reportado en CGB por (González & Ortega, 1997), que demostraron que el tratamiento con TPA, disminuye los niveles de proteína del transportador y la actividad de captura de [ $^3$ H]-D-Asp de una manera dependiente de PKC. YY1 aumenta en su fracción nuclear después del tratamiento con L-Glu (Figura 11B) de manera sensible al bloqueador de PKC, bisindolylmaleimida I (Bis). Sin embargo, no está muy claro, si los efectos del Glu son mediados por transportadores o por receptores, puesto que pudimos detectar una reducción significativa de los niveles de proteína de GLAST cuando se trató con D-Asp 100  $\mu$ M y no se encontró una clara translocación nuclear de YY1 en la misma condición. Por otro lado, las células MIO-M1 expresan ambos transportadores de glutamato, GLAST y GLT-1, por lo que decidimos cuantificar los niveles de expresión de GLT-1 después del tratamiento con 5-Aza. Observamos que, bajo condiciones de hipometilación los niveles de proteína de GLT-1 aumentan, apoyando la noción de que en las células de glía radial, los transportadores de glutamato son modulados a través de procesos dinámicos de metilación y desmetilación (Figura 12C).



**Figura 11.** YY1 está implicado en la expresión de GLAST bajo estimulación glutamatergica en células MIO-M1. A) GLAST disminuye en células tratadas con L-Glu y D-Asp durante 24 h, demostrando el mismo comportamiento de expresión que en CGB, así como los niveles nucleares de YY1 incrementan bajo las mismas condiciones (B). Sin embargo, estas células también expresan GLT-1, por lo que al evaluar el comportamiento de este otro transportador bajo condiciones hipometilantes, pudimos notar que hay una sobreexpresión (C), añadiendo un grado mayor de complejidad para comprender a los transportadores de glutamato en estas células. Las gráficas muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes, analizados con Kruskal-Wallis y comparación múltiple de Dunnet, donde \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.001$ .

### **3.6 Regulación del transporte de [<sup>3</sup>H]-D-Asp en células MIO-M1**

Para poder magnificar el efecto funcional de la regulación de los transportadores de glutamato gliales, GLAST y GLT-1 en las células MIO-M1, evaluamos la actividad de captura de [<sup>3</sup>H]-D-Asp. Como se muestra en la figura 12A, más del 80% de la captura es mediada por el transportador GLAST, ya que al usar 100 μM de DHK redujimos en un 20 % la captura total de estas células. A 30 min de exposición a Glu o Asp, la actividad de captura disminuyó al igual que se observa en las CGB. En condiciones de hipometilación con 5-aza a 24 horas (Figura 12B) y 48 horas (Figura 12C), la captura aumenta, sin embargo, y al igual que en las CGB, este aumento no se mantiene cuando co-tratamos con L-Glu durante 30 min. El hecho de que el VPA y el 5-Aza tengan efectos aditivos, sugiere fuertemente que el aumento en la actividad es resultado de un proceso de hipometilación. Finalmente, en las células MIO-M1, el aumento de la función de transportadores de glutamato es casi completamente resultado de un aumento en la expresión de GLT-1 (Figura 13D). Este resultado está en total discrepancia con lo que ocurre en las CGB, en las que el aumento de la captura es más atribuible al aumento de GLAST en vez de GLT-1.



**Figura 12.** Evaluación de la actividad de los transportadores de glutamato en condiciones hipometilantes en la línea celular MIO-M1. A) Determinación de la participación de GLT-1 en la captura de [<sup>3</sup>H]-Asp en las células MIO-M1, tratamientos de 30 min. B) y C) Capturas de [<sup>3</sup>H]-Asp en condiciones hipometilantes con 5-Aza durante 24 y 48 h respectivamente. D) Tratamientos con 5-Aza 10 μM por 24 horas en co-tratamiento con DHK, 100 μM durante 30 min. Resultados de tres experimentos independientes por cuadruplicado. Las barras representan medias ± DE analizadas por ANOVA unidireccional con la comparación múltiple de Dunnet, \*p<0.05, \*\*p<0.001 y \*\*\*p<0.0001. En (D) comparamos todos los tratamientos con la comparación múltiple de Bonferroni donde \*\*\*p<0.0001.

#### 4. DISCUSIÓN

Las células gliales participan en la transmisión glutamatérgica como entidades obligadas responsables de más del 80% de la eliminación de Glu de la hendidura sináptica. Bajo esta premisa, se espera una regulación multi-nivel del número de transportadores gliales de Glu funcionales en la membrana plasmática (Control transcripcional y traduccional, inserción adecuada en la membrana plasmática y localización de los transportadores de Glu funcionales en membrana plasmática) (Rodríguez-Campuzano & Ortega, 2021).

La regulación de la expresión de GLAST, el principal transportador de glutamato en las CGB, implica mecanismos epigenéticos como la acetilación de histonas (Aguirre et al. 2008). Teniendo en cuenta la evidencia acumulada de una metilación dinámica del DNA en el SNC (Tognini *et al.*, 2015), decidimos evaluar la participación de la metilación del DNA en la regulación de la expresión génica de GLAST, y si este evento se mantiene en la glía radial humana, por lo que usamos una línea celular de Müller de origen humano, MIO-M1.

Por mucho tiempo se asumió que la metilación del DNA era un evento permanente de represión transcripcional, sin embargo, estudios recientes han demostrado que se trata más de un proceso dinámico en el SNC, que se asocia con su desarrollo y que cambia como consecuencia de factores externos como los insultos (Baker-Andresen *et al.*, 2013). De hecho, se sabe que se activa un programa de supresión transcripcional sustancial después de la tolerancia isquémica u otras lesiones cerebrales (Zeng *et al.*, 2020). El estudio de la metilación del DNA enfocado únicamente sobre regiones promotoras de ciertos genes candidatos ha ensombrecido, pasado de largo y sobreestimando, aquellos cambios en la metilación del DNA en donde la expresión génica basal no se altera, perdiendo toda apreciación de la variación funcional de la metilación del DNA fuera de las regiones promotoras, como en los cuerpos de los genes, intergénicamente y otras regiones genómicas (Guo *et al.*, 2011; Jones, 2012). La metilación rápida y dinámica de genes específicos es fundamental para la plasticidad neuronal (Morris & Monteggia, 2014; Tognini *et al.*, 2015; Halder *et al.*, 2016).

