



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

# **Rol de los microARNs en el establecimiento de los déficits cognitivos y emotivos derivados de una malnutrición proteica perinatal**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área **QUÍMICA BIOLÓGICA**

**Lic. Bruno Gabriel Berardino**

Director de tesis: **Dr. Eduardo Tomás Cánepa**

Consejero de Estudios: **Dr. Luis Alberto Quesada-Allué**

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neuroepigenética, Departamento de Química Biológica, Facultad de  
Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Fecha de defensa: 30 de Marzo de 2017

Buenos Aires, 2017







# **Rol de los microARNs en el establecimiento de los déficits cognitivos y emotivos derivados de una malnutrición proteica perinatal**

## **Resumen de la tesis**

El estrés ambiental en períodos críticos del desarrollo de un individuo, como la etapa perinatal, afecta el crecimiento y funcionalidad del cerebro conduciendo a alteraciones cognitivas y socio-emotivas. La nutrición, además de ser un determinante de los procesos metabólicos, tiene un rol fundamental en la maduración y el desarrollo del sistema nervioso central. Particularmente, una malnutrición perinatal genera una reprogramación del neurodesarrollo en la descendencia que puede aumentar la vulnerabilidad a ciertas neuropatologías. En este trabajo, se estudió el rol de los microRNAs en el establecimiento de los déficits cognitivos y emotivos derivados de la malnutrición proteica perinatal. Además, se evaluó la potencial reversión fenotípica a través del enriquecimiento ambiental luego del destete.

Se observó una disminución del tamaño hipocampal y un retraso en el desarrollo físico y neurológico, tanto en machos como en hembras, en ratones hipoproteicos. Al evaluar el comportamiento de tipo ansioso, se encontró un aumento de la ansiedad en ratones hipoproteicos. En tests que evalúan la memoria a largo plazo se encontró que los ratones malnutridos recordaban menos que los nutridos normalmente. Tanto el fenotipo de ansiedad como el de memoria de los ratones hipoproteicos pudo ser revertido por una estimulación ambiental durante 5 semanas luego del destete.

Un análisis global de la expresión de miRNAs en el hipotálamo sugirió tres miRNAs (miR-187-3p, miR-132-3p y miR-369-3p) que podrían constituir parte de la base molecular del fenotipo conductual. La expresión de uno de ellos, miR-132-3p, correlacionó negativamente con la expresión de la neurotrofina BDNF. La predicción de procesos biológicos potencialmente afectados por los mRNAs blanco de los miRNAs desregulados por la malnutrición perinatal, mostró a la vía de direccionamiento axonal como una posibilidad.

En base a este resultado, se decidió estudiar el estado general de mielinización del cerebro para poder visualizar si alguna de las vías axónicas principales, que relacionan al hipotálamo con el resto del sistema límbico, se encontraban afectadas por la malnutrición

perinatal. Se observó una disminución en el tamaño del cíngulum en los ratones malnutridos. Siendo el cíngulum una de las vías que conectan al hipotálamo con la corteza prefrontal, se estudió la morfología de los oligodendrocitos corticales para evaluar su capacidad de mielinización. Se encontró una disminución en la complejidad de estas células, pero un aumento en la eficiencia de mielinización en ratones hipoproteicos sometidos al enriquecimiento ambiental respecto de los normales sometidos también al enriquecimiento.

Las alteraciones en la conducta emotiva y cognitiva de ratones malnutridos podrían tener sus bases moleculares en la desregulación de miRNAs que afectan el direccionamiento axonal, potencialmente a través de BDNF. Por otro lado, la reversión podría estar dada, en parte, por el aumento de la eficiencia de mielinización ante el enriquecimiento ambiental. Estos resultados sugieren que es necesaria la estimulación del ambiente para expresar este fenotipo celular. De esta forma, los miRNAs desempeñarían un rol en la neuroplasticidad, permitiendo respuestas adaptativas a ambientes adversos.

# **Role of microRNAs in the establishment of cognitive and emotive deficits derived from perinatal protein malnutrition**

## **Abstract**

Environmental stress during critical developmental periods, such as perinatal, affects the growth and function of the brain leading to cognitive and socio-emotional disturbances. As well as being determinant for metabolic processes, nutrition plays a fundamental role in the maturation and development of the central nervous system. Particularly, a perinatal malnutrition generates neurodevelopmental reprogramming in the offspring which could lead to neuropathological vulnerability. In this work, we studied the role of microRNAs in the establishment of cognitive and emotional deficits resulting from perinatal protein malnutrition. In addition, we evaluated the potential phenotypic reversion through environmental enrichment after weaning.

A decrease in hippocampal size and delayed physical and neurological development, both males and females, in hypoproteic mice was observed. We found an increase in anxiety-like behavior in hypoproteic mice. When subjected to long term memory tests malnourished mice showed impaired memory. Both emotional and cognitive phenotypes in the hypoproteic mice could be reversed by an environmental enrichment.

A global analysis of miRNAs in the hypothalamus suggested three miRNAs (miR-187-3p, miR-132-3p and miR-369-3p) that could be part of the molecular basis of the behavioral phenotype. The expression of one of them, miR-132-3p, was shown to be negatively correlated with BDNF expression. Axon guidance pathway was enriched among the pathways to be potentially regulated by the target mRNAs predicted to interact with altered miRNAs.

Based on this results, we decided to study the general state of brain myelination in order to see if any of the major axonal pathways which relate the hypothalamus to the rest of the limbic system, were affected by perinatal malnutrition. A decrease in cyngulum size was observed in malnourished mice. Since cyngulum is one of the pathways that connect the hypothalamus to the prefrontal cortex, the morphology of cortical oligodendrocytes was studied to evaluate its capacity for myelination. A decrease in the complexity of these cells was found, but also an increase in the efficiency of myelination in hypoproteic mice

subjected to environmental enrichment compared to normal ones also submitted to enrichment.

Alterations in the emotional and cognitive behavior of malnourished mice could have molecular bases in the deregulation of miRNAs that affect axonal targeting, potentially through BDNF. On the other hand, the phenotypic reversal may be due, in part, to the increased efficiency of myelination in face of environmental enrichment. These results suggest that estimation of the environment is necessary to express this cellular phenotype. In this way, miRNAs could play a role in neuroplasticity, allowing adaptive responses to adverse environments.

## Agradecimientos

El proceso de realizar una tesis doctoral es, sin duda, un desafío académico enorme. Sin embargo, lo que viví andando este camino estuvo fundamentalmente asociado a procesos de crecimiento y desafío personal, por lo que significa sostener un proyecto de investigación durante 5 años y, al final, darle forma de tesis. Pero lo más importante, estas experiencias se entrecruzaron con todos los ámbitos de mi vida, justamente, por la intensidad del proceso. Por esta razón, no tengo dudas de que los agradecimientos son extensivos a prácticamente todas las personas con las que compartí estos 5 años de doctorado y también aquellas que, en los años previos, hicieron posible que pueda transitar estos 5 años. Me gustaría agradecer:

A la Universidad de Buenos Aires en general, y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales en particular, por permitir que año tras año se formen en Argentina miles de personas y que esa formación de excelencia esté basada en fondos públicos. Esta realidad, además de enorgullecernos, debería llenarnos de responsabilidad y compromiso para con la sociedad que, accediendo o no a la Universidad, es la que sostiene su funcionamiento.

A Edu, porque es para mí un ejemplo a seguir, tanto a nivel científico como personal. Agradezco que siempre haya sido el colchón que dá seguridad y fortaleza

A todos los integrantes del laboratorio de Neuroepigenética, por hacer que la rutina sea algo felizmente esperable y, a la vez, sorprendente. Creo que, en las relaciones de todos los días, se constituyó un verdadero grupo de amigos. A Laurita, porque con ella dimos los primeros pasos en el aventurado proyecto de malnutrición y, en esa interacción, me enseñó mucho más que a trabajar en un laboratorio. (Y ahora sigo en orden etario) A Nico, por su eterna predisposición a todo. A Marielita, por ser, para el final de mi tesis, lo que fue Laurita para el principio. A Silvi, por su contagiosa emocionalidad y por su compromiso, que admiro. A Nadi, por su escucha y su felicidad, y por marcarme el camino de la salsa. A Tef, por su simpleza y por permitirme mostrarle algunas de las cosas que aprendí. A Octa, por acompañarme en momentos intelectual y personalmente difíciles. A Carito, porque, trabajando con Marielita, hizo posible que la tesis cerrara. A todos ellos, además de lo que puedo agradecerles en relación a mi tesis, les agradezco que hayan sido un sostén para todo.

Además, en sintonía con el grupo de gente que actualmente habita el laboratorio de Neuroepigenética, agradezco a las ex-Cánepas, Dani, Lu, Flopy, Marie y Juli.

A todo el Departamento de Química Biológica, sus investigadores, becarios, docentes, no-docentes y administrativos por hacerme sentir en casa todos los días y permitirme hacer investigación, docencia y extensión en un ambiente excepcional. Al Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, porque, a través de la docencia y la frecuente visita a sus laboratorios, conocí gente muy valiosa.

A los Doctorandos Anónimos, por compartir experiencias y por ponerme en perspectiva para seguir.

A mis amigos de la vida, Nico, Pato, Gordo y Moni por su presencia constante y necesaria. Y a todos los PdF y los amigos del fútbol dominguero.

A Ulises, por ayudarnos a atravesar la carrera y entenderme en todos los ámbitos, convirtiéndose en un amigo indispensable. A Vera, por su cariño y por estar presente en todo momento desde las épocas de Facultad.

A todos los Awaleros, por dejarme expresar, a través del baile, un montón de sensaciones, y por acompañarme en el final de la tesis.

A Ire y Carlos por los momentos compartidos y las charlas esclarecedoras de apoyo constante.

A Anita, por compartir felices años de la vida, en los que nos acompañamos en todo y en los cuales su apoyo fue indispensable para transitar el proceso de tesis.

A toda la familia y amigos que ya son familia, por su presencia incondicional.

A mis viejos y mis hermanos, por ser el primordial sostén emocional de éste y de todos los procesos de mi vida, por permitirme y ayudarme a concretar proyectos, por enseñarme a ser de la forma que elijo ser.

## Publicaciones referidas a esta tesis

Publicación con arbitraje

Berardino BG, Fesser EA, Cánepa ET. **Perinatal protein malnutrition alters expression of miRNA biogenesis genes Xpo5 and Ago2 in mice brain.** *Neurosci Lett.* 2017 Mar 11; 647:38-44; doi: 10.1016/j.neulet.2017.03.012.

Publicación sin arbitraje

Berardino BG, Ferroni NM, Belluscio LM. **Un método para la preparación de pellets a partir de comida en polvo para roedores de laboratorio.** *Boletín AACyTAL.* 2013 Abr; 39° edición.

Manuscrito en preparación

Berardino BG, Gianatiempo O, Fiszbein A, Cánepa ET. **Global analysis of microRNA expression in perinatally malnourished male mice and the environmental enrichment reversal effect.**



## Abreviaturas

**ACG:** Aversión condicionada al gusto.

**ACTH:** Adrenocorticotropina, hormona polipeptídica producida por la hipófisis. Componente importante de la regulación del eje HPA.

**Ago2:** Argonauta 2, componente de la maquinaria de biogénesis de miRNAs. Por sus siglas en inglés, *Argonaute 2*.

**BDNF:** Neurotrofina de la familia de NGF. Por sus siglas en inglés, *brain derived neurotrophic factor*.

**cDNA:** Ácido desoxirribonucleico copia. Por sus siglas en inglés, *copy desoxyribonucleic acid*.

**CLO:** Caja de luz-oscuridad.

**CRH:** Hormona liberadora de corticotropina. Sintetizada por el hipotálamo, regula la secreción de ACTH.

**DAG:** Distancia ano-genital.

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico. Por sus siglas en inglés, *desoxyribonucleic acid*.

**dNTPs:** Desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP).

**Dgcr8:** Síndrome DiGeorge cromosómico de la región 8, componente de la maquinaria de biogénesis de miRNAs. Por sus siglas en inglés, *DiGeorge syndrome chromosomal region 8*.

**EE:** Ambiente enriquecido postdestete.

**GC:** Glucocorticoides.

**GR:** Receptor de glucocorticoides.

**HP:** Dieta con niveles bajos (hipoproteica) de proteínas. El grupo HP puede referirse a la F0 que fue alimentada con esta dieta o a la F1 que estuvo en contacto con la misma durante la preñez y la lactancia.

**HPA:** Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

**LEC:** Laberinto elevado en cruz.

**LTP:** Potenciación de largo plazo. Por sus siglas en inglés, *long-term potentiation*.

**LY:** Laberinto en “Y” con claves espaciales.

**miRNA (o microRNA):** Micro ácido ribonucleico. Por sus siglas en inglés, *micro ribonucleic acid*.

**MR:** Receptor de mineralocorticoides.

**mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero. Por sus siglas en inglés, *messenger ribonucleic acid*.

**NE:** Ambiente normal postdestete.

**NP:** Dieta con niveles normales (control) de proteínas. El grupo NP puede referirse a la F0 que fue alimentada con esta dieta o a la F1 que estuvo en contacto con la misma durante la preñez y la lactancia.

**nt:** nucleótidos.

**pb:** pares de bases.

**PD:** Día postnatal.

**pre-miRNA:** Micro ácido ribonucleico precursor. Por sus siglas en inglés, *precursor micro ribonucleic acid*.

**pri-miRNA:** Micro ácido ribonucleico primario. Por sus siglas en inglés, *primary micro ribonucleic acid*.

**RNA:** Ácido ribonucleico. Por sus siglas en inglés, *ribonucleic acid*.

**RON:** Reconocimiento del objeto novedoso.

**Xpo1:** Exportina 1. Por sus siglas en inglés, *exportin 1*.

**Xpo5:** Exportina 5, componente de la maquinaria de biogénesis de miRNAs. Por sus siglas en inglés, *exportin 5*.



# Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Adaptación y ambiente .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Plasticidad fenotípica.....	3
1.1.2. Efectos maternos .....	4
1.1.3. Plasticidad del desarrollo adaptativa .....	5
1.1.4. Neuroplasticidad .....	6
<b>1.2. Adversidades tempranas .....</b>	<b>6</b>
1.2.1. Periodo postnatal.....	7
1.2.2. Periodo prenatal.....	8
1.2.3. Desarrollo del cerebro y períodos críticos .....	9
1.2.4. Teorías e hipótesis .....	11
<b>1.3. Eje HPA como sensor de adversidades .....</b>	<b>15</b>
1.3.1. Desarrollo y funcionalidad del eje HPA.....	15
1.3.2. Glucocorticoides.....	18
1.3.3. Programación del eje HPA.....	19
1.3.4. El eje HPA ante el estrés crónico.....	20
1.3.5. El eje HPA y su relación con el sistema límbico.....	21
<b>1.4. Mecanismos epigenéticos como interfase entre las adversidades y sus consecuencias .....</b>	<b>21</b>
1.4.1. Mecanismos epigenéticos .....	22
1.4.2. Estructura, función y relevancia de los microRNAs .....	24
1.4.3. Biogénesis de microRNAs.....	26
1.4.4. MicroRNAs y su relación con los estímulos ambientales .....	30
1.4.5. Epigenética ante las adversidades tempranas.....	31
<b>1.5. Malnutrición como adversidad temprana.....</b>	<b>32</b>
1.5.1. Malnutrición proteica .....	33
1.5.2. Efectos de la malnutrición proteica en el desarrollo del cerebro.....	33
1.5.3. Efectos de la malnutrición proteica a nivel epigenético.....	34
<b>1.6. Resumen de resultados de nuestro laboratorio y de otros con respecto a la malnutrición proteica perinatal .....</b>	<b>35</b>
<b>1.7. Reversión fenotípica.....</b>	<b>37</b>
1.7.1. Reversión ambiental a través de un ambiente enriquecido.....	38
1.7.2. Intervenciones tempranas.....	40

1.7.3.	Reversión genética y farmacológica .....	41
<b>2.</b>	<b>Objetivos e hipótesis .....</b>	<b>43</b>
2.1.	<b>Objetivo general .....</b>	<b>43</b>
2.2.	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>43</b>
2.2.1.	Reversión del fenotipo conductual.....	43
2.2.2.	Rol de microRNAs .....	43
2.2.3.	Procesos celulares implicados .....	43
2.3.	<b>Hipótesis .....</b>	<b>43</b>
<b>3.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>45</b>
3.1.	<b>Caracterización del modelo de malnutrición perinatal .....</b>	<b>45</b>
3.1.1.	Peso corporal.....	45
3.1.2.	Distancia ano-genital (DAG) .....	45
3.1.3.	Preferencia por el olor materno.....	47
3.1.4.	Desarrollo físico y neurológico.....	48
3.1.5.	Peso del cerebro.....	50
3.1.6.	Pesos y consumo de la F0 .....	51
3.2.	<b>Reversión del comportamiento .....</b>	<b>52</b>
3.2.1.	Ansiedad: CLO y LEC.....	53
3.2.2.	Memoria: LY, RON y ACG.....	55
3.3.	<b>Biogénesis de miRNAs .....</b>	<b>57</b>
3.3.1.	Expresión de los componentes de la maquinaria de biogénesis de miRNAs .....	58
3.3.2.	Expresión de miRNAs.....	62
3.4.	<b>Secuenciación masiva de RNAs pequeños .....</b>	<b>64</b>
3.4.1.	Obtención de RNAs y características de la secuenciación.....	64
3.4.2.	Normalización y filtrado.....	68
3.4.3.	Análisis de expresión diferencial de miRNAs.....	71
3.4.4.	Validación .....	76
3.4.5.	Reversión.....	77
3.4.6.	Análisis bioinformático .....	79
3.5.	<b>Mielinización.....</b>	<b>83</b>
3.5.1.	Evaluación general del estado de mielinización .....	84
3.5.2.	Estudio de la morfología de oligodendrocitos en la mPFC .....	86