En este estudio pudimos observar que la estimulación de las células gliales con Glu a largo plazo (24 h), aumenta los niveles de 5-mC en el DNA de las CGB (Figura 6) y MIO-M1 (Figura

10). Efecto que no se observa al estimular con D-Asp en CGB ni en células MIO-M1, apoyando fuertemente la noción de que este evento de metilación observado es mediado a través de la activación de receptores de Glu, pues el D-Asp no activa receptores pero sí activa transportadores, teniendo una forma de discernir entre la actividad de receptores y transportadores.

Si estos patrones de metilación diferenciales entre las células en estado basal y las estimuladas con Glu, pudieran tener un impacto sobre una de las funciones más importantes de la glía, como lo es la captura del neurotransmisor Glu, entonces, la actividad de captura de [<sup>3</sup>H]-D-Asp se vería afectada en un ambiente de hipometilación, el evento antagonista del aumento en la metilación observada por el Glu. La hipometilación se alcanzó con el tratamiento con 5-Aza, un nucleósido inhibidor que después de su incorporación al DNA, atrapa a las DNMTs mediante la unión covalente de la enzima al DNA, bloqueando por tanto, el funcionamiento de las DNMTs de manera irreversible (Mompalmer, 2005). Se observó que tanto en las CGB como en las células MIO-M1, aumenta la captura de Glu (24 y 48 horas) cuando se trata con 5-Aza, efecto que resulta sensible al L-Glu 1 mM. En este sentido, estamos observando dos eventos de regulación de la captura a diferente nivel; una modulación aguda ocurre cuando el L-Glu (30 min) disminuye la actividad del transportador de manera no receptora, involucrando el proceso de translocación del sustrato a través del transportador que resulta en su internalización y que se puede mantener a largo plazo (González & Ortega, 2000; Martínez *et al.*, 2014); y por otra parte un proceso genómico regido por la hipometilación afectando el proteoma celular indiscriminadamente.

Para corroborar que el aumento exacerbado en la actividad del transporte de [<sup>3</sup>H]-D-Asp en las células gliales estimuladas con 5-Aza, era producto de la actividad de GLAST, se utilizó el DHK con la finalidad de bloquear alguna respuesta mediada por el principal transportador astrocítico del SNC, GLT-1. Observamos que el estado de hipometilación global desencadena la expresión de GLT-1 en estas células que regularmente permanece silenciada, siendo más pronunciada su expresión en las células humanas MIO-M1 que en las CGB (~50% vs. 16%). Estos resultados diferenciales pueden representar la diversidad funcional entre el cerebelo y la retina. En condiciones normales las CGB no expresan GLT-1 (Danbolt, 2001). Sin embargo,

se ha probado que GLT-1 tiene una transcripción dependiente de la metilación del DNA en astrocitos corticales (Zschocke *et al.*, 2007). Por otra parte, de acuerdo a estudios previos, la regulación transcripcional de GLAST pudiera no depender el estado de metilación en su promotor, ya que carece de ICG (Šerý *et al.*, 2015). Sin embargo, en el cerebro adulto, la actividad neuronal induce cambios en el estado de metilación del DNA ocurriendo muy frecuentemente en regiones lejanas al promotor (Guo *et al.*, 2011). Además, las regiones diferencialmente metiladas (DRMs) en neuronas y células gliales están particularmente enriquecidas dentro de *enhancers* localizados distalmente de los sitios de inicio de la transcripción (Kozlenkov *et al.*, 2014). Volviendo un poco complicado determinar el papel de la metilación del DNA en la expresión de GLAST si solo nos enfocamos en la región promotora del gen, por lo que se necesitan hacer estudios de todo el genoma para determinar el metiloma bajo condiciones de excitotoxicidad para tener una respuesta integral sobre el fenómeno.

Al evaluar los niveles de proteína de GLAST, se corroboró que cuando se estimula con L-Glu o D-Asp hay una disminución en GLAST membranal en CGB (Figura 8A) y en células MIO-M1 (Figura 11 A), mientras que con 5-Aza hay una tendencia al alza en estos niveles. Ya se ha establecido la modulación negativa que tiene el factor de transcripción YY1 sobre la transcripción de GLAST en CGB (Rosas *et al.*, 2007; Aguirre *et al.*, 2008) y en astrocitos corticales (Karki *et al.*, 2014; Karki *et al.*, 2015). Por lo que al evaluar los niveles nucleares de YY1 en presencia de L-Glu era de esperarse el efecto observado (Figura 8B). Aunque, cuando se evaluó a YY1 en CGB tratadas con 5-Aza también existe un aumento (Figura 8C), lo cual indica que la expresión de YY1 puede estar mediada por un proceso de metilación, o bien, por otros factores de transcripción como el NF- $\kappa$ B, pues se ha descrito que induce la expresión de YY1.

En las células MIO-M1, el proceso de regulación transcripcional de GLAST no está definido, fue de nuestro interés evaluar si YY1 se comporta igual a lo previamente descrito en las CGB (L-Glu  $\rightarrow$   $\uparrow$ iCa<sup>2+</sup>  $\rightarrow$  IP3/DAG  $\rightarrow$  PKC  $\rightarrow$  YY1  $\rightarrow$   $\downarrow$ mRNA GLAST  $\rightarrow$   $\downarrow$ proteína GLAST  $\rightarrow$   $\downarrow$  Actividad GLAST). Encontramos un aumento en los niveles nucleares de YY1 tratados con L-Glu, al igual que en las células tratadas con TPA (activador de PKC), efecto que se revierte

cuando co-tratamos con Bis1 (inhibidor de PKC), lo cual fue relevante para comprender que, en esta línea celular, la regulación de GLAST parece seguir el mismo camino que en las CGB, ambas glías radiales (Figura 11).

Como factor de transcripción multifuncional, YY1 participa en la activación y represión transcripcional, suele formar parte de los complejos formados por las proteínas del Grupo Polycomb (PcG). Aunque los informes sobre el número de genes que podrían estar regulados por YY1 son cada vez mayores, los mecanismos exactos por los cuales este factor regula la transcripción aún no están claros.