<b>4. Discusión y Conclusiones .....</b>	<b>93</b>
<b>4.1. Complejidad del modelo de malnutrición .....</b>	<b>93</b>
4.1.1. Respuestas fenotípicas adaptativas.....	93
4.1.2. Variabilidad en los resultados relacionados con el funcionamiento del eje HPA .....	94
<b>4.2. Cambios fenotípicos durante el desarrollo inducidos por la malnutrición perinatal .....</b>	<b>95</b>
4.2.1. Peso corporal.....	95
4.2.2. Desarrollo físico y neurológico.....	95
4.2.3. Peso del cerebro y del hipocampo .....	96
<b>4.3. Hormonas sexuales y dimorfismo sexual .....</b>	<b>97</b>
4.3.1. Distancia ano-genital (DAG) .....	97
4.3.2. Eje HPA.....	98
<b>4.4. Reversión fenotípica del comportamiento .....</b>	<b>99</b>
4.4.1. Ansiedad y regulación del estrés .....	99
4.4.2. Memoria .....	101
<b>4.5. Rol de los microRNAs .....</b>	<b>102</b>
4.5.1. Efecto de la desregulación de la maquinaria de biogénesis de miRNAs .	103
4.5.2. miRNAs desregulados por la malnutrición perinatal.....	104
4.5.3. Reversión de la expresión de miRNAs por EE.....	110
<b>4.6. Cambios fenotípicos asociados al direccionamiento axonal y la mielinización .....</b>	<b>111</b>
4.6.1. Vía de orientación axonal .....	111
4.6.2. Efecto de la malnutrición perinatal sobre la mielinización.....	113
4.6.3. Efecto de la malnutrición perinatal sobre la morfología de oligodendrocitos.....	114
<b>4.7. Conclusiones finales y perspectivas .....</b>	<b>115</b>
<b>5. Materiales y Métodos .....</b>	<b>117</b>
<b>5.1. Animales .....</b>	<b>117</b>
<b>5.2. Ética en el trabajo con animales .....</b>	<b>117</b>
<b>5.3. Dietas y modelo de malnutrición perinatal.....</b>	<b>118</b>
<b>5.4. Enriquecimiento ambiental .....</b>	<b>119</b>
<b>5.5. Evaluación del desarrollo físico .....</b>	<b>120</b>

5.5.1.	Pesos y parámetros morfológicos.....	120
5.5.2.	Distancia ano-genital (DAG) .....	120
5.5.3.	Pesos del cerebro .....	121
<b>5.6.</b>	<b>Evaluación del consumo de la F0 .....</b>	<b>121</b>
<b>5.7.</b>	<b>Tests de comportamiento .....</b>	<b>121</b>
5.7.1.	Caja de luz-oscuridad (CLO).....	122
5.7.2.	Laberinto elevado en cruz (LEC) .....	122
5.7.3.	Campo abierto (CA) .....	123
5.7.4.	Laberinto en Y con claves espaciales (LY).....	123
5.7.5.	Reconocimiento de objeto novedoso (RON) .....	124
5.7.6.	Aversión condicionada al gusto (ACG).....	124
<b>5.8.</b>	<b>Análisis de la expresión génica .....</b>	<b>125</b>
5.8.1.	Extracción de tejidos .....	125
5.8.2.	Extracción de RNA .....	125
5.8.3.	Síntesis de cDNA.....	126
5.8.4.	PCR en tiempo real (qPCR) .....	127
5.8.5.	Electroforesis en gel de agarosa.....	128
<b>5.9.</b>	<b>Secuenciación masiva de RNAs pequeños .....</b>	<b>128</b>
5.9.1.	Obtención de RNAs pequeños para secuenciación.....	129
5.9.2.	Preparación de bibliotecas TruSeq.....	129
5.9.3.	Secuenciación masiva en HiSeq 1500 .....	129
5.9.4.	Análisis bioinformático .....	130
<b>5.10.</b>	<b>Análisis de la morfología de oligodendrocitos.....</b>	<b>131</b>
5.10.1.	Recolección de tejido .....	131
5.10.2.	Toma de imágenes con microscopía confocal.....	131
5.10.3.	Reconstrucción tridimensional de los oligodendrocitos .....	131
<b>5.11.</b>	<b>Tinciones histológicas .....</b>	<b>132</b>
5.11.1.	Tinción Klüver-Barrera – Luxol Fast Blue .....	132
<b>5.12.</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>133</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>135</b>
<b>7.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>163</b>

# 1. Introducción

## 1.1. Adaptación y ambiente

Uno de los principios fundamentales de la naturaleza que impacta en la evolución de las especies es el hecho de que el medio ambiente está en constante cambio y que nada resulta estable a tiempos evolutivos. En respuesta a esta situación, los seres vivos han evolucionado con diferentes estrategias que aseguran, por un lado, una adaptación óptima al ambiente actual y, por otro lado, una plasticidad para adaptarse a ambientes cambiantes, es decir, ajustando el fenotipo para que pueda lidiar con las demandas ambientales. Esta plasticidad fenotípica de adaptación, que para cada rasgo y para cada individuo tiene un rango limitado de posibilidades (norma de reacción), es la base para el concepto de *fitness* o aptitud Darwiniana (West-Eberhard, 2005). La “teoría genética de selección natural” establece que la evolución procede por selección natural de mutaciones al azar, lo cual constituye la base de la “síntesis neo-Darwiniana”. Consistente con esta teoría, la selección natural, es decir, las diferencias en el *fitness* de las especies (éxito reproductivo diferencial), es a veces definido en términos del genotipo más que del fenotipo (Orr, 2005). Sin embargo, en los últimos años fue quedando claro que el fenotipo del individuo, y no el genotipo ni el gen, es el objeto de selección (Mayr, 2004; West-Eberhard, 2005).

Durante muchos años, y bajo la motivación generada por la descripción del dogma central de la biología molecular (Crick, 1970), el centro de la escena en la determinación de un fenotipo estaba dominado por los genes, en particular, por el DNA. Esta concepción de la biología resultó elegantemente consistente con la corriente gradualista de la evolución, que sostenía que los cambios evolutivos se daban de manera gradual por mutaciones al azar en el DNA que generaban pequeños cambios que se iban acumulando para, gradualmente, ir moldeando el fenotipo de las especies en base al *fitness* generado por el resultado de esas mutaciones.

Descubrimientos como el *splicing* o las secuencias regulatorias de genes generaron, por un lado, una idea de expresión modular (a través de la inclusión o exclusión de exones enteros) y, por otro lado, una jerarquización de la función del ambiente en la regulación de dicha expresión, dado que las secuencias regulatorias eran utilizadas por factores de transcripción regulados desde el ambiente (ya sea, el ambiente celular interno, el ambiente del individuo o el ambiente por fuera del individuo). Además, el descubrimiento del

número relativamente bajo de genes que componen el genoma humano (Lander et al., 2001) renovó el debate sobre el rol que pueden tomar los factores ambientales en determinar el fenotipo de un individuo, como así también, en la etiología de las enfermedades.

Estos descubrimientos ayudaron a sostener la teoría que se opuso a la gradualista que fue la propuesta por Stephen Jay Gould, Niles Eldredge y Richard Lewontin (Gould and Eldredge, 1972; Gould and Lewontin, 1979) llamada “teoría de los equilibrios puntuados”. La misma se basaba en estudios de fósiles llevados a cabo por Gould, y sostenía que los cambios evolutivos se producían de manera rápida y brusca luego de un período de tiempo sin cambios (equilibrio). La adaptabilidad de los organismos se ponía en jaque debido a que no todos los cambios generaban una ventaja adaptativa y algunos rasgos ni siquiera tenían un claro sentido adaptativo (eran meramente “enjuntas”, término arquitectónico que se usa para denominar a las zonas de material entre dos arcos de un edificio). Notablemente, la contraposición entre el gradualismo y los equilibrios puntuados reflejó una discusión que también ocupaba esferas político-ideológicas. Las implicancias políticas del gradualismo, en base a la adaptación al ambiente de forma competitiva por parte de los individuos, radicaban en una sobrevaloración de la competencia y la agresión, ventajas selectivas, dominación (particularmente, de los hombres) y jerarquización social. El gradualismo justificaba un mundo dominado por hombres, estratificado y competitivo, consistente con un sistema socio-político que generaba desigualdades y que pretendía ser sostenido por los impulsores de esta corriente de pensamiento. En cambio, la teoría del equilibrio puntuado, no inocentemente, refleja la minimización de la competencia entre individuos favoreciendo la cooperación. Los largos períodos de tiempo sin cambios evolutivos son interrumpidos por cambios bruscos asimilables a las revoluciones.

De esta forma, las corrientes de pensamiento de la época movieron el foco de análisis posicionado en el DNA, el genotipo, hacia el ambiente como factor desencadenante de los cambios evolutivos y como piedra fundamental para la adaptación fenotípica, siendo el fenotipo el objeto de selección. De todos modos, cualquier nueva contribución, tanto si proviene del genoma, como una mutación, o del ambiente, como un cambio de temperatura, un patógeno, o una opinión de otro individuo, tiene un efecto sobre el desarrollo sólo si el fenotipo preexistente es sensible a la misma. Sin una plasticidad fenotípica los meros genes o las imposiciones ambientales no tendrían efecto sobre la evolución (West-Eberhard, 2005).

### 1.1.1. *Plasticidad fenotípica*

El concepto de plasticidad fenotípica es engañosamente simple, y ha sido definido de formas diversas por diferentes autores (Whitman and Agrawal, 2009). Una definición muy utilizada que puede darse a la plasticidad fenotípica es la habilidad de un organismo para alterar su fisiología, morfología y desarrollo en respuesta a cambios ambientales (Callahan et al., 1997). Sin embargo, la plasticidad puede analizarse dentro de todas las categorías de niveles de organización de la vida en la tierra, como ser, la celular, la individual, la poblacional y la evolutiva. Además, el concepto de plasticidad fenotípica es usado para diferentes dimensiones del fenotipo, como la morfología, la fisiología, la historia de vida, el comportamiento, y para situaciones en las que el fenotipo se modifica en respuesta a variaciones del ambiente externo o interno (Forsman, 2014).

Por ejemplo, una forma de plasticidad intraindividual, común a casi todos los organismos multicelulares, es la pronunciada diferenciación fenotípica entre las células que componen los diferentes órganos o tipos de tejido (Sánchez Alvarado and Yamanaka, 2014). Las células que componen la sangre, los huesos, nervios y músculos dentro de un individuo son extremadamente diferentes en cuanto a su fenotipo, pero todas comparten un (casi) idéntico set de genes (Newman and Müller, 2000; Schlichting, 2003).

Por otro lado, el término “flexibilidad fenotípica”, como forma de plasticidad, es utilizado principalmente para referirse a los cambios reversibles intraindividuales de rasgos fisiológicos, morfológicos y de historia de vida dependientes del contexto ambiental (Piersma and Drent, 2003). Ejemplos de este concepto incluyen a los cambios metabólicos y endócrinos, cambios en el tamaño de ciertas partes del cuerpo y sistemas de órganos en relación a las condiciones reproductivas y las demandas metabólicas, cambios en los patrones de color en relación a la estación del año, cambios individuales en la temporalidad de las actividades reproductivas según las condiciones climáticas, o cambios en el número de descendientes entre eventos reproductivos secuenciales. La flexibilidad fenotípica también se puede aplicar a cambios en los rasgos conductuales, por ejemplo, a los que se producen como resultado de un aprendizaje o experiencia dependiendo de la presencia o ausencia de predadores (Forsman, 2014; Snell-Rood, 2013).

Particularmente, dentro de los conceptos que engloba la plasticidad fenotípica, existe un término que conviene dejar claro, el de “plasticidad del desarrollo”. Este concepto involucra las variaciones fenotípicas, generalmente irreversibles, en los rasgos de los individuos (o genotipos) que resultan de modificaciones inducidas por el ambiente durante el desarrollo y el crecimiento. La plasticidad del desarrollo, por lo tanto, opera sobre los

rasgos que se mantienen mayormente fijados luego de la madurez, como el tamaño del cuerpo, el número de vértebras y varias estructuras de defensa inducidas por la presencia de predadores. El rango de posibles fenotipos que tienen los individuos para desarrollar según el ambiente constituye una norma de reacción, las cuales son esenciales en este campo de estudio (Pigliucci, 2001; West-Eberhard, 2003). Además, la plasticidad del desarrollo puede definirse como una forma de plasticidad fenotípica en un rango temporal determinado. Los organismos responden a los desafíos del ambiente en un rango de escalas temporales, que van desde los segundos (mecanismos homeostáticos) a los milenios (selección natural o la deriva génica). En escalas de tiempo intermedias, se encuentran los mecanismos de plasticidad del desarrollo que están determinados, como se dijo, por las claves que reciben los individuos durante su crecimiento y formación (Gluckman et al., 2009).

La plasticidad también puede involucrar mecanismos que operan a través de generaciones. Cuando el ambiente responsable de inducir la respuesta fenotípica viene dado por un parental (hembra), la plasticidad del desarrollo es usualmente denominada “efecto materno” o “plasticidad entre generaciones” (Mousseau and Fox, 1998).

### 1.1.2. *Efectos maternos*

Las causas y consecuencias de la plasticidad fenotípica entre individuos son de especial interés debido a que es su variación la que provee la materia prima para la selección natural. Estamos acostumbrados a pensar al fenotipo individual como el resultado de su propio genotipo más el efecto del ambiente experimentado durante el desarrollo. Sin embargo, en los últimos años se ha hecho evidente que el fenotipo individual es frecuentemente y, a veces, dramáticamente, influenciado también por las experiencias individuales de otros individuos de la población. Muy a menudo este tipo de interacciones interindividuales ocurren entre madres y sus descendencias. La medida en la cual el ambiente y el comportamiento materno influyen el fenotipo de la descendencia es determinante para que esos efectos maternos se moldeen por la acción de la selección natural (Mousseau and Fox, 1998).

El comportamiento materno para con la descendencia es además determinante para el *fitness* de la misma. Pero aún en especies que no exhiben cuidado parental directo, cuándo, dónde y cómo las madres posicionan su descendencia es crucial para su éxito (Bernardo, 1996). Por ejemplo, una hembra herbívora que posiciona sus huevos en una planta huésped apropiada en un momento apropiado tiene más chances de que su descendencia tenga un *fitness* más alto que una hembra que dispone sus huevos en un lugar

y momento al azar. De la misma forma, la dispersión de semillas es generalmente controlada por la planta hembra y no es al azar (Mousseau and Fox, 1998).

### 1.1.3. *Plasticidad del desarrollo adaptativa*

¿En qué medida la plasticidad del desarrollo mediada por la madre (efectos maternos) es adaptativa para los individuos? Existen dos hipótesis para explicar por qué la plasticidad del desarrollo puede ser adaptativa: la “hipótesis de la información” y la “hipótesis somática basada en el estado”. En la literatura de la plasticidad fenotípica humana (Bateson et al., 2014) la primera suele tener más importancia, mientras que no suelen analizarse los efectos de la segunda.

La hipótesis de la información se basa en la presencia de una señal o clave que se presenta durante el desarrollo (que no necesariamente tiene un sentido positivo o negativo), y que señala cuál es la probabilidad de que se presente un ambiente determinado en el futuro, es decir, constituye un “pronóstico”. Luego, la presencia de dicha señal durante el desarrollo genera un fenotipo más adaptado a ese ambiente predicho por la señal.

La hipótesis somática basada en el estado sugiere que, ante la presencia de una contribución ambiental que tiene un efecto generalizado en el desarrollo del individuo, alguna variable de estado somático se altera de forma duradera. Una variable de estado somático es un parámetro con amplias implicancias en el *fitness* como, por ejemplo, el tamaño, la fuerza muscular, la capacidad de los órganos o el grado del daño al DNA. Para poder hablar de adaptabilidad, a esta hipótesis se le agrega otro componente que es el fenotipo conductual que podrá o no ser adaptativo. Por ejemplo, si hablamos del tamaño del organismo como la variable de estado somático, el fenotipo conductual podría ser la agresión. En este caso, un individuo grande puede o no ser agresivo, y un individuo pequeño, también. En principio, la variable de estado somático y el fenotipo son independientes. Pero lo que sostiene esta hipótesis es que, para que la plasticidad fenotípica sea adaptativa, lo que debe evolucionar y, por tanto, someterse a selección, es el mecanismo que vincula ambas. Es decir, retomando el ejemplo, el individuo que durante su desarrollo se encuentre grande debería ser agresivo y el que se encuentre pequeño, no agresivo. Para que esta regla sea adaptativa, el fenotipo óptimo debe depender del estado somático (Nettle and Bateson, 2015).

#### 1.1.4. *Neuroplasticidad*

Cuando la plasticidad del desarrollo se evidencia fenotípicamente en la organización y funcionamiento del sistema nervioso central (SNC), se denomina neuroplasticidad. Este término se refiere a la capacidad del SNC de madurar y cambiar estructural y funcionalmente en respuesta al ambiente. La neuroplasticidad del desarrollo involucra cambios en la expresión de genes, en la neurogénesis, en la migración de neuronas, en la formación de sinapsis y los circuitos neuronales que llevan a la adquisición de comportamientos, y, por último, a la adaptación al ambiente a través del aprendizaje y la memoria (Ismail et al., 2017; Johnston, 2004; Johnston et al., 2009).