La metilación del ADN está mediada por enzimas DNMTs. Las DNMTs *de novo* no tienen elementos *cis* que determinen su posición en el ADN y, se ha propuesto la participación de cofactores que los conducen a los sitios que necesitan ser metilados. En este contexto, YY1 interactúa con una gran cantidad de proteínas que median varias modificaciones postraduccionales, desde p300 y HDAC (Yao *et al.*, 2001) hasta miembros del PcG, Ezh1 y 2 (Caretta *et al.*, 2004) y PRMT1 (Rezai-Zadeh *et al.*, 2003). Se ha reportado que YY1 puede jugar un papel relevante en la mediación de la represión transcripcional dependiente de PcG (Atchison *et al.*, 2003; Srinivasan & Atchison, 2004; Wilkinson *et al.*, 2006; Basu *et al.*, 2014). Las metiltransferasas de histonas EZH2 y SUZ12 interactúan con YY1 para coordinar el silenciamiento transcripcional reclutando el complejo represivo Polycomb 2 (PRC2) (Pan *et al.*, 2013; Tsang *et al.*, 2016). Además, YY1 puede interactuar con las DNMT *de novo* (Hervouet *et al.*, 2009; Hervouet *et al.*, 2018) y se ha implicado en la metilación *de novo* del DNA (Kim *et al.*, 2009). Al evaluar los niveles de mRNA de las DNMTs *de novo* en respuesta al L-Glu (Figura 9), se encontró un aumento significativo en ambas enzimas, 3A y 3B. Con un efecto más pronunciado en DNMT3B, que apoya la propuesta de la regulación de la expresión diferencial de los transportadores por YY1 dependiente de los niveles de metilación del DNA.

Los niveles excitotóxicos de Glu (> 0.3 hasta 1mM) conducen al estrés oxidativo (Bondy *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 2011). Se ha reportado que, bajo estrés oxidativo, la expresión de DNMT3B no se ve afectada, pero su actividad de metiltransferasa de DNA aumenta (Wei & Loeken, 2014) y el estrés oxidativo puede alterar la actividad del transportador EAAT sin

cambiar la expresión del transportador en todos los casos (Trotti *et al.*, 1998; Miralles *et al.*, 2001). Por otro lado, 5mC es una modificación reversible que puede eliminarse pasivamente durante la replicación o eliminarse activamente mediante las enzimas de translocación Ten-Eleven (TET) (Wu & Zhang 2011). Los niveles de TET1 no cambiaron con el tratamiento con L-Glu, pero aumentaron significativamente después del tratamiento con 5-Aza, resultado que podría esperarse ya que 5-Aza favorece un entorno de hipometilación. Algunos estudios han reportado que TET1 puede ser regulado por actividad neuronal y que su sobreexpresión lleva a cambios globales en los niveles de citosinas metiladas y en la expresión de genes regulados por actividad neuronal importantes en el aprendizaje y memoria (Kaas *et al.*, 2013).

En el presente trabajo mostramos evidencia bioquímica de la participación de los procesos dinámicos de metilación/desmetilación del DNA en la regulación de la expresión génica de los transportadores gliales de glutamato. Trabajo actualmente en progreso en nuestro laboratorio tiene como objetivo caracterizar las vías de señalización que participan en la regulación positiva de DNMT3 dependiente de glutamato, así como la caracterización de las consecuencias funcionales en términos de la fisiología de glía radial.

## 5. CONCLUSIONES

- El glutamato aumenta los niveles de metilación global del DNA en las células gliales, evento conservado entre especies
- La actividad y expresión de los transportadores de glutamato se puede regular por metilación del DNA
- La hipometilación revierte la expresión suprimida de GLT-1 en la glía radial tanto de pollo como de humano, aumentando su expresión y actividad
- El glutamato aumenta los niveles de mRNA de las DNMTs *de novo*, observando un aumento más pronunciado en la DNMT3B que también incrementa sus niveles de proteína
- Estos resultados indican que la remoción de glutamato extracelular se puede regular por metilación dinámica activada por el glutamato en células gliales

Estos resultados indican que la remoción de glutamato extracelular se puede regular por metilación dinámica activada por el Glu en células gliales.

## 6. PERSPECTIVAS

- Evaluar la activación de los receptores de Glu y las vías de señalización activadas por el Glu que llevan a la remodelación la metilación del DNA.
- Disecar la regulación de la expresión de GLAST y GLT-1 en las células MIO-M1
- Evaluar el estado del transcriptoma global en las células gliales estimuladas con Glu, analizando aquellos genes importantes para la regulación de la transmisión glutamatérgica.
- Analizar las interacciones entre YY1 y DNMTs *de novo* con métodos que involucren etiquetas fluorescentes (utilizando FRET) o que evalúen interacciones transitorias leves.
- Evaluar la potencial participación de otros componentes de la maquinaria de complejo represivo polycomb que puedan ayudar en el silenciamiento rápido de ciertos genes ante la estimulación glutamatérgica.
- Al comprender seriamente el mecanismo epigénético desencadenado por Glu en las células gliales, podremos conocer el mecanismo basal para un funcionamiento adecuado del sistema y entonces poder hacer otras aproximaciones toxicológicas evaluando diferentes insultos y cómo estos afectan al funcionamiento adecuado de las células gliales.