La neuroplasticidad incluye un tipo de plasticidad, la sináptica, que depende de las experiencias y que representa la base neurobiológica de la formación del aprendizaje y la memoria. La plasticidad sináptica está integrada por mecanismos que involucran el crecimiento axonal, el crecimiento de las espinas dendríticas, la formación de botones sinápticos y la formación y eliminación de sinapsis. Los nuevos aprendizajes son almacenados en las redes sinápticas que son dinámicas en el tiempo, aún en adultos. Las sinapsis viejas son reemplazadas por nuevas que se adquieren en base a las experiencias vividas (Ismail et al., 2017).

Una noción muy extendida en el campo de la plasticidad es que el cerebro en desarrollo tiene una mayor capacidad intrínseca para la plasticidad comparado con el adulto. Esta noción se basa en observaciones clínicas sobre niños que, comparados con los adultos, muestran mayor capacidad para aprender un segundo idioma (Klein et al., 2014; Li et al., 2014), facilidad para adquirir habilidades motoras, por ejemplo, por la práctica musical temprana (Barrett et al., 2013), y mayor capacidad para recuperarse de lesiones (Kastrup et al., 2000). Sin embargo, a diferencia de lo que se creyó durante mucho tiempo, el cerebro adulto no es estático y guarda todavía cierta neuroplasticidad (ver Introducción 1.7).

## 1.2. **Adversidades tempranas**

Los efectos ambientales que impactan sobre el desarrollo han sido analizados tradicionalmente en el contexto de desorganizaciones mayores, como ser, las causadas por teratógenos, maduración prematura y retraso del crecimiento. Sin embargo, hace unos años los estudios están enfocándose en el rol de la plasticidad del desarrollo, que provee a los

individuos de la flexibilidad para ajustar la trayectoria de su desarrollo a las demandas del ambiente (Gluckman et al., 2009). Estos efectos ambientales sobre el desarrollo pueden dividirse temporalmente en dos períodos: el postnatal y el prenatal. Sin embargo, existen “períodos críticos” durante los cuales los efectos de la exposición a una adversidad pueden tener impactos más profundos sobre el desarrollo.

### 1.2.1. *Periodo postnatal*

Las interacciones entre madre y descendencia durante el primer período postnatal han sido estudiadas durante los últimos 60 años en roedores y primates no humanos para evaluar el significado que pueden tener las experiencias tempranas en las diferencias individuales en el adulto en cuanto a la actividad neuroendócrina, las respuestas emocionales, el desempeño cognitivo y la conducta. Dos grupos de experimentos sentaron las bases para el estudio del efecto de las adversidades tempranas. Por un lado, los estudios sobre el impacto de manipulaciones tempranas, como el “manipuleo” (*handling*) neonatal y la separación materna (Levine, 2005); y, por otro lado, el estudio de las variaciones naturales del cuidado materno (Meaney, 2001).

Notablemente, los estudios de Seymour Levine sobre las experiencias tempranas estuvieron inspirados en la teoría de Sigmund Freud acerca de que los traumas tempranos podrían tener efectos duraderos en el comportamiento al formar la base de la ansiedad (Freud and Bunker, 1936) y del desarrollo de la personalidad (Freud and Strachey, 1949). Una de las conclusiones finales de los estudios del laboratorio de Levine, consistió en que los efectos adversos de la ausencia de estimulación temprana a través del *handling*, “se podrían atribuir a un aumento en la susceptibilidad a las alteraciones emocionales resultado de la restricción de experiencias en la infancia”. Si bien esta idea generaba cierta disparidad con la teoría de Freud sobre el efecto del trauma temprano, el legado de Levine es que las experiencias tempranas, especialmente, el estrés y las alteraciones en las interacciones con la madre, afectan fuertemente el desarrollo del individuo, modificando la forma en que los organismos responderán a los desafíos que proponga el ambiente futuro (Stern et al., 2010). Posteriormente, los estudios de Michael Meaney demostraron que los efectos positivos del *handling* observados por Levine se debían a un aumento del cuidado materno cuando las ratas eran vueltas a juntar con sus madres (Champagne, 2008; Liu and Meaney, 1997), lo cual llevó a Meaney a estudiar la predisposición natural de las madres al cuidado de sus crías. Sus estudios concluyeron que existía un fenómeno de herencia de caracteres

adquiridos dado que las hijas de madres que dispensaban un alto cuidado presentaban un comportamiento de alto cuidado materno ante sus crías.

El desarrollo de los individuos ocurre típicamente en un contexto social que involucra parentales, hermanos y otros cuidadores o miembros del grupo. Este contexto provee las necesidades del desarrollo (como alimentación, estimulación sensorial, calidez emocional) pero también es útil para proveer claves acerca del tipo de ambiente en el cual se desarrollará la vida (ver “hipótesis de la información” en Introducción 1.1.3). Dado el valor potencial de estas señales ambientales para predecir el contexto socioeconómico presente y futuro, es lógico pensar que los efectos en el ambiente temprano tengan un impacto sostenido en la biología de los organismos, mediado por la plasticidad fenotípica del desarrollo (Kundakovic and Champagne, 2014).

### 1.2.2. *Periodo prenatal*

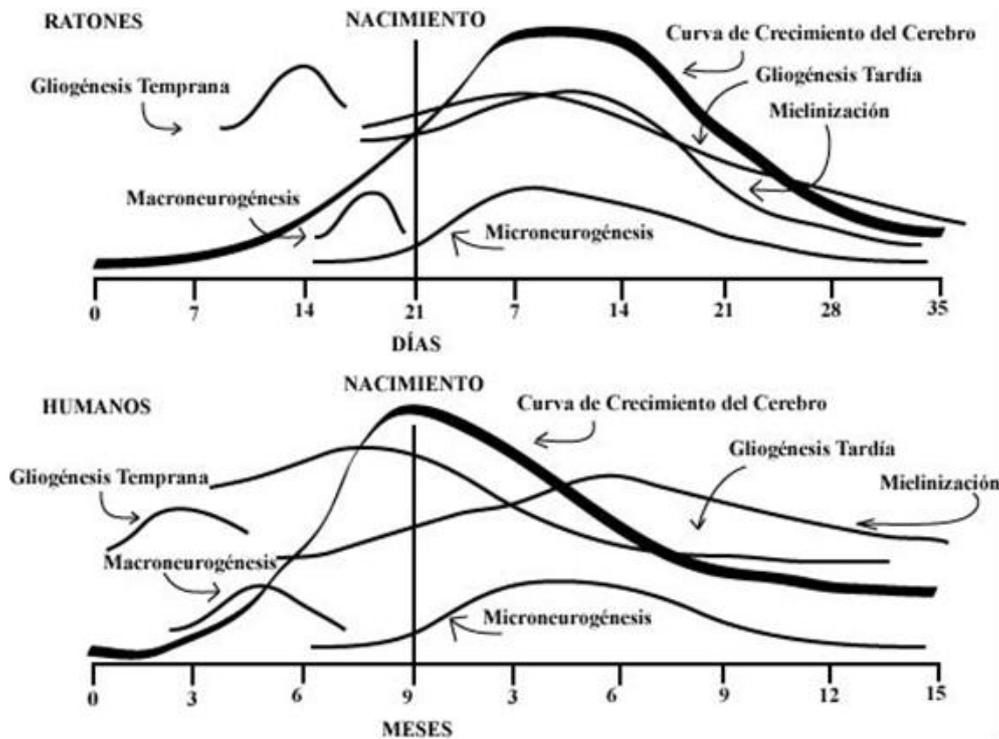
Durante el periodo prenatal los organismos en desarrollo comparten su ambiente con el de sus madres. Es por esto que cualquier estímulo ambiental que afecte a las madres en gestación afectará probablemente a las crías en desarrollo. Particularmente, la sangre del feto es la misma que la sangre materna, por lo que cualquier cambio en su composición será percibido por la descendencia. Uno de los dominios dentro de los cuales los factores maternos operan sobre las crías es el hormonal. De este modo, si una madre sufre algún tipo de estrés, secretará más glucocorticoides al sistema circulatorio que comparte con su descendencia y estas hormonas impactarán sobre el feto en desarrollo. La exposición del feto a glucocorticoides tiene numerosos efectos en la formación de varios órganos pero, en particular, uno de ellos es la disminución del tamaño del hipotálamo (ver Introducción 1.2), lo cual genera una reducción en el silenciamiento de la respuesta a estrés. De esta forma, los individuos expuestos a esta hormona durante el desarrollo, presentarán una mayor exposición a glucocorticoides en su sangre por no poder recaptarlo normalmente. Notablemente, si ese individuo es una hembra, y la exposición a glucocorticoides se produce durante la gestación de su descendencia, la disminución en la respuesta a estrés se heredará como un carácter adquirido.

Un ejemplo interesante de los efectos del ambiente prenatal en el desarrollo lo constituye la exposición diferencial a hormonas según la posición de los fetos en el útero materno. En ratas y ratones, los embriones se disponen espacialmente uno al lado del otro y el sistema circulatorio de las madres gestando tiene una estructura tal que cada feto comparte sangre de composición más parecida con sus hermanos adyacentes que con los

demás. Esta característica estructural genera que un feto hembra esté expuesto a diferentes hormonas si sus hermanos adyacentes son machos o si son hembras. En caso de que sean machos, esa hembra alcanzará la pubertad a una edad más tardía que si sus hermanos dispuestos a sus lados en el útero materno fueran hembras (vom Saal, 1989a; Vom Saal, 1989b).

### 1.2.3. *Desarrollo del cerebro y períodos críticos*

En humanos, el desarrollo del cerebro es complejo y abarca toda la niñez y la adolescencia. La temporalidad de los eventos que se suceden es dependiente del proceso biológico considerado. Partes del tubo neural se desarrollan tan sólo 5 semanas después de la concepción, y el desarrollo de la corteza es evidente recién hacia la mitad de la gestación (Nyaradi et al., 2013). Desde la gestación tardía hasta los 2 años de edad, se produce un sustancial crecimiento del cerebro, seguido de incrementos más graduales en el número de neuronas (Nyaradi et al., 2013). El número de sinapsis en la corteza cerebral alcanza un pico durante los primeros años de vida y luego llega a un *plateau* y declina en la niñez tardía y adolescencia. A lo largo de la niñez y la adolescencia, la mielinización ocurre gradualmente, aislando a los axones e incrementando la velocidad de sincronización del procesamiento neuronal (Bangalore, 2007). Además, la mielinización ocurre a diferentes velocidades en cada región del cerebro. Por ejemplo, la corteza prefrontal se desarrolla rápidamente en los primeros 2 años de vida, entre los 7 y los 9 años y de nuevo en la mitad de la adolescencia, y luego continúa hasta la tercera década de vida (Lenroot and Giedd, 2006; Nyaradi et al., 2013). Las estructuras subcorticales (ver Introducción 1.3.5), como la amígdala y el hipocampo incrementan su volumen hasta los 30 años, punto en el cual llega a un *plateau* y luego declina gradualmente (Johnson et al., 2016; Nyaradi et al., 2013). En roedores el desarrollo del cerebro presenta una escala temporal muy diferente y, además, los eventos se suceden en otros tiempos relativos al momento del nacimiento (suelen tener un desarrollo más postnatal, mientras que los humanos tienden a desarrollar todo su cerebro durante la prenatalidad). Sin embargo, por estar relativamente conservado en la evolución de mamíferos, pueden establecerse analogías entre el desarrollo de los grandes procesos biológicos que ocurren en la formación de roedores y humanos (**Figura 1**).



**Figura 1 | Comparación de los procesos del desarrollo del cerebro entre ratones y humanos.**

Curvas comparativas de la tasa, duración e inicio de los diferentes procesos de desarrollo, superpuestas con la curva de crecimiento del tamaño del cerebro en negrita. Gliogénesis temprana: glía radial; gliogénesis tardía: oligodendroglía; macroneurogénesis: neuronas piramidales; microneurogénesis: células granulares del giro dentado; bulbo olfatorio y cerebelo. Adaptado de [Morgane et al., 2002](#).

En general, la sensibilidad a los estímulos ambientales, ya sean positivos o negativos, está intensificada durante los períodos de rápido desarrollo cerebral. Como se vio hasta ahora, el contexto ambiental del desarrollo es determinante para el funcionamiento de los mecanismos biológicos en la salud y en la enfermedad. Un “período crítico” se refiere a una ventana temporal en donde los cambios del desarrollo del organismo que generan una creciente complejidad, una mayor plasticidad y un funcionamiento más eficiente ocurren rápidamente y pueden ser alterados positiva o negativamente. Estos cambios durante los períodos críticos se denominan en su conjunto con el término “programación”, y subyacen a los orígenes de las enfermedades durante la niñez y la adultez ([Rubin, 2015](#)).

En una definición más neurofisiológica del término, un periodo crítico es una ventana temporal durante la cual el efecto de las experiencias en el desarrollo del cerebro es particularmente profundo y puede modular los circuitos neuronales. En particular, la neurogénesis y la sinaptogénesis son procesos biológicos que están sujetos a estos períodos

críticos en los cuales el cerebro es más sensible a los cambios (Ismail et al., 2017; Meredith, 2015).

Por ejemplo, el cerebro del embrión tiene, mayoritariamente, dos tipos de subunidades de receptores de glutamato NMDAR, la GluN2B y la GluN2D. Durante el periodo prenatal la subunidad GluN2B es la dominante. La composición de subunidades de NMDAR sufre una modificación durante las primeras semanas de vida en humanos, haciendo un intercambio de subunidades que reemplaza a la GluN2B por la GluN2A. Esto ocurre durante una ventana temporal que coincide fisiológicamente con los períodos críticos para la maduración de sinapsis y para el cambio en las propiedades electrofisiológicas que llevan a la formación y adquisición de aprendizajes. El intercambio de subunidades durante el desarrollo frena la maduración prematura de sinapsis sugiriendo un rol crucial en la plasticidad sináptica dependiente de la experiencia (Paoletti et al., 2013). Los receptores GABA sufren también un intercambio de función similar durante la vida postnatal, constituyendo otro periodo crítico (Ben-Ari et al., 1997).

Recientemente, y en algunos casos, se ha comenzado a hablar de “períodos sensibles” en lugar de “períodos críticos”. Ambos términos definen momentos importantes de organización estructural y funcional neural, pero los períodos sensibles tienen una duración mayor y más difícil de establecer a partir de las evidencias experimentales disponibles. Si bien los eventos negativos ambientales por privación o presencia de un agente estresante pueden modificar la organización de las funciones complejas, las oportunidades de reorganización plástica y de aprendizaje continúan abiertas, aunque son menos libres. En otros términos, refieren no sólo a una etapa durante la cual el cerebro es especialmente sensible a ciertos estímulos ambientales, sino también a una ventana de tiempo durante la cual el cerebro es más receptivo a la experiencia que contribuye a su formación (Michel and Tyler, 2005).

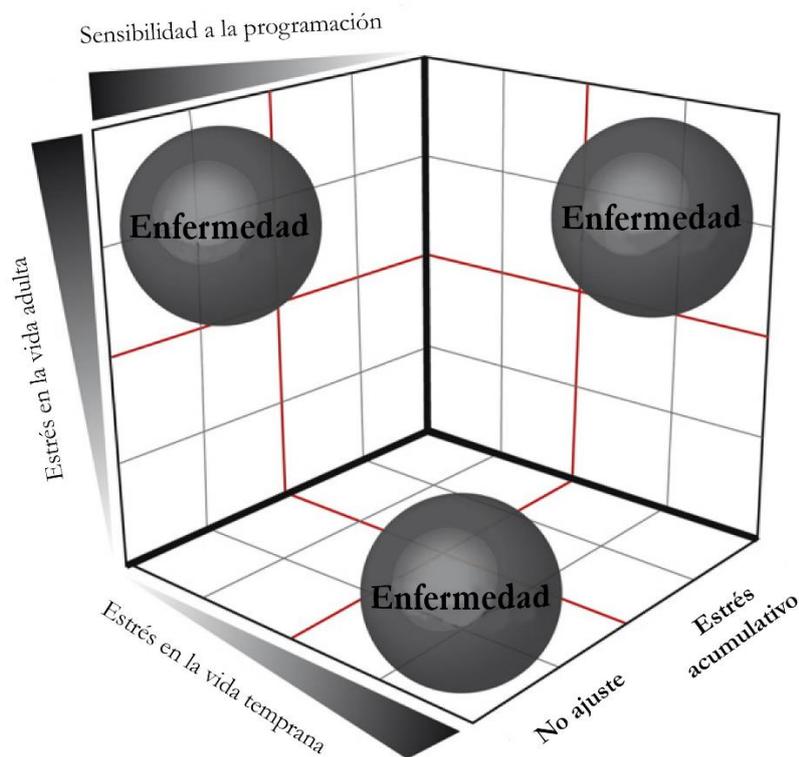
#### 1.2.4. *Teorías e hipótesis*

Teniendo en cuenta los períodos críticos del desarrollo, particularmente, para el sistema nervioso, resulta crucial entender cómo el ambiente postnatal programa el riesgo a contraer enfermedades (Bale et al., 2010). Varios estudios recientes han indicado que la etiología de numerosas enfermedades relacionadas con el cerebro es a menudo multifactorial e implica interacciones entre las experiencias de vida y los genes. Tratar de entender cómo las respuestas plásticas de los fenotipos (plasticidad del desarrollo) se amoldan a las presiones ambientales es un área de investigación en disciplinas que van

desde la ecología y la biología evolutiva a la fisiología y la genética molecular. El intercambio entre los campos holísticos y reduccionistas es esencial para abordar estos temas (Laviola et al., 2008). La pregunta entonces que se intenta responder parece simple, pero requirió de cambios paradigmáticos en el estudio de las disciplinas involucradas y de una interacción entre ellas para empezar a entender su respuesta: ¿Cómo afecta el ambiente durante la vida temprana a los estados de salud y enfermedad en el adulto?

La evidencia muestra una asociación estrecha entre las adversidades y las psicopatologías (Kendler et al., 1999). De acuerdo con estas observaciones, la “hipótesis del estrés acumulativo” postula que, si una acumulación de contribuciones estresantes durante la vida excede un cierto nivel umbral, se intensifica el desarrollo de psicopatologías (McEwen, 1998). Es decir que la acumulación de situaciones de estrés va produciendo un desgaste en los sistemas fisiológicos del organismo lo que desemboca en la enfermedad. Alternativamente, desde un punto de vista evolutivo, las experiencias tempranas podrían inducir cambios en base a la plasticidad del desarrollo adaptativa (Gluckman et al., 2009). En este caso, la plasticidad fenotípica evoluciona de forma tal de ajustarse al ambiente predicho (ver Introducción 1.1.3). De esta manera, un desajuste entre el fenotipo resultante de la plasticidad y la habilidad para lidiar con el ambiente presente incrementa el riesgo de enfermedades, debido a la programación del desarrollo. Este último modelo de relación entre la vida temprana y la susceptibilidad a patologías durante la vida es conocido como “hipótesis del no-ajuste” (Daskalakis et al., 2013).

Estas dos hipótesis, aparentemente contrapuestas, pueden ser integradas por un nuevo modelo que propone que el estrés acumulativo aplica sólo a aquellos individuos que no fueron programados por su ambiente temprano (por ausencia de sensibilidad a la programación), mientras que la hipótesis del no-ajuste aplica sólo a los individuos que fueron sensibles a la programación durante la vida temprana (Nederhof and Schmidt, 2012). De esta forma, el elemento que relaciona ambas hipótesis es la sensibilidad a la programación (**Figura 2**).



**Figura 2 | Las hipótesis sobre el efecto del estrés en la susceptibilidad a desarrollar enfermedades.**

La hipótesis del “estrés acumulativo” sostiene que las experiencias adversas resultan en un desgaste de los sistemas fisiológicos que llevan a una mayor acumulación de daño y, consecuentemente, a un mayor riesgo de enfermedad. La hipótesis del “no ajuste” sostiene que las experiencias adversas durante fases plásticas del desarrollo y de la vida temprana activan mecanismos adaptativos que incrementan el *fitness* del individuo ante un ambiente estresante en la adultez. Consecuentemente, si el ambiente adulto se ajusta al ambiente temprano, promueve la salud y la resiliencia, pero si el ambiente adulto no se ajusta al ambiente temprano, aumenta la susceptibilidad de contraer enfermedades. El tercer eje del gráfico es el de la “sensibilidad a la programación”. Cuando un individuo es poco sensible a la programación, tenderá más a comportarse en base a la hipótesis de estrés acumulativo, pero si su sensibilidad a la programación es alta, tenderá a comportarse como lo predice la hipótesis del no ajuste. Adaptado de [Nederhof and Schmidt, 2012](#).

Otro posible factor que puede integrar las hipótesis de acumulación de estrés y del no-ajuste es el valor adaptativo de las experiencias tempranas según su magnitud. Mientras que experiencias desafiantes pero moderadas promueven la capacidad de hacer frente al estrés, adaptando al individuo para el ambiente futuro y generando resiliencia (hipótesis del no-ajuste), las experiencias tempranas de estrés severo generan un aumento de la vulnerabilidad (hipótesis de acumulación de estrés). El factor integrador descrito constituye la base de otra hipótesis del desarrollo, denominada “concepto de tres impactos para la resiliencia y la vulnerabilidad”, que involucra el aporte multigénico (primer impacto), el aporte ambiental temprano (segundo impacto) y el aporte de los desafíos en la vida

futura (tercer impacto). Dependiendo de la interacción entre los fenotipos programados con el ambiente de la vida adulta, la vulnerabilidad o la resiliencia a las enfermedades pueden precipitarse (Daskalakis et al., 2013).

Las hipótesis revisadas hasta aquí se pueden aplicar a un contexto evolutivo y a un contexto intergeneracional. Todas se sostienen por las diferencias generadas por las adversidades tempranas a través de la plasticidad fenotípica del desarrollo. Sin embargo, en particular, han sido descritas para enfermedades relacionadas con el sistema nervioso, basándose en la plasticidad del cerebro como forma de plasticidad fenotípica. En ese contexto, también se mencionaron los períodos críticos del neurodesarrollo, fundamentales para entender la profundidad de los cambios fenotípicos generados por las adversidades.

A pesar de esta descripción respaldada en el sistema nervioso y las neuropatologías, las primeras teorías que intentaron relacionar los efectos del ambiente temprano con la progresión de enfermedades a lo largo de la vida, estuvieron orientadas a enfermedades cardiovasculares y metabólicas. A mediados de los '80, David Barker estudió los efectos de la hambruna que sufrió la población de las zonas de Holanda ocupadas por Alemania durante la Segunda Guerra Mundial, en un contexto de bloqueo de suministro de comida por parte de los nazis. Barker encontró que la hambruna sufrida por las mujeres embarazadas durante el invierno de 1944 – 1945, correlacionaba con un riesgo aumentado de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la descendencia cuando fueron adultos (Hales and Barker, 1992). Por lo tanto, el concepto de que la mala nutrición durante el desarrollo en períodos críticos (en este caso, el periodo gestacional tardío) podría llevar al aumento del riesgo de enfermedades en la vida adulta fue originalmente denominado “hipótesis de Barker”. En particular, aplicada al desarrollo de la diabetes tipo 2, a esta hipótesis se le dio el nombre de “hipótesis del fenotipo ahorrativo” (Hales and Barker, 2001), la cual propone que las asociaciones epidemiológicas entre un crecimiento fetal e infantil pobre y el subsecuente desarrollo de diabetes tipo 2 y síndrome metabólico, responden a los efectos de una mala nutrición en la vida temprana, la cual produce cambios permanentes en el metabolismo de glucosa e insulina. Estos cambios incluyen una reducida capacidad de secreción de insulina y resistencia a insulina, las cuales, combinadas con la obesidad, el envejecimiento y la inactividad física, son los factores más determinantes para la progresión de la diabetes tipo 2. El “ahorro” como una posible variabilidad del crecimiento temprano representa un posible perfil de plasticidad del desarrollo, ayudando a entender cómo el ambiente moderno que promueve la obesidad en ciertos países del mundo interactúa con la variabilidad fisiológica para inducir la enfermedad (Wells, 2011).

En base a los subsecuentes estudios sobre la hambruna holandesa y otros casos epidemiológicos y de laboratorio que extendieron el conocimiento de este campo de estudio, la teoría comenzó a llamarse “Orígenes en el Desarrollo de la Salud y la Enfermedad” (DOHaD, por sus siglas en inglés). Mientras que el foco original estaba puesto en el efecto de la malnutrición prenatal en la hipertensión, obesidad y resistencia a la insulina, los nuevos estudios extendieron la teoría a otras enfermedades, como las inmunológicas, las relacionadas con salud mental y las reproductivas, generadas por diversos tipos de adversidades tempranas (Balbus et al., 2013; Heindel and Vandenberg, 2015; Langley-Evans, 2015).

### **1.3. Eje HPA como sensor de adversidades**

Habiendo descripto las posibles teorías e hipótesis que relacionan los eventos adversos tempranos con la progresión de enfermedades durante la vida de los organismos, surge la pregunta de cuál es el mecanismo biológico que subyace a esta relación. Durante los periodos críticos del desarrollo del cerebro, las adversidades o los eventos estresantes pueden modular el funcionamiento de circuitos específicos a través de la denominada neuroplasticidad del desarrollo (ver Introducción 1.1.4). Esta alteración de circuitos neurales explica, en parte, la conducta emotiva y cognitiva del adulto (Taylor, 2010).

Los efectos ejercidos por el estrés de las adversidades son mediados por el sistema nervioso autónomo y por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), los cuales actúan como sensores de estrés y desencadenan una respuesta homeostática. El eje HPA es uno de los sistemas propuestos como mecanismo de relación entre las adversidades tempranas y sus potenciales efectos duraderos, por lo que varias décadas de investigación estuvieron orientadas a entender cómo sus mediadores, como la adrenalina o los glucocorticoides, puede modular el funcionamiento del cerebro y la conducta (Maras and Baram, 2012). Hace unos 50 años, los estudios ya citados del grupo de Levine mostraron que el ambiente temprano influye sobre el eje HPA, lo cual fue también propuesto por Barker en su “hipótesis del fenotipo ahorrativo” (Matthews and Phillips, 2010; Weinstock, 2008).

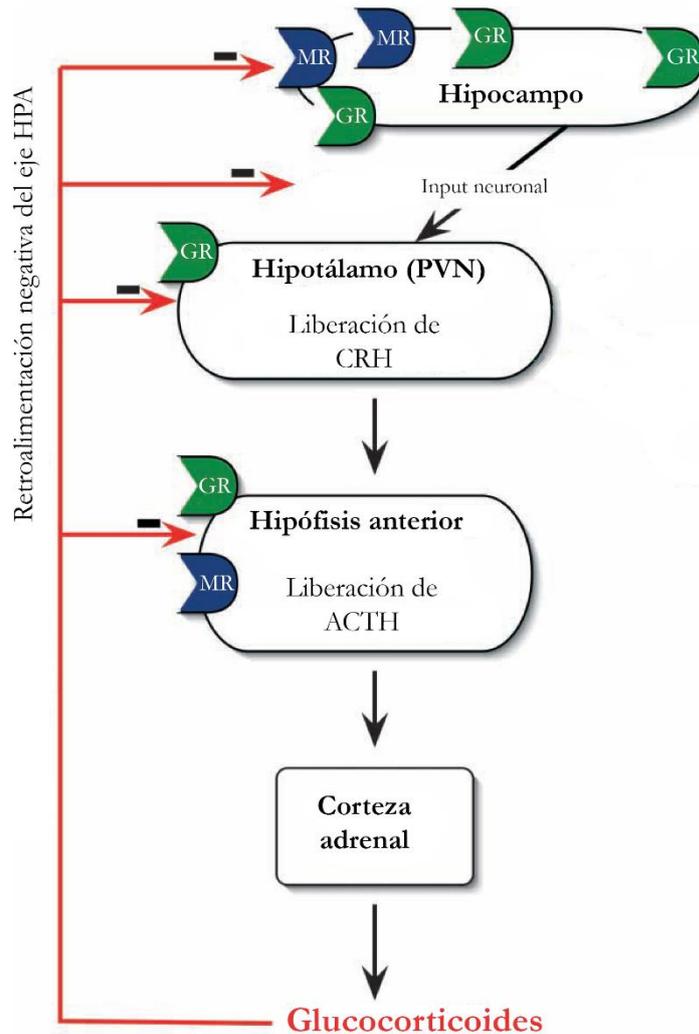
#### *1.3.1. Desarrollo y funcionalidad del eje HPA*

La temporalidad de maduración del eje HPA es altamente específica de la especie y está relacionada con ciertos puntos de referencia del desarrollo del cerebro (Mairesse et al.,

2007; Young, 2002). En aquellos animales en los cuales el nacimiento es precoz (por ejemplo, ovejas y primates), el mayor crecimiento del cerebro y una gran proporción de maduración neuroendócrina tiene lugar en el útero materno (Barbazanges et al., 1996). En cambio, en los animales en los cuales el nacimiento no es precoz (por ejemplo, conejos, ratas y ratones), gran parte del desarrollo del cerebro y su neuroendocrinología ocurre en el periodo postnatal (Alikhani-koopaei et al., 2004). Por lo tanto, los efectos del ambiente materno durante el último periodo gestacional impactarán diferencialmente según la especie en estudio.

El eje HPA está controlado por un número discreto de neuronas hipofisiotrópicas (es decir, que liberan hormonas peptídicas que estimulan la secreción de otras hormonas en la hipófisis anterior) en la división parvocelular medial de uno de los núcleos hipotalámicos, el paraventricular (PVN, por sus siglas en inglés). Estas neuronas sintetizan y secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que es la hormona primaria de estimulación de la secreción de corticotrofina (ACTH), así como también de otros factores, como la arginina vasopresina (AVP), que también modulan la liberación de ACTH. Tanto la CRH como la AVP viajan por la vía del sistema porta hipofisario para acceder a la hipófisis anterior, la cual luego estimula la liberación de ACTH hacia la circulación sistémica. La ACTH se une a receptores específicos en la corteza adrenal y estimula la síntesis y secreción de glucocorticoides (Antoni, 1986; Herman et al., 2005; Whitnall, 1993) (**Figura 3**).

Además, el eje HPA está sujeto a una rigurosa regulación hormonal a través de circuitos de retroalimentación negativa que controlan la liberación de CRH por el input neuronal de otras regiones del cerebro, como ser, el hipocampo. Tanto en el hipocampo como en el hipotálamo y en la hipófisis se encuentran receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR), que son los que reciben la señal de los glucocorticoides y desencadenan las respuestas de inhibición del eje HPA (**Figura 3**). La regulación de este circuito de retroalimentación negativa se describirá en mayor detalle en la Introducción 1.3.2.



**Figura 3 | Componentes principales del eje HPA y su regulación.**

Los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) están controlados por señales positivas (flechas negras) y negativas (flechas rojas). La retroalimentación negativa involucra la activación de receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR) en varias regiones del cerebro. Al nivel del hipocampo, las señales de retroalimentación negativa de GR y MR afectan el input neuronal al PVN del hipotálamo, disminuyendo la secreción de hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y vasopresina (AVP). Estas dos hormonas estimulan la secreción de adrenocorticotrofina (ACTH) desde la hipófisis anterior, la cual está también sujeta a retroalimentación negativa, al igual que el PVN. Una vez liberada a la circulación sistémica, la ACTH estimula la producción de glucocorticoides hacia la circulación, aumentando la señal de retroalimentación negativa. Adaptado de [Andrews and Matthews, 2004](#).

El eje HPA es activado tanto por señales externas como internas. En la mayoría de los vertebrados existe un control circadiano de la secreción de glucocorticoides, con picos de liberación al inicio de la fase activa del ciclo diurno ([Keller-Wood and Dallman, 1984](#)). La secreción de glucocorticoides también está impulsada por alteraciones de la homeostasis, señaladas por estímulos cardiovasculares, respiratorios o viscerales ([Swanson and Sawchenko, 1983](#)). Además, cambios en la circulación de citoquinas luego de una

infección o desafío tóxico promueven la excitación de las neuronas del PVN, estimulando la secreción de glucocorticoides (Herman et al., 2005).

Por último, el eje HPA es rigurosamente sensible a las perturbaciones del ambiente. Las respuestas en la secreción de glucocorticoides pueden ser iniciadas por la activación directa del PVN a través de vías nociceptivas (por ejemplo, por el dolor) (Palkovits et al., 1999), por la activación de programas de defensa innatos (por ejemplo, aversión a predadores) (Figueiredo et al., 2003) o por asociaciones señaladas por un estímulo sensorial (por ejemplo, el condicionamiento al miedo) (Van de Kar et al., 1991).

### 1.3.2. *Glucocorticoides*

Los glucocorticoides causan profundas variaciones en el metabolismo de hidratos de carbono que incrementan los sustratos energéticos circulantes al costo de sustratos energéticos almacenados; también incrementan el tono cardiovascular, alteran la cognición, e inhiben el crecimiento, la reproducción y las respuestas inmune e inflamatoria (Krieger, 1982; Mountcastle, 1980; Munck et al., 1984). Estos cambios son centrales para la exitosa adaptación a un estrés físico agudo, dado que aumentan la energía disponible y retrasan el energéticamente costoso anabolismo de procesos menos necesarios a corto plazo. Si bien estas adaptaciones son positivas para un contexto de “pelear o correr” (“*fight or flight*”) ante un estrés agudo, la exposición crónica a un estímulo estresante impone un costo que puede generar diabetes, hipertensión, inmunosupresión, infertilidad e inhibición del crecimiento (Krieger, 1982; Munck et al., 1984; Sapolsky et al., 1986). Estos procesos catabólicos iniciados por los glucocorticoides requieren, por lo tanto, que la secreción se restrinja a tiempos de marcada necesidad y se inhiba cuando no son necesarios.

De acuerdo con lo dicho anteriormente, existen mecanismos para limitar la magnitud y la duración de la liberación de glucocorticoides. Uno de los más importantes, es el mecanismo de retroalimentación negativa en el que los glucocorticoides pueden inhibir nueva secreción de ACTH (**Figura 3**). Existen varios mecanismos de retroalimentación negativa. La retroalimentación “rápida” es sensible a la tasa de secreción de glucocorticoides y no depende de la transcripción (Dallman and Yates, 1969), mientras que la retroalimentación “retrasada” es sensible a los niveles de glucocorticoides y depende de la transcripción (Keller-Wood and Dallman, 1984). El mecanismo “retrasado” puede subdividirse en dos, uno “intermedio” y otro “retrasado”, debido a que el incremento en la duración del estrés promueve cambios prolongados en el contenido de ACTH en la

hipófisis (Keller-Wood and Dallman, 1984). De esta forma, los glucocorticoides regulan el eje HPA a través de múltiples mecanismos de retroalimentación.