## 7. REFERENCIAS

- Aguirre, G., Rosas, S., López-Bayghen, E., & Ortega, A. 2008. Valproate-dependent transcriptional regulation of GLAST/EAAT1 expression: Involvement of Ying-Yang 1. *Neurochemistry International*,52(7), 1322-1331. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.01.015>
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., & Amara, S.G. 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci*,94, 4155-4160.
- Arriza, J.L., Fairman, W.A., Wadiche, J.I., Murdoch, G.H., Kavanaugh, M.P., & Amara, S.G. 1994. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci*,14(9), 5559-5569.
- Atchison, L., Ghias, A., Wilkinson, F., Bonini, N., & Atchison, M.L. 2003. Transcription factor YY1 functions as a PcG protein in vivo. *Embo j*,22(6), 1347-1358. doi:10.1093/emboj/cdg124
- Bak, L.K., Schousboe, A., & Waagepetersen, H.S. 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*,98(3), 641-653. doi:DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x
- Baker-Andresen, D., Ratnu, V.S., & Bredy, T.W. 2013. Dynamic DNA methylation: a prime candidate for genomic metaplasticity and behavioral adaptation. *Trends Neurosci*,36(1), 3-13. doi:10.1016/j.tins.2012.09.003
- Basu, A., Wilkinson, F.H., Colavita, K., Fennelly, C., & Atchison, M.L. 2014. YY1 DNA binding and interaction with YAF2 is essential for Polycomb recruitment. *Nucleic Acids Res*,42(4), 2208-2223. doi:10.1093/nar/gkt1187
- Bergles, D.E., Tzingounis, A.V., & Jahr, C.E. 2002. Comparison of coupled and uncoupled currents during glutamate uptake by GLT-1 transporters. *J Neurosci*,22(23), 10153-10162.
- Binda, F., Pernaci, C., & Saxena, S. 2020. Cerebellar Development and Circuit Maturation: A Common Framework for Spinocerebellar Ataxias. *Front. Neurosci.*,14. doi:10.3389/fnins.2020.00293
- Bird, A. 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature*,447, 396-398.
- Bondy, S.C., LeBel, C.P.J.F.R.B., & Medicine. 1993. The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system. 14(6), 633-642.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Vire, E., De Smet, C., & al., e. 2005. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J*,24, 336-346.
- Brockhaus, J., & Deitmer, J.W. 2002. Long-lasting modulation of synaptic input to Purkinje neurons by Bergmann glia stimulation in rat brain slices. *J Physiol*,545(Pt 2), 581-593.
- Brodal, P. 2016. *The Central Nervous System* (Fifth Edition ed.). Oxford, UK: Oxford University Press.
- Buffo, A., & Rossi, F. 2013. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog Neurobiol*,109, 42-63. doi:DOI: 10.1016/j.pneurobio.2013.08.001
- Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G.E., & Sartorelli, V. 2004. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev*,18(21), 2627-2638. doi:10.1101/gad.1241904
- Chédin, F. 2011. The DNMT3 Family of Mammalian *De novo* DNA methyltransferases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*,101, 255-286. doi:DOI: 10.1016/B978-0-12-387685-0.00007-X
- Cid, M.E., & Ortega, A. 1993. Glutamate stimulates [3H]phorbol-12-13-dibutyrate binding in cultured Bergmann glia cells. *Eur J Pharmacol*,245, 51-54.
- Claycomb, K.I., Johnson, K.M., Winokur, P.N., Sacino, A.V., & Crocker, S.J. 2013. Astrocyte regulation of CNS inflammation and remyelination *Brain Sci.*,3. doi:DOI: 10.3390/brainsci3031109
- Danbolt, N.C. 2001. Glutamate uptake. . *Progress in Neurobiology*,65, 1-105. doi:DOI: 10.1016/S0301-0082(00)00067-8

- Danbolt, N.C., Furness, D.N., & Zhou, Y. 2016. Neuronal vs glial glutamate uptake: Resolving the conundrum. *Neurochem Int*,98, 29-45. doi:DOI: 10.1016/j.neuint.2016.05.009
- Deaton, A.M., & Bird, A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*,25(10), 1010-1022. doi: <http://doi.org/10.1101/gad.2037511>
- Di Croce, L., Raker, V.A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., & al., e. 2002. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*,295, 1079–1082.
- Duursma, A.M., Kedde, M., Schrier, M., le Sage, C., & Agami, R. 2008. miR- 148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*,14, 872-877.
- Espinoza-Rojo, M., López-Bayghen, E., & Ortega, A. 2000. GLAST: gene expression regulation by phorbol esters. *Neuroreport*,11, 2827-2832.
- Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., & Amara, S.G. 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*,375, 599. doi:10.1038/375599a0
- Farmer, W.T., & Murai, K. 2017. Resolving Astrocyte Heterogeneity in the CNS. *Front. Cell. Neurosci.*,11. doi:10.3389/fncel.2017.00300
- Furness, D.N., Dehnes, Y., Akhtar, A.Q., Rossi, D.J., Hamann, M., Grutle, N.J., Gundersen, V., Holmseth, S., Lehre, K.P., Ullensvang, K., Wojewodzik, M., Zhou, Y., Attwell, D., & Danbolt, N.C. 2008. A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience*,157, 80-94.
- Gallo, V., & Ghiani, C.A. 2000. Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol Sci*,21(7), 252-258.
- Gameiro, A., Braams, S., Rauen, T., & Grever, C. 2011. The discovery of slowness: low-capacity transport and slow anion channel gating by the glutamate transporter EAAT5. *Biophys J*,100(11), 2623-2632. doi:DOI: 10.1016/j.bpj.2011.04.034
- Garzon, R., Liu, S., Fabbri, M., Liu, Z., Heaphy, C.E., Callegari, E., & al., e. 2009. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. *Blood*,113(25), 6411-6418.
- Gibney, E.R., & Nolan, C.M. 2010. Epigenetics and gene expression. *Heredity*,105, 4-13.
- Goll, M., Kirpekar, F., Maggert, K., Yoder, J., Hsieh, C., Zhang, X., & al., e. 2006. Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*,311, 395-398.
- González, M.I., & Ortega, A. 1997. Regulation of the Na<sup>+</sup>-dependent high affinity glutamate/aspartate transporter in cultured Bergmann glia by phorbol esters. *J Neurosci Res*,50(4), 585-590. doi:10.1002/(sici)1097-4547(19971115)50:4<585::Aid-jnr9>3.0.Co;2-a
- González, M.I., & Ortega, A. 2000. Regulation of high-affinity glutamate uptake activity in Bergmann glia cells by glutamate. *Brain Res*,866, 73-81.
- Grosche, J., Matyash, V., Moller, T., Verkhratsky, A., Reichenbach, A., & Kettenmann, H. 1999. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci*,2(2), 139-143. doi:10.1038/5692
- Guo, J.U., Ma, D.K., Mo, H., Ball, M.P., Jang, M.H., Bonaguidi, M.A., Balazer, J.A., Eaves, H.L., Xie, B., Ford, E., Zhang, K., Ming, G.L., Gao, Y., & Song, H. 2011. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci*,14(10), 1345-1351. doi:10.1038/nn.2900
- Halder, R., Hennion, M., Vidal, R.O., Shomroni, O., Rahman, R.U., Rajput, A., Centeno, T.P., van Bebber, F., Capece, V., Garcia Vizcaino, J.C., Schuetz, A.L., Burkhardt, S., Benito, E., Navarro Sala, M., Javan, S.B., Haass, C., Schmid, B., Fischer, A., & Bonn, S. 2016. DNA methylation