La retroalimentación retrasada de glucocorticoides está mediada por receptores de glucocorticoides presentes en regiones del cerebro claves para la regulación del eje HPA. Los sitios más importantes de retroalimentación negativa son el hipocampo, el PVN del hipotálamo y la hipófisis anterior (**Figura 3**). Esta retroalimentación está mediada en gran medida, pero no exclusivamente, por la alta densidad de receptores de glucocorticoides presentes en estas áreas (Andrews and Matthews, 2004). Estos receptores regulan la transcripción por unión a su ligando o por modulación de la actividad de otros factores de transcripción (McKay and Cidlowski, 1998; Yang-Yen et al., 1990). Existen dos receptores de glucocorticoides en el cerebro: el receptor de glucocorticoides (GR) está altamente expresado en numerosas regiones del cerebro (Ahima and Harlan, 1990), tiene una afinidad de 5-10 nM y se une a su ligando sólo durante períodos de intermedia o alta secreción de glucocorticoides (como ocurre durante el pico de liberación circadiana o a continuación de un estrés) (Reul and De Kloet, 1985); y el receptor de mineralocorticoides (MR) presenta una expresión espacial más restringida (Ahima and Harlan, 1990), tiene aproximadamente de 5 a 10 veces más afinidad que GR y, en consecuencia, está unido a su ligando durante períodos de secreción basal de glucocorticoides (Reul and De Kloet, 1985). Por las características de cada tipo de receptor, se postula que GR es importante para la retroalimentación negativa luego de un estrés, mientras que MR mantiene el tono basal de actividad del eje HPA (De Kloet et al., 1998). Sin embargo, es de notar que existen otras vías de inhibición del eje HPA que no se respaldan en los receptores de glucocorticoides, sino que son neuronas GABAérgicas (inhibitorias) que inervan el PVN desde varias regiones del cerebro (Cullinan et al., 1993; Herman et al., 2005; Roland and Sawchenko, 1993).

### 1.3.3. Programación del eje HPA

El eje HPA puede ser permanentemente programado durante períodos críticos del desarrollo, y al menos una parte de esta programación tiene lugar a través de la modificación de los niveles de GR y MR en el hipocampo, el hipotálamo, la hipófisis y la amígdala. Otro factor que influye en la programación es la secreción y circulación de glucocorticoides (“hipótesis de los glucocorticoides”) (Andrews and Matthews, 2004). Las evidencias muestran que existen ventanas de tiempo críticas para las cuales el eje HPA es

particularmente sensible a la programación del desarrollo (Andrews and Matthews, 2004; O'Regan et al., 2001; Welberg et al., 2001).

Los mecanismos que subyacen a la programación del eje HPA son dependientes de la dosis y el tiempo de exposición al estrés (Welberg et al., 2001). Ratas macho adultas cuyas madres fueron expuestas a glucocorticoides sintéticos en la última semana de gestación exhiben una reducción en la expresión hipocámpal de GR y MR, pero no se encuentran cambios en la expresión de GR en el PVN. Sin embargo, se observa un aumento del mRNA de CRH en el PVN, lo cual, sumado a la reducción en GR y MR, conduce a un aumento de la actividad del eje HPA. En cambio, cuando las madres son tratadas con glucocorticoides sintéticos durante toda la preñez, no se observan cambios en los receptores de glucocorticoides del hipocampo, pero sí se encuentra un aumento en el mRNA de GR y MR en la amígdala (Welberg et al., 2001). Este resultado que parece contradictorio puede ser explicado con la demostración de que la ocupación de GR en la amígdala tiene efectos excitatorios sobre la actividad del eje HPA (Herman and Cullinan, 1997).

Además de la programación que se observa por las diferencias de expresión de GR y MR ante el estrés, los glucocorticoides también pueden ser una fuente de programación, lo cual constituye la “hipótesis de los glucocorticoides”. Los glucocorticoides son esenciales para el normal desarrollo del cerebro produciendo un amplio espectro de efectos organizacionales (Andrews and Matthews, 2004).

El estrés modifica los parámetros cardiovasculares y endócrinos de la madre, incluyendo aumentos en la circulación de ACTH y glucocorticoides. Bajo circunstancias normales, la placenta actúa como barrera para el paso de varios factores maternos, entre ellos, los glucocorticoides. Sin embargo, dependiendo de la concentración, algunos de ellos entrarán al feto en desarrollo (Andrews and Matthews, 2004). La limitación de acceso de glucocorticoides al feto está dada por la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 $\beta$ -HSD), la cual se expresa en la placenta y convierte al cortisol y la corticosterona en productos inactivos, como la cortisona y la 11-desidro corticosterona (Burton and Waddell, 1999).

#### *1.3.4. El eje HPA ante el estrés crónico*

Cuando los organismos son expuestos a un estrés crónico, el eje HPA puede mostrar dos tipos de respuesta: la habituación o la facilitación. La habituación ocurre cuando un mismo agente estresante (homotípico) es presentado repetidamente y la

respuesta se caracteriza por una disminución de glucocorticoides liberados ante el estímulo (Bhatnagar et al., 2002; Kant et al., 1985). Este tipo de respuesta es dependiente de la intensidad y la predictibilidad del estímulo estresante (Marti and Armario, 1997). La facilitación ocurre cuando el organismo es expuesto repetidamente a un agente estresante y luego se presenta un agente novedoso (heterotípico) (Akana et al., 1992; Kant et al., 1985). Notablemente, la facilitación puede ocurrir en el contexto de un aumento en los niveles de glucocorticoides basales inducido por estrés crónico, sugiriendo que este proceso hace caso omiso de las señales de retroalimentación negativa.

#### *1.3.5. El eje HPA y su relación con el sistema límbico*

Dadas las estrechas conexiones que existen entre el estrés y los desórdenes afectivos, es importante notar que el sistema límbico juega un rol fundamental en la respuesta a estrés y está implicado en la regulación del eje HPA. En este sentido, el hipocampo, la corteza prefrontal (PFC) y la amígdala son las regiones más importantes del sistema límbico (Feldman et al., 1995; Herman and Cullinan, 1997; Herman et al., 2005).

El rol del hipocampo en la retroalimentación negativa de la respuesta a estrés no está del todo claro. El hipocampo expresa altos niveles de GR y MR (Arriza et al., 1988; Herman, 1993; Reul and De Kloet, 1985), e inhibe el eje HPA para, al menos, algunos tipos de estresores. Al igual que el hipocampo, la PFC medial presenta células que expresan un alto número de GR (Ahima and Harlan, 1990). Una proporción apreciable de estas células expresan también c-fos luego de un estrés agudo, sugiriendo que los estímulos estresantes afectan a estas neuronas (Ostrander et al., 2003). Implantes de corticosterona en la PFC atenúan la respuesta del eje HPA ante el estrés, lo que implica que esta región puede ser un sitio de retroalimentación negativa de la respuesta (Akana et al., 2001). Se piensa que la amígdala activa el eje HPA. Los GR de la amígdala jugarían un rol de retroalimentación positiva en la regulación del estrés, ayudando a potenciar, más que inhibir, el eje HPA (Dallman et al., 2003).

### **1.4. Mecanismos epigenéticos como interfase entre las adversidades y sus consecuencias**

Aun cuando el funcionamiento del eje HPA parece ser el responsable de sensar, integrar y responder, mediante la programación, al ambiente con el que se enfrentan los

individuos durante el desarrollo, todavía queda por responder cuál es el mecanismo molecular que explica esta faceta de la plasticidad fenotípica, en general, y de la neuroplasticidad, en particular.

En términos de la neuroplasticidad, los mecanismos epigenéticos son fuertes candidatos para explicar cómo los ambientes estresantes inducen cambios en el cerebro que pueden perdurar (Korosi et al., 2012; McEwen et al., 2012; Schouten et al., 2013). Esto se debe a dos principales motivos: por un lado, los mecanismos epigenéticos aportan un amplio grado de plasticidad fenotípica que no depende de variaciones genotípicas; y, por otro lado, son suficientemente estables (aunque también son reversibles) para generar cambios duraderos.

La definición de epigenética es amplia, pero en términos moleculares los cambios epigenéticos pueden ser entendidos como un grupo de eventos moleculares, independientes de la secuencia de DNA, que modulan la expresión génica a lo largo del tiempo. Estos cambios involucran metilación del DNA, modificaciones químicas de histonas (acetilación, metilación, etc) y RNAs no codificantes (por ejemplo, microRNAs) (Jiang et al., 2008; Schouten et al., 2013). Hace medio siglo, Conrad Waddington propuso que el desarrollo de los organismos y su respuesta al ambiente está gobernada por “sistemas epigenéticos” que moldean la embriogénesis (Waddington, 2012). Waddington consideró esta relación entre genotipo y fenotipo antes de que se supieran los mecanismos moleculares que gobernaban la epigenética. Hoy en día sabemos que las células poseen una amplia variedad de mecanismos adaptativos capaces de responder a las condiciones ambientales y a las interacciones celulares (McNeill and Van Vactor, 2012).

Los métodos modernos de secuenciación masiva permiten medir a gran escala la diversidad fenotípica a nivel molecular. Una gran cantidad de información se fue recabando acerca de los niveles de expresión de los organismos, lo cual resulta indicativo de la gran variabilidad de los genomas y la complejidad de la regulación de la expresión génica (Kumar et al., 2016). Como ya se mencionó, la expresión génica puede variar significativamente cuando, además de los mecanismos de variabilidad intrínsecos a la célula, se agrega la interacción con factores ambientales, como la temperatura, el estrés psicológico o el ritmo circadiano (McEwen et al., 2015; Voskarides, 2017).

#### *1.4.1. Mecanismos epigenéticos*

Los factores que contribuyen a la regulación epigenética de la actividad transcripcional son numerosos. La metilación del DNA se refiere a una modificación

química del DNA en la cual la citosina es convertida en 5-metilcitosina (5mC) y, como consecuencia, se reduce la accesibilidad de los factores de transcripción. La metilación del DNA es dependiente de la presencia de dadores de metilos (provistos en la dieta por nutrientes como el ácido fólico, la metionina y la colina) y de metiltransferasas que, o bien mantienen la metilación (DNMT1), o bien generan metilaciones *de novo* (DNMT3a y DNMT3b). La represión de la transcripción por metilación del DNA es sostenida también por otros factores que se unen a los grupos metilos, como la proteína MeCP2. Además de las DNMTs, se ha descrito recientemente en células de mamíferos una clase de enzimas que producen modificaciones epigenéticas como la 5-hidroximetilcitosina (5hmC), la 5-formilcitosina (5fC) y la 5-carboxilcitosina (5caC). Estas nuevas enzimas “escritoras” son miembros de la familia de proteínas denominadas “*ten-eleven translocation*” (TET) y pueden oxidar secuencialmente a la 5mC para formar 5hmC, 5fC y 5caC (Plongthongkum et al., 2014; Tahiliani et al., 2009). Se ha visto que estas modificaciones están enriquecidas en las células del cerebro (Kriaucionis and Heintz, 2009) y que son sensibles a cambios ambientales, sugiriendo un rol importante en la funcionalidad del cerebro y en los desórdenes neuropsiquiátricos (Kato and Iwamoto, 2014). Recientemente, se ha demostrado un rol de la 5hmC en regular la expresión génica del hipotálamo en respuesta a un estrés postnatal (Papale et al., 2017).

El control epigenético de la transcripción también es gobernado por las modificaciones postraduccionales de las histonas, proteínas estructurales responsables del empaquetamiento del DNA en nucleosomas (Feng et al., 2007; Fukuda and Taga, 2005). En su conjunto, el DNA empaquetado en las histonas forman la cromatina. Las histonas pueden metilarse, acetilarse, ubiquitinarse y fosforilarse postraduccionalmente, lo cual puede alterar la accesibilidad al DNA al modificar la estructura de la cromatina, o también modificar el reclutamiento de factores de unión a la cromatina. El estado de acetilación de histonas es controlado por la presencia de histona acetiltransferasas (HATs), histona deacetilasas (HDACs) y por inhibidores de HDACs, los cuales efectivamente incrementan la expresión génica mediante el desplazamiento del equilibrio de la acetilación de histonas hacia un estado de mayor acetilación (Fagiolini et al., 2009; Feng et al., 2007; Strathdee and Brown, 2004).

A pesar de que algunas evidencias muestran una relación entre la acetilación de histonas y el aumento en la expresión génica, y también entre la metilación del DNA y la represión génica, no existe un código establecido de marcas epigenéticas a partir del cual se pueda predecir si una determinada marca o conjunto de marcas resultarán en un aumento o

una disminución de la transcripción. La temporalidad y el grado de la expresión génica están gobernados por los complejos mecanismos descriptos, los cuales constituyen un posible vínculo entre un genotipo y los múltiples fenotipos observados (Fagiolini et al., 2009).

Por último, un mecanismo epigenético que suele incluirse en los estudios de este campo son los RNAs no codificantes, con mayor énfasis en los microRNAs (miRNAs). Aunque los mecanismos transcripcionales ya descriptos (metilación del DNA y modificaciones postraduccionales de histonas) pueden producir un cambio de estado duradero en la expresión génica, tienen una limitada actividad espacial debido a estar constreñidos en el núcleo celular. Esta restricción espacial es particularmente importante en el sistema nervioso donde las complejas arquitecturas celulares son esenciales para la estructuración de circuitos neurales y su funcionalidad. Las regulaciones postranscripcional y/o traduccional permiten modificar la expresión a un nivel espacial (McNeill and Van Vactor, 2012). Por esta razón, los RNAs no codificantes y, en particular, los pequeños RNAs tomaron un rol preponderante en el estudio de la regulación de la expresión génica en el sistema nervioso.

#### 1.4.2. Estructura, función y relevancia de los microRNAs

“RNAs pequeños” es un término arbitrario, porque durante mucho tiempo se utilizó para nombrar a otros RNAs no codificantes, como los pequeños RNAs nucleares (snRNAs) y RNAs de transferencia (tRNAs). Lo que distingue e identifica a un RNA pequeño eucariota es su tamaño limitado (de 20 a 30 nucleótidos de largo) y su asociación con la familia de proteínas Argonauta (Ago). La familia Ago puede ser agrupada en dos clases: la subfamilia Ago y la subfamilia Piwi. Al menos tres clases de RNAs pequeños son codificados por el genoma de humanos, clasificadas según su mecanismo de biogénesis y el tipo de proteína Ago a la cual están asociados: los microRNAs (miRNAs), los RNAs pequeños endógenos (endo-siRNAs) y los RNAs que interactúan con Piwi (piRNAs). De todos modos, el descubrimiento reciente de pequeños RNAs no canónicos hace difícil una clara separación en clases (Kim et al., 2009).

Desde el descubrimiento del primer microRNA en 1993, miles de miRNAs fueron identificados en un amplio rango de organismos, convirtiéndolos en los miembros más caracterizados de la familia de los RNAs no codificantes. Los miRNAs constituyen una clase de RNAs pequeños no codificantes de 22 nucleótidos de largo aproximadamente, que afectan postranscripcionalmente la actividad de mRNAs. Los miRNAs funcionan como

guías a través del apareamiento de bases con sus mRNAs blanco, mientras que las proteínas Ago ejercen la función de efectoras por reclutamiento de factores que inducen la represión de la traducción, la deadenilación del mRNA y la degradación del mRNA (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Los sitios de unión a miRNAs en el mRNA suelen estar en la región 3' no codificante (3' UTR) (Bartel, 2009). El dominio nucleotídico que se encuentra hacia la región 5' del miRNA y que se extiende desde el nucleótido 2 al 7 es crucial para el reconocimiento del blanco y ha sido denominado región “semilla” del miRNA. Otros nucleótidos que también contribuyen al apareamiento con los mRNA blanco son el 8 y, con menor importancia, la región de los nucleótidos 13 a 16 (Ha and Kim, 2014).

Los genes de miRNAs están localizados en variados contextos genómicos. En humanos, la mayoría de los miRNAs canónicos son codificados por intrones de transcritos codificantes o no codificantes, pero algunos son también codificados por regiones exónicas. A menudo, varios *loci* de miRNAs están ubicados con cierta proximidad constituyendo una unidad transcripcional policistronica (Lee et al., 2002). Los miRNAs que se encuentran dentro de un mismo *cluster* son generalmente cotranscritos, pero cada miRNA individual puede ser regulado postranscripcionalmente de forma independiente (Ha and Kim, 2014).

La regulación por miRNAs es uno de los mecanismos más abundantes de regulación postranscripcional (Bredy et al., 2011) y, si bien en la mayoría de los casos, regulan negativamente la traducción, en los últimos años se describieron otros tipos de regulación, como la activación traduccional (Filipowicz et al., 2008) o la formación de heterocromatina (Kim et al., 2008, 2009).

Los miRNAs juegan un papel importante en virtualmente todos los procesos biológicos estudiados, desde el desarrollo hasta la muerte celular y el control metabólico. Además, más del 60% de los mRNAs de mamíferos están controlados por miRNAs, añadiendo un nuevo nivel de regulación al ya complejo mecanismo de expresión génica por regulación de la transcripción (Bartel, 2009; Friedman et al., 2009; Schouten et al., 2013).

Entre las especies animales, el número de genes que codifican para miRNAs ha aumentado significativamente con el incremento de la complejidad orgánica, es decir, con el número de tipos celulares diferenciados. Esta observación favorece la especulación sobre que, a pesar de la alta conservación entre muchas familias de miRNAs, la diversificación de otros genes de miRNAs ha contribuido a la evolución de las especies y, en particular, a los programas de desarrollo (Sempere et al., 2006). Notablemente, recientes comparaciones de las poblaciones de mRNAs y miRNAs expresados en el cerebro de

diferentes especies de primates sugiere que un set de miRNAs regulados por el desarrollo en la corteza prefrontal (PFC) parece estar evolucionando más rápidamente que otras clases de genes, incluidos los factores de transcripción (Somel et al., 2011). Por ejemplo, 19 de estos miRNAs relacionados con el desarrollo resultaron ser 24 veces más divergentes en la PFC de humanos respecto de la PFC de chimpancés. Por lo tanto, los miRNAs podrían constituir una parte significativamente importante de la expansión cognitiva e intelectual de los humanos (McNeill and Van Vactor, 2012).

Varias líneas de investigación sugieren que los miRNAs regulan de manera precisa la plasticidad sináptica observada en desórdenes del desarrollo del cerebro o los basados en el estrés ambiental (Olde Loohuis et al., 2012; Schratt, 2009; Schratt et al., 2006). Ha sido demostrado que varios miRNAs regulan la expresión de proteínas involucradas en el citoesqueleto de actina (Schratt et al., 2006), en el transporte de mRNA (Fiore et al., 2009) y en la morfogénesis de espinas dendríticas. La neuroplasticidad es un componente importante en la modulación de los circuitos neuronales durante el desarrollo para lograr correctas funciones cognitivas y emotivas (Martin et al., 2000).

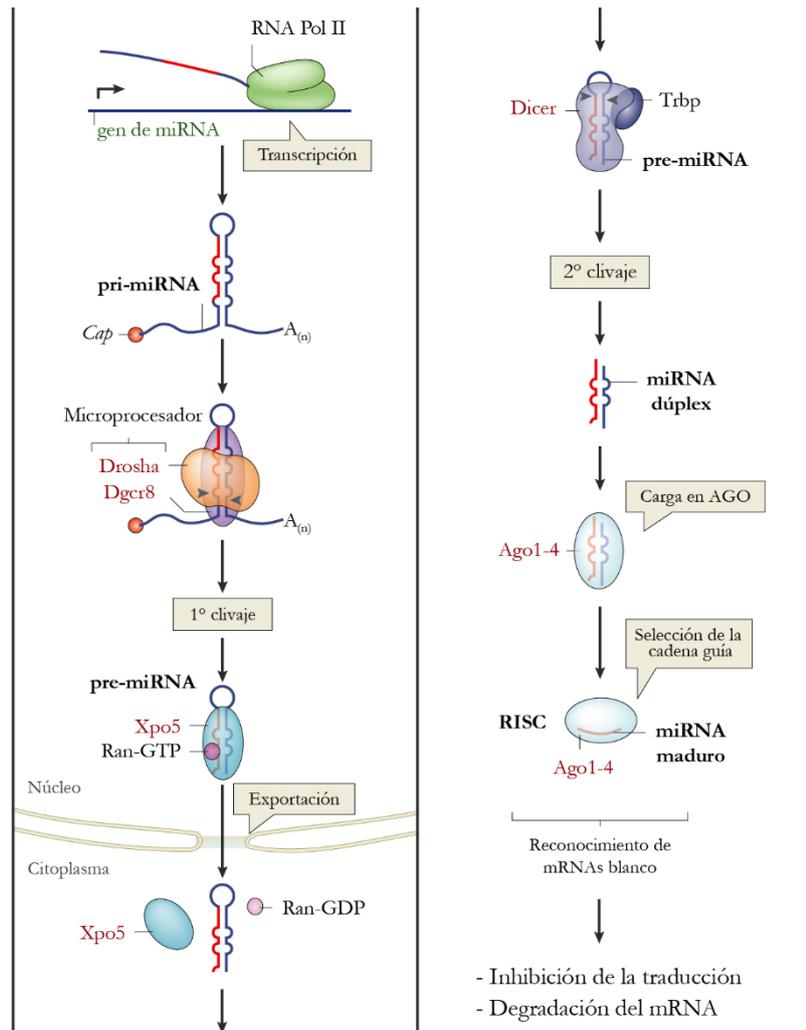
#### 1.4.3. Biogénesis de microRNAs

La transcripción de miRNAs es llevada a cabo por la RNA polimerasa II (Pol-II) y es controlada por los factores de transcripción asociados a Pol-II y por reguladores epigenéticos (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Además, se ha demostrado que algunos miRNAs virales pueden ser transcritos por la Pol-III (Pfeffer et al., 2005). Algunos RNAs pequeños endógenos similares a miRNAs pero que son derivados de tRNAs también pueden ser transcritos por la Pol-III (Babiarz et al., 2008; Ha and Kim, 2014).

Luego de la transcripción, el miRNA primario (pri-miRNA) sufre una serie de pasos para su maduración (Lee et al., 2002). El pri-miRNA es una molécula de RNA larga (típicamente de más de 1 kb) y contiene una estructura de bucle con tallo (“*stem-loop*”), en la cual está embebida la secuencia del miRNA maduro. Un típico pri-miRNA consiste de un tallo de 33 a 35 pb, un bucle terminal y segmentos de RNA simple cadena hacia los extremos 3’ y 5’ (Figura 4). El primer paso de maduración es llevado a cabo por la RNasa tipo III nuclear llamada Drosha, que recorta el *stem-loop* para liberar un RNA pequeño de aproximadamente 65 nucleótidos (pre-miRNA) con forma de horquilla (“*hairpin*”) (Lee et al., 2003). Junto con Drosha, el cofactor Dgcr8, forman el complejo Microprocesador (Gregory et al., 2004) (Figura 4).

Mientras el clivaje de Drosha define el extremo terminal del miRNA y, por lo tanto, determina su especificidad, es importante que el Microprocesador reconozca y clive al pri-miRNA en el sitio adecuado. Drosha cliva a la horquilla del pri-miRNA aproximadamente a 11 pb de la unión basal de los dos segmentos de RNA simple cadena con el RNA doble cadena, y aproximadamente a 22 pb de la unión apical que enlaza el bucle terminal (Han et al., 2006). La unión basal está dada por Dgcr8 y sirve de referencia para determinar el sitio de clivado (Chiang et al., 2010; Han et al., 2006). Las 11 pb de distancia entre el corte y la base del tallo corresponden a una vuelta de doble hélice de RNA sobre la cual se acomoda Dgcr8, sirviendo como un “ancla” molecular a Drosha, la cual realiza el corte (Carthew and Sontheimer, 2009). Aún así, la unión apical también es importante para un procesamiento preciso (Ma et al., 2013).

Luego del procesamiento por Drosha, el pre-miRNA es exportado al citoplasma, donde se completa su maduración. La proteína exportina 5 (Xpo5) forma un complejo de transporte junto con la proteína nuclear Ran que une GTP, y con el pre-miRNA (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004) (**Figura 4**). Después de la traslocación a través del poro nuclear, el GTP es hidrolizado lo cual resulta en el desensamblado del complejo de transporte y la liberación del pre-miRNA en el citosol. La estructura cristalográfica de este complejo muestra que Xpo5 y Ran forman una estructura similar a un guante de béisbol dentro de la cual se posiciona el pre-miRNA, permitiendo su interacción con la superficie interna de la estructura tipo guante, que se encuentra cargada positivamente (Okada et al., 2009). Al final de dicha estructura se observa un bolsillo en forma de túnel que interactúa fuertemente con los 2 nucleótidos protroyentes del extremo 3' del pre-miRNA, que son el resultado del clivaje por Drosha (Lund et al., 2004; Zeng and Cullen, 2004). Un estudio reciente mostró que la exportina 1 (Xpo1 o Crm1) también es capaz de transportar algunos pre-miRNAs no canónicos (Ha and Kim, 2014; Xie et al., 2013).



**Figura 4 | Biogénesis de microRNAs.**

Modelo esquemático de la maquinaria de biogénesis de miRNAs. La transcripción de un gen que codifica para un miRNA se inicia generalmente por la RNA Pol II y se genera el miRNA primario (pri-miRNA). En el núcleo se realiza el primer clivaje de la vía que es llevado a cabo por el complejo Microprocesador (Drosha/Dgcr8), dando como resultado un miRNA precursor (pre-miRNA). El pre-miRNA es reconocido por Xpo5 y exportado al citoplasma mediante la unión de GTP, que estabiliza al complejo, y posterior unión de GDP, que desestabiliza al complejo ya en el citoplasma, dejando al pre-miRNA disponible para ser tomado por Dicer. Dicer realiza el segundo clivaje de la vía, dando como resultado un miRNA dúplex, que es cargado en alguna de las 4 proteínas Ago (en mamíferos). Luego de la selección de la cadena guía, el complejo RISC ya formado puede ejercer sus funciones de inhibición de la traducción o degradación del mRNA blanco. En el esquema, las puntas de flecha sobre las moléculas precursoras de miRNAs indican los sitios de clivaje. En rojo están marcadas las proteínas relevantes para este trabajo. Adaptado de [Ha and Kim, 2014](#).

Al exportarse el pre-miRNA hacia el citoplasma, el mismo es, por segunda vez, clivado por Dicer, una RNasa de tipo III. El clivaje se realiza cerca del bucle terminal produciendo como resultado un dúplex de RNA pequeño ([Bernstein et al., 2001](#); [Grishok et al., 2001](#)) (**Figura 4**). El dominio amino terminal de Dicer facilita el reconocimiento del pre-miRNA interactuando con su bucle terminal e incrementa el procesamiento de ciertos

pre-miRNAs (Gu et al., 2012). El dominio PAZ se une al extremo terminal del pre-miRNA (Park et al., 2011). Para explicar cómo Dicer produce un dúplex de RNA pequeño de un tamaño discreto, se ha propuesto que la región entre el dominio PAZ y el dominio de RNasa actúa como una “regla molecular” (Macrae et al., 2009). Dicer se une preferentemente al pre-miRNA con un extremo 3’ protruyente de 2 nucleótidos, que fue originalmente generado por el clivaje de Drosha. En general, los sitios de clivaje de Dicer están localizados a una distancia fija del extremo 3’ de los RNAs doble cadena, lo cual constituye la “regla de conteo desde el 3’” (Vermeulen et al., 2005). La distancia es típicamente de 21 a 25 nucleótidos de largo dependiendo de la especie y del tipo de enzima Dicer que se trate. En mamíferos, existe un mecanismo adicional de conteo para el sitio de clivado de Dicer, el cual consiste en la unión de Dicer al extremo 5’ fosforilado del pre-miRNA y realiza el clivaje a 22 nucleótidos de distancia de dicho extremo. Este mecanismo constituye la “regla de conteo desde el 5’” (Park et al., 2011). Por último, al igual que otras RNasas de tipo III, Dicer suele actuar junto a cofactores proteicos de unión a RNA doble cadena, llamados Trbp y Pact (Ha and Kim, 2014).

El último paso de la biogénesis corresponde a la carga del RNA doble cadena pequeño en alguna proteína Ago para formar el complejo efector, llamado “complejo de silenciamiento inducido por RNA” (RISC, por sus siglas en inglés) (Hammond et al., 2001). El armado de este complejo requiere dos pasos: la carga del dúplex de RNA y su consiguiente desenrollamiento (Kawamata and Tomari, 2010) (**Figura 4**). En algunas especies se produce una carga diferencial del dúplex de RNA en los distintos tipos de proteínas Ago. En humanos, no existe un estricto proceso de clasificación de los dúplex en cada uno de los 4 tipos de Ago, y todos ellos pueden incorporar dúplex de miRNAs, con cierta preferencia hacia los dúplex de RNAs pequeños con incompatibilidades de secuencia (“*mismatch*”) en las posiciones de nucleótidos 8 a 11 (Meister et al., 2004). De las dos cadenas de RNA pequeño que forman el dúplex de miRNA, sólo una, la denominada “cadena guía”, se cargará en la proteína Ago correspondiente (**Figura 4**). La selección de la cadena guía durante la carga de Ago está principalmente establecida por las características termodinámicas de los extremos del dúplex. La cadena con un extremo 5’ relativamente inestable es la que se selecciona como cadena guía. Un determinante adicional de esta selección es la presencia de una U en la posición 1 de la secuencia (Hu et al., 2009). La otra cadena liberada (también llamada “cadena pasajera”) se degrada rápidamente, resultando en un fuerte aumento del porcentaje de presencia de la cadena guía respecto de la pasajera en el *pool* final de miRNAs maduros. Una vez cargada en Ago, la secuencia semilla del miRNA

guía se estructura en forma de “hélice A”, lo cual facilita el eficiente escaneo de los mRNA potencialmente blancos de esa secuencia. Por otro lado, algunos tipos de Ago tienen actividad de endonucleasa y pueden clivar a la cadena pasajera y también al mRNA blanco cuando el dúplex posee complementariedad en los nucleótidos centrales (Matranga et al., 2005). Además, la carga del dúplex en el complejo RISC es un proceso dependiente de ATP, mientras que la liberación de la cadena pasajera es independiente de ATP (Ha and Kim, 2014). Una vez cargado en Ago y seleccionada la cadena guía, el miRNA maduro ejerce su función a través del reconocimiento de mRNAs blanco en el contexto del complejo miRISC (**Figura 4**).

#### 1.4.4. *MicroRNAs y su relación con los estímulos ambientales*

Los miRNAs están abundantemente expresados en el sistema nervioso y se ha demostrado una relación entre su función y la neuroplasticidad, particularmente, la plasticidad sináptica. Recientemente, se reportó que los miRNAs cumplen un rol importante en el aprendizaje y la memoria, probablemente a través de la regulación de la morfogénesis de dendritas durante el desarrollo temprano (Bredy et al., 2011) y que estímulos ambientales pueden controlar su expresión, su función y su localización subcelular (McNeill and Van Vactor, 2012).

La compleja red de miRNAs es muy flexible y puede ajustarse a una gran variedad de desafíos ambientales a lo largo de la vida y, particularmente, durante el neurodesarrollo. Una sutil alteración en los niveles de miRNAs puede ser altamente efectiva para la adaptación a nuevas condiciones ambientales. Hay evidencias que muestran el rol de los miRNAs en la plasticidad fenotípica de varias especies en cuanto a la respuesta a hipoxia (Yan et al., 2015), estrés por frío y anoxia (Lyons et al., 2015), sequía (Yin et al., 2015), alteraciones de temperatura (Campos et al., 2014), estrés a rayos UV y salinidad (Li et al., 2016). Además, notablemente, algunos miRNAs son regulados por la actividad neuronal, lo cual constituye una observación interesante para pensar el efecto de los miRNAs en la neuroplasticidad. Varios estudios han probado el rol de los miRNAs en la plasticidad del sistema nervioso y el comportamiento animal, particularmente, en la plasticidad y función sinápticas, en las experiencias sensoriales, en la expresión de fenotipos conductuales y la formación de memoria (Codocedo and Inestrosa, 2016; Fiorenza and Barco, 2016; Voskarides, 2017).

Los mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA y las modificaciones de histonas, también regulan la transcripción de miRNAs. Por su parte, los miRNAs controlan

la expresión de importantes reguladores epigenéticos, como DNA metiltransferasas, desacetilasas de histonas y remodeladores de la cromatina. Esta compleja red de retroalimentación forma un circuito que modela los patrones de expresión celulares. Cuando este circuito regulatorio se ve comprometido por influencias ambientales, se interfiere con los normales procesos fisiológicos y pueden desarrollarse enfermedades (Sato et al., 2011).

#### 1.4.5. *Epigenética ante las adversidades tempranas*

El primer ejemplo de programación epigenética por una experiencia temprana lo constituyó un estudio del laboratorio del ya citado Michael Meaney, usando un modelo de cuidado materno con variaciones naturales en ratas. El grupo de Meaney probó que las variaciones en el cuidado materno afectan de forma permanente la expresión de GR en el hipocampo, y que esto sucedía a través de modificaciones epigenéticas que ocurren durante la primera semana de vida. En particular, mostraron que la región promotora del gen de GR aumentaba su metilación en las crías de las madres con bajo cuidado materno respecto de las que ejercían un alto cuidado materno. La metilación en el promotor de GR impedía el pegado del factor de transcripción NGF1-A, disminuyendo sus niveles de expresión (Weaver et al., 2004). Posteriormente, se demostró que el fenotipo que generaba este cambio epigenético podía ser transmitido entre generaciones (Champagne, 2008). Luego de estos descubrimientos significativos sobre la programación epigenética del eje HPA, otros estudios utilizaron variados modelos de adversidad temprana para estudiar la programación epigenética de este eje, incluyendo las regiones del sistema límbico con las cuales se comunica, particularmente, el hipocampo y la corteza prefrontal. Además, se estudiaron otros componentes del eje HPA demostrándose que también eran susceptibles de modificarse epigenéticamente. Esto incluyó a la CRH, la AVP y sus respectivos receptores (Murgatroyd and Spengler, 2012). Aunque se generaron muchos avances en la descripción de la programación epigenética, aún no se sabe cómo ocurre la modulación de dicha programación por el ambiente temprano (Franklin et al., 2012).

Las claves ambientales durante períodos críticos del desarrollo pueden afectar las marcas epigenéticas y, por lo tanto, la expresión de proteínas, los niveles homeostáticos basales, el desarrollo de tejidos o el crecimiento. Como resultado de estos cambios, la respuesta a desafíos ambientales que sufra el individuo a lo largo de su vida puede verse alterada por la programación temprana. Esta forma de plasticidad del desarrollo es altamente adaptativa dado que optimiza el *fitness*, preparando al individuo para futuros

ambientes y desafíos. Además, la programación epigenética permite explicar, a través de un mecanismo molecular, cómo se relaciona el ambiente temprano con el desarrollo y la progresión de enfermedades en la vida adulta, teniendo en cuenta las hipótesis sobre el efecto ambiental (ver Introducción 1.2.4).