- changes in plasticity genes accompany the formation and maintenance of memory. *Nat Neurosci*,19(1), 102-110. doi:10.1038/nn.4194
- Harves, B.H., & Shahid, M. 2012. Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as neurobiological targets in anxiety and stress-related disorders: Focus on pharmacology and preclinical translational models. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*,100, 775-800.
- Haugeto, O., Ullensvang, K., Levy, L.M., Chaudhry, F.A., Honore, T., Nielsen, M., Lehre, K., P., & Danbolt, N.C. 1996. Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem*,271, 27715–27722.
- Herman, M.A., & Jahr, C.E. 2007. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J Neurosci*,27(36), 9736-9741. doi:DOI: 10.1523/jneurosci.3009-07.2007
- Hermann, A., Schmitt, S., & Jeltsch, A. 2003. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem*,278, 31717-31721.
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., & Robinson, S.R. 1999. Astrocytes: Glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research*,57(4), 417-428. doi:DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19990815)57:4<417::AID-JNR1>3.0.CO;2-N
- Hervouet, E., Peixoto, P., Delage-Mourroux, R., Boyer-Guittaut, M., & Cartron, P.-F. 2018. Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma. *Clinical Epigenetics*,10(17). doi:<https://doi.org/10.1186/s13148-018-0450-y>
- Hervouet, E., Vallette, F.M., & Cartron, P.-F. 2009. Dnmt3/transcription factor interactions as crucial players in targeted DNA methylation. *Epigenetics*,4(7), 487-499.
- Holz-Schietinger, C., & Reich, N.O. 2012. RNA modulation of the human DNA methyltransferase 3A. *Nucleic Acids Res*,10(17), 8550-8557.
- Hyde-DeRuyscher, R.P., Jennings, E., & Shenk, T. 1995. DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1. *Nucleic Acids Res*.
- Illingworth, R., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A.R., James, K.D., Smith, C., Harrison, D.J., Andrews, R., & Bird, A. 2010. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet*,6(9), e1001134.
- Illingworth, R., Kerr, A., Desousa, D., Jorgensen, H., Ellis, P., Stalker, J., & al., e. 2008. A novel CpG island set identifies tissue specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol*,6(e22).
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., & Zhang, Y. 2011. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*,333, 1300-1303.
- Jeltsch, A., & Jurkowska, R.Z. 2016. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases - a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Res*,44(18), 8556-8575.
- Jin, B., Tao, Q., Peng, J., Soo, H.M., Wu, W., Ying, J., & al., e. 2008. DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function. *Hum Mol Genet*,17, 690-709.
- Jinawath, A., Miyake, S., Yanagisawa, Y., Akiyama, Y., & Yuasa, Y. 2005. Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase 3A and 3B genes by Sp3 and Sp1 zinc finger proteins. *Biochem J*,385, 557-564.
- Jirtle, R.L., & Skinner, M.K. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*,8, 253-262.
- Jones, P.A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*,13(7), 484-492. doi:10.1038/nrg3230
- Jurkowska, R.Z., Rajavelu, A., Anspach, N., Urbanke, C., Jankevicius, G., Ragozin, S., Nellen, W., & Jeltsch, A. 2011. Oligomerization and binding of the Dnmt3a DNA methyltransferase to

- parallel DNA molecules: heterochromatic localization and role of Dnmt3L. *J Biol Chem*,286(27), 24200-24207.
- Kaas, G.A., Zhong, C., Eason, D.E., Ross, D.L., Vachhani, R.V., Ming, G.L., King, J.R., Song, H., & Sweatt, J.D. 2013. TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. *Neuron*,79, 1086e1093.
- Kanai, Y., & Hediger, M.A. 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*,360(6403), 467-471. doi:doi:10.1038/360467a0
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., & Jessel, T.M. 2012. *Principles of Neural Science* (5th Edition ed.): McGraw-Hill Education / Medical.
- Karki, P., Kim, C., Smith, K., Son, D.S., Aschner, M., & Lee, E. 2015. Transcriptional Regulation of the Astrocytic Excitatory Amino Acid Transporter 1 (EAAT1) via NF- $\kappa$ B and Yin Yang 1 (YY1). *J Biol Chem*,290(39), 23725-23737. doi:10.1074/jbc.M115.649327
- Karki, P., Webb, A., Smith, K., Johnson, J., Jr., Lee, K., Son, D.S., Aschner, M., & Lee, E. 2014. Yin Yang 1 is a repressor of glutamate transporter EAAT2, and it mediates manganese-induced decrease of EAAT2 expression in astrocytes. *Mol Cell Biol*,34(7), 1280-1289. doi:10.1128/mcb.01176-13
- Kim, C.H., Lee, J., Lee, J.Y., & Roche, K.W. 2008. Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. *J Neurosci Res*,86, 1-10.
- Kim, J.D., Kang, K., & Kim, J. 2009. YY1's role in DNA methylation of Peg3 and Xist. *Nucleic Acids Res*,37(17), 5656-5664. doi:10.1093/nar/gkp613
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R.J., & Cheng, X. 1994. HhaI Methyltransferase Flips Its Target Base Out of the DNA Helix. *Cell*,76, 357-369.
- Klose, R.J., & Bird, A.P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*,31, 89-97.
- Korhonen, P., Huotari, V., Soininen, H., & Salminen, A. 1997. Glutamate-induced changes in the DNA-binding complexes of transcription factor YY1 in cultured hippocampal and cerebellar granule cells. *Brain Res Mol Brain Res*,52, 330-333.
- Kozlenkov, A., Roussos, P., Timashpolsky, A., Barbu, M., Rudchenko, S., Bibikova, M., Klotzle, B., Byne, W., Lyddon, R., Di Narzo, A.F., Hurd, Y.L., Koonin, E.V., & Dracheva, S. 2014. Differences in DNA methylation between human neuronal and glial cells are concentrated in enhancers and non-CpG sites. *Nucleic Acids Res*,42(1), 109-127. doi:10.1093/nar/gkt838
- Lehmann, C., Bette, S., & Engele, J. 2009. High extracellular glutamate modulates expression of glutamate transporters and glutamine synthetase in cultured astrocytes. *Brain Res*,1297, 1-8. doi:DOI: 10.1016/j.brainres.2009.08.070
- Lehre, K.P., & Danbolt, N.C. 1998. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18, 8721-8757.
- Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U., & Bestor, T.H. 1992. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*,71, 865-873.
- Levi, G., & Gallo, V. 1986. Release studies related to the neurotransmitter role of glutamate in the cerebellum: an overview. *Neurochem Res*,11(12), 1627-1642.
- Lewerenz, J., & Maher, P. 2015. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? *Frontiers in Neuroscience*,9, 469. doi:DOI: 10.3389/fnins.2015.00469
- Limb, G.A., Salt, T.E., Munro, P.M., Moss, S.E., & Khaw, P.T. 2002. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Müller cell line (MIO-M1). *Invest Ophthalmol Vis Sci*,43(3), 864-869.
- Lin, I.G., Han, L., Taghva, A., O'Brien, L.E., & Hsieh, C.-L. 2002. Murine De Novo Methyltransferase Dnmt3a Demonstrates Strand Asymmetry and Site Preference in the Methylation of DNA In

- Vitro. *Molecular and Cellular Biology*, 22(3), 704-723.  
doi:<http://doi.org/10.1128/MCB.22.3.704-723.2002>
- Ling, Y., Sankpal, U., Robertson, A., McNally, J., Karpova, T., & Robertson, K. 2004. Modification of de novo DNA methyltransferase 3a (Dnmt3a) by SUMO-1 modulates its interaction with histone deacetylases (HDACs) and its capacity to repress transcription. *Nucleic Acids Res*, 32, 598-610.
- López-Bayghen, E., Espinoza-Rojo, M., & Ortega, A. 2003. Glutamate down-regulates GLAST expression through AMPA receptors in Bergmann glial cells. *Molecular Brain Research*, 115(1), 1-9. doi:[https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(03\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(03)00136-0)
- López-Bayghen, E., Rosas, S., Castelán, F., & Ortega, A. 2007. Cerebellar Bergmann glia: an important model to study neuron-glia interactions. *Neuron Glia Biology*, 3(02), 155-167.
- López-Bayghen, E., & Ortega, A. 2004. Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST: role of PKC. *Journal of Neurochemistry*, 91(1), 200-209. doi:doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02706.x
- Lyko, F. 2018. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Epigenetics*, 19, 81-92.
- Marmioli, P., & Cavaletti, G. 2012. The glutamatergic neurotransmission in the central nervous system. *Curr Med Chem*, 19(9), 1269-1276.
- Martinez-Lozada, Z., Hernandez-Kelly, L.C., Aguilera, J., Lopez-Bayghen, E., & Ortega, A. 2011. Signaling through EAAT-1/GLAST in cultured Bergmann glia cells. *Neurochem Int*, 59(6), 871-879. doi:10.1016/j.neuint.2011.07.015
- Martínez-Lozada, Z., & Ortega, A. 2015. Glutamatergic Transmission: A Matter of Three. *Neural Plast*, 2015, 787396. doi:<https://doi.org/10.1155/2015/787396>
- Martínez, D., García, L., Aguilera, J., & Ortega, A. 2014. An Acute Glutamate Exposure Induces Long-Term Down Regulation of GLAST/EAAT1 Uptake Activity in Cultured Bergmann Glia Cells. *Neurochem Res*, 39, 142-149.
- Massie, A., Cnops, L., Smolders, I., McCullumsmith, R., Kooijman, R., Kwak, S., Arckens, L., & Michotte, Y. 2008. High-affinity Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-dependent glutamate transporter EAAT4 is expressed throughout the rat fore- and midbrain. *J Comp Neurol*, 511(2), 155-172. doi:DOI: 10.1002/cne.21823
- Maurer-Stroh, S., Dickens, N.J., Hughes-Davies, L., Kouzarides, T., Eisenhaber, F., & Ponting, C.P. 2003. The Tudor domain 'Royal Family': Tudor, plant Agenet, Chromo, PWWP and MBT domains. *Trends Biochem Sci*, 28, 69-74.
- McCabe, M.T., Davis, J.N., & Day, M.L. 2005. Regulation of DNA methyltransferase 1 by the pRb/E2F1 pathway. *Cancer Res*, 65, 3625-3632.
- Miller, C.A., & Sweatt, J.D. 2007. Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, 53, 857e869.
- Mim, C., Balani, P., Rauen, T., & Grewer, C. 2005. The glutamate transporter subtypes EAAT4 and EAATs 1-3 transport glutamate with dramatically different kinetics and voltage dependence but share a common uptake mechanism. *J Gen Physiol*, 126(6), 571-589. doi:DOI: 10.1085/jgp.200509365
- Miralles, V.J., Martínez-López, I., Zaragoza, R., Borrás, E., García, C., Pallardó, F.V., & Viña, J.R. 2001. Na<sup>+</sup> dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) in primary astrocyte cultures: effect of oxidative stress. *Brain Res*, 922(1), 21-29.  
doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03124-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03124-9)
- Momparler, R.L. 2005. Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Hematol*, 42(3 Suppl 2), S9-16. doi:10.1053/j.seminhematol.2005.05.002