En particular, los miRNAs también han sido relacionados con los efectos de las adversidades tempranas en la epigenética. Los miRNAs tienen la habilidad de “afinar” (“*fine-tune*”) la expresión génica. Esta capacidad es importante para controlar la expresión de patrones de genes que aseguren una estabilidad dinámica ante perturbaciones externas e internas o que favorezcan la adaptabilidad del organismo al ambiente. Los miRNAs pueden generar respuestas rápidas y reversibles y, por lo tanto, están idealmente posicionados para optimizar una respuesta al estrés (Ebert and Sharp, 2012; Kagias et al., 2012). Además, se ha demostrado una relación entre los miRNAs y las respuestas neurales al estrés en diferentes organismos modelo (Schouten et al., 2013).

## 1.5. Malnutrición como adversidad temprana

La malnutrición es una de las adversidades tempranas más frecuentes en el mundo. La Organización de las Naciones Unidas, a través de la FAO (“*The State of Food Insecurity in the World*” 2015) (FAO, 2015), reportó que 795 millones de personas sufren de malnutrición y que un tercio de estas personas son mujeres en edad fértil. El término malnutrición implica que uno o más nutrientes esenciales no está presente en la dieta o está presente en una proporción inapropiada (Alamy and Bengelloun, 2012).

La nutrición durante el desarrollo, como adversidad temprana, también puede tener efectos pronunciados en la adaptación del adulto al ambiente nutricional. Por ejemplo, las larvas de una especie de mariposas del este de África que sufrieron malnutrición, desarrollan una musculatura de la caja torácica más fuerte, lo que les permite volar más fuertemente y alcanzar así ambientes más favorables (Saastamoinen et al., 2010). En experimentos de laboratorio, las ratas embarazadas alimentadas con una dieta con restricción de calorías tienen crías de menor tamaño. Pero si a esta descendencia se les da una dieta completa luego del destete, desarrollan más obesidad (Jones and Friedman, 1982) y aumenta su apetito (Vickers et al., 2000) respecto de las crías de las madres a las que se les dio una dieta sin restricciones. Un ambiente nutricional prenatal relativamente pobre induce un fenotipo con menor masa muscular, un punto de saciedad más alto y una

preferencia por las grasas en la dieta. Este fenotipo tiene una ventaja adaptativa en un ambiente postnatal y adulto relativamente pobre en cuanto a la nutrición. A su vez, estos individuos desarrollan más enfermedades metabólicas en un ambiente nutricional adecuado. Estos estudios ilustran la hipótesis del no ajuste y la importancia de las claves ambientales durante el período perinatal (Bateson et al., 2014) (Introducción 1.2.4).

En humanos, estudios extensivos han mostrado que la composición del cuerpo materno afecta la composición del cuerpo de la descendencia, el control metabólico, la reserva neuronal, el tamaño del hígado, la maduración reproductiva y la conducta (Sloboda et al., 2007). Estos efectos recapitulan, en líneas generales, lo que se observa en estudios en animales. Por lo tanto, los niños con bajo peso al nacer, una típica consecuencia de una pobre nutrición intrauterina, entran en la pubertad más tempranamente, tienen preferencia por las dietas altas en grasas, un punto más alto de saciedad y una menor estatura. Todas estas características conforman un fenotipo adaptado a un ambiente de comida limitada durante la adultez (Bateson et al., 2014).

#### *1.5.1. Malnutrición proteica*

Uno de los tipos de malnutrición más extendidas en el mundo es la malnutrición proteica que afecta tanto a países desarrollados como a los países en vías de desarrollo. La malnutrición proteica es el resultado de una ingesta pobre en proteínas compensada con un mayor consumo de hidratos de carbono para igualar la cantidad de calorías totales. Si bien la alteración de cualquiera de los componentes de la dieta parece ejercer efectos sobre el individuo, las proteínas parecen ser el factor más crítico sobre la maduración del cerebro (Alamy and Bengelloun, 2012). Las proteínas no cruzan la placenta en cantidades significativas pero los aminoácidos sí lo hacen, y de forma activa (Zipursky and Jansson, 2001). En consecuencia, el valor nutritivo de las proteínas reside esencialmente en los aminoácidos que las mismas contienen y que son absorbidos por el sistema digestivo de la madre. Aparentemente, todos los aminoácidos esenciales son importantes para la madre y el feto, dado que la omisión de cualquiera de ellos en la dieta materna tiene efectos negativos en el cerebro del feto similares a los que produce la falta de proteínas en general (Zamenhof et al., 1974).

#### *1.5.2. Efectos de la malnutrición proteica en el desarrollo del cerebro*

La edad a la que ocurre, la duración y el tipo de malnutrición pueden impactar en distintos procesos del desarrollo del cerebro. En particular, la malnutrición parece afectar

una serie de eventos que se suceden durante el desarrollo y que incluyen la proliferación celular (neurogénesis y gliogénesis), la migración celular, la conectividad y todos los aspectos de la diferenciación celular, incluyendo la mielinización y la sinaptogénesis (Alamy and Bengelloun, 2012; Altman et al., 1970; Chertoff, 2014; Morgane et al., 1993). En este contexto, los períodos críticos del desarrollo del cerebro constituyen ventanas temporales de alta vulnerabilidad para la correcta progresión de los procesos biológicos mencionados, cuya complejidad se suma a la alta tasa de crecimiento del cerebro en general durante dichos períodos.

Se han realizado muchos estudios en ratas para evaluar el efecto en el cerebro de la malnutrición proteica, particularmente, la malnutrición materna. Se demostró que, tanto si la malnutrición proteica ocurre durante la etapa embrionaria como durante la etapa postnatal, produce una reducción en el número de células cerebrales al momento del nacimiento que se mantiene hasta el destete. Esta reducción de tamaño es aún mayor si la malnutrición se extiende a las dos etapas (Morgane et al., 1993). Por otro lado, la malnutrición proteica prenatal aumenta la duración del ciclo celular de los precursores neuronales en el día embrionario 16 en ratas (Shimada et al., 1977). Además, se mostró que la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo se ve afectada en ratas malnutridas perinatalmente hasta el día postnatal 30, lo cual está asociado a un impedimento en establecer potenciación de largo término (LTP, por sus siglas en inglés). Otro efecto producido por una dieta deficiente en proteínas sobre el sistema nervioso es la alteración en las conexiones sinápticas. En el hipocampo, las interneuronas inhibitorias resultan especialmente afectadas provocando un aumento en la inhibición que altera el flujo de impulsos que entran y salen de esta estructura (Morgane et al., 2002).

### *1.5.3. Efectos de la malnutrición proteica a nivel epigenético*

Las evidencias muestran que los niveles dietarios maternos de dadores de grupos metilo pueden influenciar la expresión génica de la descendencia a través de modificaciones epigenéticas (Hoet and Hanson, 1999; Zeisel, 2009). Experimentos con ratas han mostrado que la metilación de los promotores de GR y PPAR $\alpha$  (receptor de peroxisoma activado por proliferación) se encuentra reducida en el tejido hepático de la descendencia sometida a una malnutrición proteica perinatal, y que esta reducción puede ser revertida cuando se suplementa la dieta materna con dadores de grupos metilo (Lillicrop et al., 2007, 2008). Estos efectos pueden estar relacionados con la expresión de DNMT1, la cual se ve disminuida ante la restricción proteica en la dieta (Lillicrop et al., 2007). La regulación de la

metilación del DNA por la nutrición prenatal también fue observada en el cerebro, asociada a desregulaciones de DNMT1 (Kovacheva et al., 2007), lo cual sugiere que en este periodo de rápida división celular durante el desarrollo del feto el nivel de dadores de grupos metilo puede tener un impacto significativo en la actividad transcripcional, y que puede mantenerse hasta edades adultas (Fagiolini et al., 2009).

Diversos estudios muestran una correlación entre la existencia de modificaciones epigenéticas y experiencias tempranas adversas tanto en roedores (Champagne et al., 2006; Roth et al., 2009; Weaver et al., 2004) como en humanos. Un ejemplo de esta correlación lo constituye el caso de la hambruna holandesa anteriormente citada (Introducción 1.2.4), donde se observó que, además del impacto sobre el metabolismo y la cognición, los hijos de las madres malnutridas durante el embarazo presentaban un perfil epigenético alterado incluso 60 años después (Heijmans et al., 2008; Tobi et al., 2009). Debido a que se ha observado que las modificaciones epigenéticas de algunos genes en el sistema nervioso central correlacionan con las marcas presentes en tejidos periféricos como la sangre, se planteó el uso de las marcas epigenéticas como biomarcadores de adversidades tempranas y de psicopatologías (Guidotti et al., 2014; Kundakovic and Champagne, 2014).

En este sentido, otro estudio reciente realizado con muestras de DNA de sangre en humanos adultos identificó 134 regiones diferencialmente metiladas entre individuos que sufrieron una malnutrición proteica durante su primer año de vida e individuos controles. Muchos de los genes afectados por la metilación diferencial resultaron ser genes asociados a un mayor riesgo de presentar enfermedades neuropsiquiátricas. Además, los individuos malnutridos mostraron déficits de atención y disminución de coeficiente intelectual. Notablemente, el mismo grupo realizó experimentos en ratas que mostraron una expresión disminuida de los genes mencionados en la corteza prefrontal (PFC). Por lo tanto, la malnutrición temprana conlleva modificaciones epigenéticas duraderas que pueden afectar la atención y la cognición (Peter et al., 2016).

## **1.6. Resumen de resultados de nuestro laboratorio y de otros con respecto a la malnutrición proteica perinatal**

En el Laboratorio de Neuroepigenética del Departamento de Química Biológica (FCEyN, UBA) se ha desarrollado un modelo de malnutrición perinatal en ratones. En este modelo se ha demostrado que los ratones nacidos de madres alimentadas con una dieta

deficiente en proteínas durante la preñez y la lactancia (HP) presentan un retraso en su desarrollo físico y neurológico comparado con los ratones de madres alimentadas con una dieta normal (NP). Como adultos jóvenes, los ratones presentan evidentes signos de comportamiento ansioso y un fenotipo depresivo, observado especialmente en hembras. En relación con las capacidades cognitivas, los ratones HP exhiben deficiencias en diversos tipos de memoria dependiendo del sexo y de la edad. Por otro lado, las madres alimentadas con una dieta hipoproteica dispensan un menor cuidado a sus crías (Belluscio et al., 2014). Por consiguiente, mientras que el comportamiento de tipo ansioso y la memoria de trabajo se mantienen igualmente alterados durante toda la vida, la actividad exploratoria y la motivación se ven afectadas en las primeras etapas. Por el contrario, se observó que las funciones neuromusculares son similares en ambos grupos de ratones durante las primeras semanas de vida pero, sin embargo, los ratones de ambos sexos sujetos a la malnutrición perinatal, presentan una disminución significativamente mayor de estas funciones a edades tardías (Ferroni, 2014).

Otros laboratorios han estudiado los efectos de la malnutrición perinatal con especial énfasis en el cerebro. Las crías de ratas expuestas a una dieta hipoproteica durante la preñez y la lactancia presentaron alteraciones fisiológicas y anatómicas en el cerebro (Resnick et al., 1979). La distribución y los niveles de aminas resultaron estar modificados, así como también el metabolismo de triptófano. La administración de una dieta normal a la descendencia luego del destete restauró algunos de los parámetros evaluados pero, sin embargo, los cambios en la concentración de aminas persistió (Resnick et al., 1979). Además, la densidad de los vasos sanguíneos del cerebro se encontró reducida en las crías de madres malnutridas y permaneció alterada luego de la administración postdestete de una dieta completa (Hoet and Hanson, 1999).

Diversos trabajos experimentales en roedores han estudiado las consecuencias de la malnutrición proteica en el desarrollo del cerebro y en el comportamiento. Se mostró que la malnutrición proteica durante las primeras etapas de la vida puede afectar la neurogénesis, la migración celular, la diferenciación y la plasticidad (Huber et al., 2013; Levay et al., 2008; Santillán et al., 2010; Wainwright et al., 1999). Además, se ha reportado en ratas que aquellos individuos que habían sufrido de una malnutrición pre y posnatal presentaban una reactividad emocional a los estímulos aversivos o de dolor (De Oliveira and Almeida, 1985), una alteración en la evaluación de riesgo (Reyes-Castro et al., 2012), una reducción en la flexibilidad cognitiva (Smart, 1993) y problemas de aprendizaje y memoria (Barnes et al., 1966).

La incidencia de diversas enfermedades relacionadas con el desarrollo neurológico difiere ampliamente entre sexos. Mientras que el autismo y la esquizofrenia tiene mayor incidencia en hombres que en mujeres, los trastornos depresivos son dos veces más comunes en mujeres que en hombres. Sin embargo, pese a las obvias diferencias de género en la incidencia de diversos desórdenes comportamentales, poco se sabe acerca de la posible dependencia del sexo de los efectos de la malnutrición sobre la cognición (Clancy et al., 2007).

Finalmente, la duración y la magnitud de la malnutrición está directamente relacionada con la persistencia de sus efectos sobre el desarrollo del cuerpo y de los cambios comportamentales (Laus et al., 2011). Estudios en animales y humanos indican que la combinación de la malnutrición pre y posnatal tiene efectos más deletéreos que la malnutrición restringida al período prenatal (Morgane et al., 2002). Teniendo en cuenta la alta incidencia de la inseguridad nutricional dentro de la población de menores ingresos, es probable que la mayoría de los niños que han sufrido de una privación nutricional durante la gestación, sigan expuestos a la misma durante la etapa de la lactancia (Heim and Nemeroff, 2009; Kar et al., 2008; Korosi et al., 2012; Rice and Barone, 2000).

Es entonces claro que, a partir de un amplio rango de estudios en animales y humanos, una dieta materna nutricionalmente pobre afecta el desarrollo de tejidos clave, particularmente, el cerebro, y puede ser responsable de los cambios patológicos observados en la descendencia.

## **1.7. Reversión fenotípica**

En base a los estudios de la programación temprana y de los efectos de la neuroplasticidad en el modelado de las conexiones sinápticas y circuitos neuronales luego de una adversidad en los períodos críticos del desarrollo, surge la pregunta de si esta neuroplasticidad persiste en individuos adultos. Durante muchos años, se pensó que, una vez cerradas las ventanas temporales de los períodos críticos en cuanto a la neuroplasticidad, el cerebro quedaba en una fase estática y pocos o nulos cambios podían evidenciarse en su estructuración.

Los clásicos experimentos de David Hunter Hubel y Torsten Nils Wiesel (Wiesel and Hubel, 1963) mostraron que la privación temprana de la visión afecta la anatomía y la fisiología de la corteza visual. Reportaron que ocluir un ojo durante el desarrollo temprano

resulta en una reducción del número de células de la corteza visual que responden al ojo ocluido y un aumento significativo en el número de neuronas activadas por el ojo no ocluido. La misma manipulación de oclusión no producía ningún efecto sobre el número de neuronas en la corteza visual del individuo adulto y, por esta razón, este funcionamiento se convirtió en un ejemplo clásico de período crítico (Sale et al., 2009) (Introducción 1.2.3).

Por lo tanto, no resultaba esperable para ese momento que, ratas de laboratorio adultas sometidas a sutiles variaciones de sus condiciones de alojamiento, pudieran presentar cambios anatómicos y químicos en el cerebro. Se encontró que alojar a ratas adultas en un ambiente rico en estímulos sensoriales inducía cambios en la estructura del cerebro y en los niveles de la enzima acetilcolinesterasa (Krech et al., 1960; Rosenzweig and Bennett, 1969). Además, se demostró que el ambiente adulto podía generar cambios neuroanatómicos, como la ramificación dendrítica, la longitud dendrítica y la densidad de espinas (Diamond et al., 1976; Globus et al., 1973). Estas observaciones entraban en contraposición con la idea prevalente en ese momento acerca de lo estático y fijo que resultaba el cerebro adulto ante influencias ambientales. Sin embargo, estos estudios constituyeron la base para el estudio de la reversión fenotípica a través del enriquecimiento ambiental. Evidencias más modernas sobre la posibilidad de neurogénesis adulta (van Praag et al., 2000), como forma de neuroplasticidad en organismos ya desarrollados, le dieron al paradigma del ambiente enriquecido una nueva resonancia.

#### *1.7.1. Reversión ambiental a través de un ambiente enriquecido*

La definición clásica de enriquecimiento ambiental (EE) es “una combinación compleja de estímulos inanimados y sociales” (Rosenzweig et al., 1978). Los animales enriquecidos son criados en grandes grupos y mantenidos en un ambiente amplio donde cuentan con una variedad de objetos (como juguetes, túneles, escaleras y material de anidamiento) que son intercambiados con cierta frecuencia, dependiendo del paradigma utilizado (Sale et al., 2009). De esta manera, el ambiente enriquecido consta de tres ejes: 1) estimulación sensorial y experiencia motora, 2) curiosidad y exploración voluntaria, y 3) interacción social. Los animales son expuestos al EE durante varias semanas, durante las cuales estos tres ejes interactúan sinérgicamente para influir sobre la neuroplasticidad (Hirase and Shinohara, 2014; Nithianantharajah and Hannan, 2006; Pang and Hannan, 2013).

Usualmente, se asume que el EE es una forma de asemejar el ambiente de los animales de laboratorio a las condiciones de su vida salvaje. Sin embargo, las observaciones

que muestran a los roedores de laboratorio en ambientes enriquecidos eligiendo cómo, cuándo y cuánto correr y explorar los objetos, indica que el EE implica cierta interacción con el ambiente que está libre de los desafíos que los individuos podrían encontrar en un ambiente natural. Mientras que en la vida salvaje el comportamiento de los roedores está principalmente ligado a la necesidad, en el EE suele estar más asociado con el juego y la curiosidad (Sale et al., 2009).