- Morey-Kinney, S.R., & Pradhan, S. 2011. Regulation of Expression and Activity of DNA (Cytosine-5) Methyltransferases in Mammalian Cells. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*,101, 311-333.
- Morris, M.J., & Monteggia, L.M. 2014. Role of DNA methylation and the DNA methyltransferases in learning and memory. *Dialogues Clin Neurosci*,16(3), 359-371. doi:10.31887/DCNS.2014.16.3/morris
- Muller, T., & Kettenmann, H. 1995. Physiology of Bergmann glial cells. *Int Rev Neurobiol*,38, 341-359.
- Nafee, T.M., Farrel, W.E., Carroll, W.D., Fryer, A.A., & Ismail, K.M.K. 2008. Epigenetic control of fetal gene expression. *BJOG*,115, 158-168.
- Neri, F., Krepelova, A., Incarnato, D., Maldotti, M., Parlato, C., Galvagni, F., Matarese, F., Stunnenberg, H.G., & Oliviero, S. 2013. Dnmt3L antagonizes DNA methylation at bivalent promoters and favors DNA methylation at gene bodies in ESCs. *Cell*,155(1), 121-134.
- Newell-Price, J., Clark, J.L.C., & King, P. 2000. DNA methylation and silencing of gene expression. *TEM*,11(4), 142-147.
- Nguyen, D., Alavi, M., Kim, K., Kang, T., Scott, R., Noh, Y., Lindsey, J., Wissinger, B., Ellisman, M., Weinreb, R.J.C.d., & disease. 2011. A new vicious cycle involving glutamate excitotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dynamics. 2(12), e240-e240.
- Niciu, M.J., Kelmendi, B., & Sanacora, G. 2012. Overview of Glutamatergic Neurotransmission in the Nervous System. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*,100(4), 656-664. doi:DOI: 10.1016/j.pbb.2011.08.008
- Niswender, C.M., & Conn, P.J. 2010. Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*,50, 295-322.
- Nothmann, D., Leinenweber, A., Torres-Salazar, D., Kovermann, P., Hotzy, J., Gameiro, A., Grever, C., & Fahlke, C. 2011. Hetero-oligomerization of neuronal glutamate transporters. *J Biol Chem*,286, 3935-3943.
- O'Shea, R.D. 2002. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*,29, 1018-1023.
- Oka, M., Rodic, N., Graddy, J., Chang, L.-J., & Terada, N. 2006. CpG sites preferentially methylated by Dnmt3a *in vivo*. *J Biol Chem*,281, 9901-9908.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., & Li, E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*,99, 247-257.
- Ortega, A., Eshhar, N., & Teichberg, V.I. 1991. Properties of kainate receptor/channels on cultured Bergmann glia. *Neuroscience*,41(2-3), 335-349. doi:10.1016/0306-4522(91)90331-h
- Osen, K.K., Storm-Mathisen, J., Ottersen, O.P., & Dihle, B. 1995. Glutamate is concentrated in and released from parallel fiber terminals in the dorsal cochlear nucleus: a quantitative immunocytochemical analysis in guinea pig. *J. Comp. Neurol.*,357, 482-500. doi:DOI: 10.1002/cne.903570311
- Pan, X., Papasani, M., Hao, Y., Calamito, M., Wei, F., Quinn Iii, W.J., Basu, A., Wang, J., Hodawadekar, S., Zaprazna, K., Liu, H., Shi, Y., Allman, D., Cancro, M., & Atchison, M.L. 2013. YY1 controls Igk repertoire and B-cell development, and localizes with condensin on the Igk locus. *Embo j*,32(8), 1168-1182. doi:10.1038/emboj.2013.66
- Pin, J.P., Kniazeff, J., Goudet, C., Bessis, A.S., Liu, J., Galvez, T., & al., e. 2004. The activation mechanism of class-C G-protein coupled receptors. *Biol Cell*,96, 335-342.
- Pines, G., Danbolt, N.C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E., & Kanner, B.I. 1992. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*,360(6403), 464-467. doi:doi:10.1038/360464a0

- Rezai-Zadeh, N., Zhang, X., Namour, F., Fejer, G., Wen, Y.D., Yao, Y.L., Gyory, I., Wright, K., & Seto, E. 2003. Targeted recruitment of a histone H4-specific methyltransferase by the transcription factor YY1. *Genes Dev*,17(8), 1019-1029. doi:10.1101/gad.1068003
- Robinson, M.B., & Jackson, J.G. 2016. Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. *Neurochem Int*,98, 56-71. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.03.014>
- Rodríguez-Campuzano, A.G., & Ortega, A. 2021. Glutamate transporters: Critical components of glutamatergic transmission. *Neuropharmacology*,192, 108602. doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108602
- Rosas, S., Vargas, M.A., Lopez-Bayghen, E., & Ortega, A. 2007. Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST/EAAT1: a role for YY1. *J Neurochem*,101(4), 1134-1144. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04517.x
- Rose, C.R., Ziemens, D., Untiet, V., & Fahlke, C. 2018. Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. *Brain Res Bull*,136, 3-16. doi:DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.12.013
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., & Welty, D.F. 1996. Knockout of Glutamate Transporters Reveals a Major Role for Astroglial Transport in Excitotoxicity and Clearance of Glutamate. *Neuron*,16(3), 675-686. doi:[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80086-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80086-0)
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., & Kuncl, R.W. 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron*,13(3), 713-725.
- Rouleau, J., MacLeod, A.R., & Szyf, M. 1995. Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway. *J Biol Chem*,270, 1595-1601.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E., & Baylin, S.B. 2000. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*,25, 269-277.
- Rudenko, A., & Tsai, L.-H. 2014. Epigenetic modifications in the nervous system and their impact upon cognitive impairments. *Neuropharmacology*,80, 70-82.
- Ruiz, M., & Ortega, A. 1995. Characterization of an Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from cultured Bergmann glia. *Neuroreport*,6(15), 2041-2044. doi:10.1097/00001756-199510010-00021
- Schmitz, K.M., Mayer, C., Postepska, A., & Grummt, I. 2010. Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA RNA genes. *Genes Dev*,24, 2264-2269.
- Schneider, N., Cordeiro, S., Machtens, J.P., Braams, S., Rauen, T., & Fahlke, C. 2014. Functional properties of the retinal glutamate transporters GLT-1c and EAAT5. *J Biol Chem*,289(3), 1815-1824. doi:DOI: 10.1074/jbc.M113.517177
- Šerý, O., Sultana, N., Kashem, M.A., Pow, D.V., & Balcar, V.J. 2015. GLAST But Not Least—Distribution, Function, Genetics and Epigenetics of L-Glutamate Transport in Brain—Focus on GLAST/EAAT1. *Neurochemical Research*,40(12), 2461-2472. doi:10.1007/s11064-015-1605-2
- Shi, Y., Lee, J.S., & Galvin, K.M. 1997. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochim Biophys Acta*,1332, F49-F66.
- Snell, R.S. 2007. *Neuroanatomía Clínica* (6a Edición ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Song, J., Rechkoblit, O., Bestor, T.H., & Patel, D.J. 2011. Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science*,331, 1036-1040.
- Srinivasan, L., & Atchison, M.L. 2004. YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP. *Genes Dev*,18(21), 2596-2601. doi:10.1101/gad.1228204

- Steinhauser, C., & Gallo, V. 1996. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci.*,19, 339-345.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., & Stoffel, W. 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci*,89(22), 10955-10959.
- Takada, S., Berezikov, E., Choi, Y.L., Yamashita, Y., & Mano, H. 2009. Potential role of miR- 29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. *RNA*,15, 1507-1514.
- Takamori, S. 2006. VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res*,55(4), 343-351. doi:DOI: 10.1016/j.neures.2006.04.016
- Tognini, P., Napoli, D., & Pizzorusso, T. 2015. Dynamic DNA methylation in the brain: a new epigenetic mark for experience-dependent plasticity. *Front Cell Neurosci*,9, 331. doi:10.3389/fncel.2015.00331
- Trotti, D., Danbolt, N.C., & Volterra, A. 1998. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends in Pharmacological Sciences*,19(8), 328-334. doi:10.1016/S0165-6147(98)01230-9
- Tsang, D.P., Wu, W.K., Kang, W., Lee, Y.Y., Wu, F., Yu, Z., Xiong, L., Chan, A.W., Tong, J.H., Yang, W., Li, M.S., Lau, S.S., Li, X., Lee, S.D., Yang, Y., Lai, P.B., Yu, D.Y., Xu, G., Lo, K.W., Chan, M.T., Wang, H., Lee, T.L., Yu, J., Wong, N., Yip, K.Y., To, K.F., & Cheng, A.S. 2016. Yin Yang 1-mediated epigenetic silencing of tumour-suppressive microRNAs activates nuclear factor- $\kappa$ B in hepatocellular carcinoma. *J Pathol*,238(5), 651-664. doi:10.1002/path.4688
- Turner, A.-M.W., & Morris, V.K. 2010. Controlling transcription with noncoding RNAs in mammalian cells. *The RNA World*,48(6), IX-XVI.
- Verkhatsky, A. 2010. Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochem Int*,57(4), 332-343. doi:DOI: 10.1016/j.neuint.2010.02.002
- Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., & al., e. 2005. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation *Nature*,439, 871-874.
- Wadiche, J.I., Arriza, J.L., Amara, S.G., & Kavanaugh, M.P. 1995. Kinetics of a human glutamate transporter. *Neuron*,14(5), 1019-1027.
- Wadiche, J.I., & Kavanaugh, M.P. 1998. Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter/chloride channel. *J Neurosci*,18(19), 7650-7661.
- Wang, Y., Kamarova, Y., Shen, K., Jiang, Z., Hahn, M., Wang, Y., & al., e. 2005. DNA methyltransferase-3a interacts with p53 and represses p53-mediated gene expression. *Cancer Biol Ther*,4, 1138-1143.
- Wei, D., & Loeken, M.R. 2014. Increased DNA Methyltransferase 3b (Dnmt3b)-Mediated CpG Island Methylation Stimulated by Oxidative Stress Inhibits Expression of a Gene Required for Neural Tube and Neural Crest Development in Diabetic Pregnancy. *Diabetes*,63(10), 3512-3522. doi:10.2337/db14-0231 %J Diabetes
- Weinberg, M.S., Villeneuve, L.M., Ehsani, A., Amarguoui, M., Aagaard, L., Chen, Z.X., Riggs, A.D., Rossi, J.J., & Morris, K.V. 2006. The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. *RNA*,12, 256-262.
- Wilkinson, F.H., Park, K., & Atchison, M.L. 2006. Polycomb recruitment to DNA in vivo by the YY1 REPO domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*,103(51), 19296-19301. doi:10.1073/pnas.0603564103
- Wu, H., Coskun, V., Tao, J., Xie, W., Ge, W., Yoshikawa, K., & al., e. 2010. Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science*,329, 444-448.
- Wu, S.C., & Zhang, Y. 2010. Active DNA demethylation: Many roads lead to Rome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,11, 607-620.

- Yao, Y.L., Yang, W.M., & Seto, E. 2001. Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol*,21(17), 5979-5991. doi:10.1128/mcb.21.17.5979-5991.2001
- Zeng, M., Zhen, J., Zheng, X., Qiu, H., Xu, X., Wu, J., Lin, Z., & Hu, J. 2020. The Role of DNA Methylation in Ischemic Stroke: A Systematic Review. *Front Neurol*,11, 566124. doi:10.3389/fneur.2020.566124
- Zschocke, J., Allritz, C., Engele, J., & Rein, T. 2007. DNA methylation dependent silencing of the human glutamate transporter EAAT2 gene in glial cells. *Glia*,55(7), 663-674. doi:10.1002/glia.20497

## 8. APÉNDICE

Artículos durante el doctorado:

- **Rodríguez-Campuzano AG**, Hernández-Kelly LC, Ortega A. (2022) DNA Methylation-Dependent Gene Expression Regulation of Glutamate Transporters in Cultured Radial Glial Cells [published online ahead of print, 2022 Jan 15]. *Mol Neurobiol.* 2022;10.1007/s12035-022-02746-1. doi:10.1007/s12035-022-02746-1. **FI: 5.590 (2020)**
- **Rodríguez-Campuzano AG**, Ortega A. (2021) Glutamate transporters: Critical components of glutamatergic transmission. *Neuropharmacology.* 2021;192:108602. doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108602. **FI: 5.250 (2021)**
- Watkins, J. C., Evans, R. H., Bayés, À., Booker, S. A., Gibb, A., Mabb, A. M., Mayer, M., Mellor, J. R., Molnár, E., Niu, L., Ortega, A., Pankratov, Y., Ramos-Vicente, D., **Rodríguez-Campuzano, A.**, Rodríguez-Moreno, A., Wang, L. Y., Wang, Y. T., Wollmuth, L., Wyllie, D., Zhuo, M., ... Frenguelli, B. G. (2021). 21st century excitatory amino acid research: A Q & A with Jeff Watkins and Dick Evans. *Neuropharmacology*, 198, 108743. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108743> **FI: 5.250 (2021)**
- **Rodríguez-Campuzano AG**, Hernández-Kelly LC, Ortega A. (2020) Acute Exposure to SiO<sub>2</sub> Nanoparticles Affects Protein Synthesis in Bergmann Glia Cells. *Neurotox Res.* 2020;37(2):366-379. doi:10.1007/s12640-019-00084-0. **FI: 3.911 (2020)**

Asistencias a congresos:

- American Society for Neurochemistry 2021 Meeting, presentación de Poster titulado: “DNA methylation dependent GLAST transcriptional control in glia”. Presentación en línea, congreso virtual. Junio 28 al 1 de Julio 2021
- Society for Neurosciences 2019 Meeting, presentación de Poster titulado: “Dynamic DNA methylation as a mechanism of epigenetic regulation in glial cells under excitotoxicity”. En Chicago, IL., del 19 al 23 de octubre de 2019.
- III Congreso de Neurobiología de la Sociedad Mexicana de Bioquímica Neurología, presentación de poster: Translational control by silica nanoparticles exposure in glial cells. Llevado a cabo en Guanajuato, Gto., del 22 al 26 de septiembre de 2019.
- Society for Neurosciences 2018 Meeting, presentación de Poster titulado: “Translational control by silica nanoparticles exposure in glial cells”. En San Diego, CA., del 3 al 7 de noviembre de 2018.