El EE presenta una variedad de efectos en el cerebro que han sido documentados en numerosas especies animales desde ratas y ratones hasta gatos y monos (Sale et al., 2009). En roedores, el EE reduce la reactividad emocional (Fernandez-Teruel et al., 1992) y favorece el aprendizaje dependiente de hipocampo en el adulto (Leggio et al., 2005). Además, sirve de protección contra la declinación cognitiva de la edad (Lores-Arnaiz et al., 2006; Segovia et al., 2009). También aminora los efectos adversos del estrés, promoviendo la capacidad homeostática de enfrentarse al mismo, y resulta en muchos casos ansiolítico (Mitra and Sapolsky, 2009; Segovia et al., 2009). Notablemente, el EE restaura los déficits conductuales generados puramente por influencia genética (Rampon et al., 2000). A nivel celular, el EE estimula la neurogénesis adulta (Kempermann et al., 1997), es neuroprotector (Young et al., 1999) y aumenta la plasticidad sináptica (Irvine et al., 2006). A nivel molecular, el EE aumenta la expresión de neurotrofinas, como NGF y BDNF, y otros genes relacionados con el aprendizaje y la memoria. Por último, en humanos, el EE puede reducir el tamaño de una lesión cerebral luego de un golpe (Mitra and Sapolsky, 2012; Savioz et al., 2009; Ye Xiong, Asim Mahmood, 2009).

Todas estas evidencias sugieren que el EE promueve el bienestar de los organismos (Mitra and Sapolsky, 2012). Hace algunos años, de hecho, también se han encontrado efectos de recuperación ante el cáncer (Cao et al., 2010). Más allá de su efecto en el mejoramiento generalizado, el EE tiene efectos de resiliencia, de mitigación y de recuperación en varias condiciones neuropatológicas (Hirase and Shinohara, 2014).

Los cambios producidos por el EE están sustentados en cambios significativos en la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en la estructura neuronal, transmisión y plasticidad sináptica, modulación de la síntesis de neurotrofinas, reguladores del ciclo celular, entre otros. Es decir que el mejoramiento o recuperación de la neuroplasticidad, a través del EE, está apoyada en cambios en el programa transcripcional dado por alteraciones en los numerosos mecanismos de regulación que pueden estar involucrados, como ser, factores de transcripción, remodelación de la cromatina, metilaciones del DNA, miRNAs, etc (Baroncelli et al., 2010).

Si bien muchos de estos estudios mencionados utilizaron modelos de animales de laboratorio, el ambiente enriquecido, como intervención temprana para el mejoramiento de las condiciones de vida, también se probó en humanos.

### 1.7.2. *Intervenciones tempranas*

Los niños y adolescentes de bajo estatus socioeconómico (ESE), comparados con aquellos de más alto ESE, presentan una mayor prevalencia de trastornos de depresión y ansiedad, desórdenes de conducta como impulsos agresivos, tendencia a actitudes violentas y menor capacidad de autocontrol. Además, los niños con bajo ESE presentan déficit en las habilidades cognitivas, problemas de atención, menor capacidad de análisis lógico y pobreza de lenguaje, por lo que se ve afectado su desempeño académico. Se ha demostrado que estas deficiencias correlacionan directamente con la duración de su permanencia en un ESE bajo (Farah et al., 2006; Kar et al., 2008; Santos et al., 2008).

Estas circunstancias hacen que el niño se retrase en su aprendizaje respecto a sus compañeros y se le torne cada vez más difícil enfrentarse al ámbito escolar, acrecentando las probabilidades de la deserción temporal y luego el abandono definitivo. Junto a la desventajosa situación social en la que se encuentra, se suma la pérdida de la formación escolar como opción niveladora, por lo que el niño se expone a una pérdida irreversible de oportunidades. Esta situación causa que este niño, de adulto, enfrente barreras sociales y económicas similares, alimentando un círculo desgraciado y recreando situaciones similares en las siguientes generaciones. La intervención del Estado es obligatoria y la de la sociedad toda fundamental para tratar de recuperar estas amplias franjas de ciudadanos que se ven privados de una vida acorde a sus potencialidades. Sin embargo, en general por falta de información y conocimiento, la mayoría de las veces estas políticas, intervenciones o programas llegan tarde o son, por lo tanto, ineficaces.

Aunque los niños son particularmente más vulnerables a los efectos negativos de la pobreza, sus organismos son también más maleables en respuesta a las intervenciones. El éxito de las intervenciones tempranas, como el “Programa Preescolar Perry” (“*Perry Preschool Program*”) demuestra que el impacto de la pobreza puede ser prevenible o reversible niveles cognitivos y conductuales (Heckman et al., 2012). Este programa brinda una preescolaridad de alta calidad a niños de 3 y 4 años de bajos ingresos, y los compara con un grupo de la misma edad y condición social, pero que no recibió preescolaridad. Se encontraron impactos positivos y sostenibles del programa en cuanto a logros educativos y habilidades sociales. Además, algunas de estas mejoras han sido relacionadas con medidas

electrofisiológicas de las funciones cerebrales que sostienen la atención selectiva (Neville et al., 2013). Otros estudios basados en programas de intervención han evaluado el efecto de la calidad de la crianza y de la interacción niños-padres, encontrando una mejora cognitiva (Johnson et al., 2016; Mendelsohn et al., 2007, 2011).

La malnutrición, en particular, está asociada generalmente a situaciones de pobreza y, por lo tanto, a un escaso acceso a las distintas etapas educativas. Al respecto, y como ya fue mencionado, la estimulación intelectual, sensorial y afectiva, revierte, al menos parcialmente, el déficit cognitivo y emocional. Sin embargo, esta recuperación es lenta y aleatoria. A pesar de que la investigación sobre la reversibilidad de estas situaciones adversas en humanos es escasa por el momento, las intervenciones cuidadosas basadas en estudios neurocientíficos, entre otras disciplinas, podrían a la larga mejorar las prácticas para reducir las inequidades en la salud, y mejorar las consecuencias del ESE de los niños (Johnson et al., 2016).

### 1.7.3. *Reversión genética y farmacológica*

En modelos animales, además de la reversión ambiental, también pueden encontrarse estudios en los cuales la reversión fenotípica se alcanza mediante herramientas genéticas o farmacológicas, ya sea administradas en los períodos perinatales o en los individuos adultos. Cuando las ratas expuestas a un nivel de nutrición materna pobre durante el periodo prenatal, son tratadas al nacer con leptina, los cambios observados por la malnutrición en la expresión génica y los cambios epigenéticos fueron prevenidos (Gluckman et al., 2007; Vickers et al., 2005). Estudios similares en los que se administraron hormonas de crecimiento a la descendencia de madres malnutridas, encontraron resultados de reversión similares (Reynolds et al., 2013), mostrando que el efecto de la leptina no es específico y sugiriendo que varias claves ambientales durante el desarrollo temprano pueden inducir respuestas adaptativas fenotípicas (Bateson et al., 2014).

Al presente, se han identificado 33 genes cuya expresión modificada individualmente incrementa las habilidades cognitivas en ratones adultos (Lehrer, 2009). Algunos ejemplos son: la sobreexpresión de NRB2 (Tang et al., 1999), la de HRas en neuronas excitatorias (Kushner, 2005), la deficiencia condicional de CDK5 en cerebro (Hawasli et al., 2007) y la inhibición de calcineurina (Malleret et al., 2001). Estos animales aprenden más rápido, recuerdan eventos por tiempos más largos y resuelven problemas más complejos que los ratones normales.

Debido a que los mecanismos moleculares utilizados en el cerebro para formar memorias de largo término son casi idénticos en humanos y roedores, hay una expectativa justificada en que la manipulación de estos genes pueda resultar en tratamientos adecuados para una gran variedad de problemas de aprendizaje y memoria en los humanos. Los trabajos mencionados logran principalmente recuperar la neuroplasticidad que se va perdiendo en los estadios adultos. Sin embargo, los ratones con expresión modificada de un determinado gen no están exentos de distintos tipos de problemas, como una mayor sensibilidad al dolor, mayor incidencia de tumores o deficiente control de la respuesta al estrés (Lehrer, 2009). Pero, más allá de las dificultades, señala un camino disponible para ser transitado cuidadosamente para la reversión de un problema que afecta a un sector importante de la población mundial.

Particularmente de interés para este trabajo, los miRNAs poseen una característica única que se basa en su capacidad para regular complejos circuitos de genes de forma local y rápida, convirtiéndolos en atractivos candidatos para operar sobre la plasticidad sináptica y aplicar terapias para tratar desórdenes mentales. La caracterización del rol de los miRNAs individuales, o de los cambios globales de miRNAs inducidos por la alteración de su biogénesis, en la plasticidad sináptica podría generar avances en el conocimiento de la regulación de la función sináptica y así proveer nuevas herramientas para generar terapias basadas en la biología molecular para tratar desórdenes del sistema nervioso (Schouten et al., 2013).

Varios ensayos preliminares sugieren que la prevención y la terapia individualizada a través de óptimas “dietas o drogas epigenéticas” son concebibles para tratar de enfermedades relacionadas con la edad y los estilos de vida. De todos modos, estas intervenciones requerirán esfuerzos intensos para entender la complejidad de los factores genéticos, epigenéticos y, sobretodo, ambientales para evaluar su potencial terapéutico con mínimos efectos laterales (Attig et al., 2010).

## 2. Objetivos e hipótesis

### 2.1. Objetivo general

El presente trabajo se enmarca en un proyecto del laboratorio de Neuroepigenética y Adversidades Tempranas del Departamento de Química Biológica (FCEyN, UBA) tendiente a estudiar los efectos de la malnutrición proteica perinatal sobre la emotividad y la cognición en ratones, intentando encontrar las bases epigenéticas que subyacen el establecimiento de un fenotipo. Al mismo tiempo, se busca revertir los efectos producidos en la conducta a través de la exposición a un ambiente enriquecido luego del destete.

### 2.2. Objetivos específicos

#### 2.2.1. *Reversión del fenotipo conductual*

Evaluar si el ambiente enriquecido revierte los déficits emotivos y cognitivos previamente descriptos en ratones malnutridos perinatalmente.

#### 2.2.2. *Rol de microRNAs*

Estudiar el rol de los microRNAs, como mecanismo epigenético, en el establecimiento de los déficits conductuales y de su potencial reversión.

#### 2.2.3. *Procesos celulares implicados*

Realizar un estudio de los potenciales genes blanco de los microRNAs desregulados por la malnutrición materna y de las posibles vías celulares afectadas para luego evaluarlas experimentalmente.

### 2.3. Hipótesis

La regulación diferencial de la expresión génica por microRNAs en ratones sometidos a malnutrición perinatal altera procesos biológicos que explican, en parte, los déficits conductuales observados. El ambiente enriquecido postdestete restaura el patrón de expresión de microRNAs y, por lo tanto, el comportamiento de los ratones.



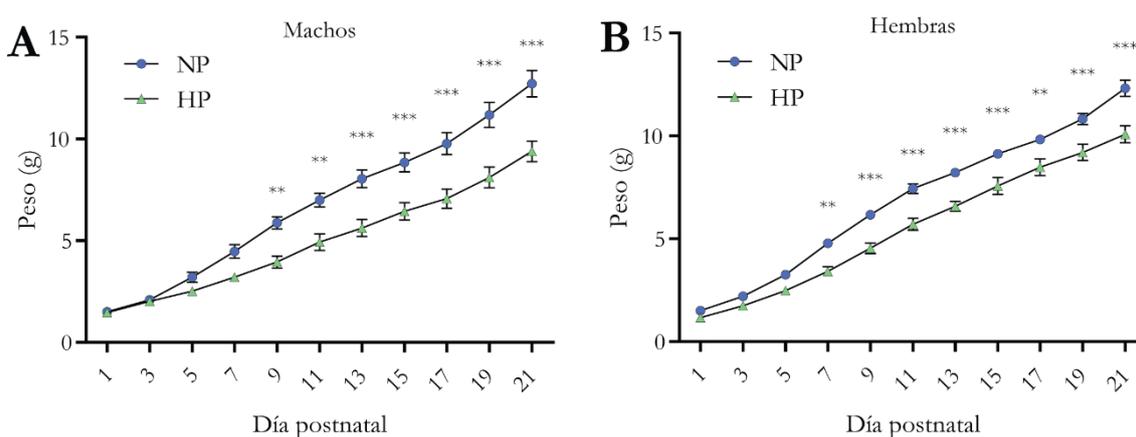
### 3. Resultados

#### 3.1. Caracterización del modelo de malnutrición perinatal

Se evaluaron diferentes parámetros generales con la idea de caracterizar el modelo de malnutrición proteica perinatal en ratones CF-1. Algunos de ellos corroboran observaciones previas del laboratorio y otros son aportes novedosos a dicha caracterización.

##### 3.1.1. Peso corporal

El peso corporal de los ratones fue seguido durante toda la lactancia. Si bien los grupos NP y HP no presentaron diferencias al nacimiento, las curvas de crecimiento se diferencian con el tiempo. Se observó un menor peso en las crías HP respecto de las NP a partir del día postnatal 9 (P9) en machos (**Figura 5A**) y 7 (P7) en hembras (**Figura 5B**).



**Figura 5 | Curva de pesos corporales de la F1 durante la lactancia.**

Los pesos corporales de ratones NP y HP fueron medidos cada 2 días durante toda la lactancia. **A**, Curvas de peso de los machos. ANOVA de dos factores con medidas repetidas para la dieta ( $F_{1,160} = 17,15$ ;  $p = 0,0008$ ), el tiempo ( $F_{10,160} = 341,0$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el tiempo ( $F_{10,160} = 11,36$ ;  $p < 0,0001$ ). **B**, Curvas de peso de las hembras. ANOVA de dos factores con medidas repetidas para la dieta ( $F_{1,160} = 51,94$ ;  $p < 0,0001$ ), el tiempo ( $F_{10,180} = 403,4$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el tiempo ( $F_{10,160} = 3,02$ ;  $p = 0,0016$ ). El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que los pesos de las crías HP, entre P9 y P21 para los machos, y entre P7 y P21 para las hembras, fue significativamente menor que los de las crías NP. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

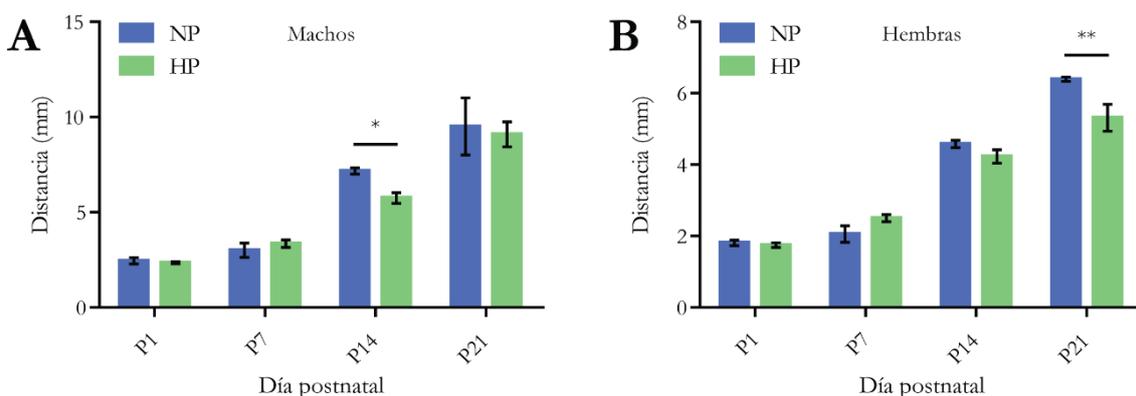
##### 3.1.2. Distancia ano-genital (DAG)

Si bien el énfasis de los efectos del estrés perinatal suele ubicarse sobre el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), otros sistemas hormonales pueden verse afectados,

tanto directamente como a través de interacciones con el eje HPA. Las hormonas sexuales esteroideas son un claro candidato y, de hecho, se ha visto que, ante situaciones de estrés prenatal, la liberación de testosterona en el feto macho se encuentra disminuida (Barrett and Swan, 2015; Sarkar et al., 2007).

La distancia ano-genital (DAG) refleja el nivel de exposición a andrógenos, una de las hormonas esteroideas sexuales, durante la gestación en humanos (Mendiola et al., 2011) y en roedores (Earl Gray et al., 2006; Foster, 2006). Una exposición gestacional a andrógenos disminuida genera una feminización en la descendencia que impacta en el potencial reproductivo del individuo (Eisenberg et al., 2011; Mendiola et al., 2011). Además, este parámetro morfométrico ha sido relacionado con el estrés perinatal (Dahlöf et al., 1978; Ward and Weisz, 1980).

Para evaluar un posible efecto de la malnutrición temprana sobre el sistema de hormonas sexuales, se midió la DAG en ratones NP y HP durante la lactancia. Se observó una disminución significativa de este parámetro en machos HP a P14 (Figura 6A) y en hembras HP a P21 (Figura 6B).



**Figura 6 | Evaluación de la distancia ano-genital durante la lactancia.**

La distancia ano-genital (DAG) de ratones NP y HP fue medida a P1, P7, P14 y P21 durante la lactancia. **A**, DAG de los machos. ANOVA de dos factores con medidas repetidas para la dieta ( $F_{1,26} = 2,61$ ;  $p = 0,1183$ ), el tiempo ( $F_{3,26} = 157,9$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el tiempo ( $F_{3,26} = 2,44$ ;  $p = 0,0868$ ). **B**, Curvas de peso de las hembras. ANOVA de dos factores con medidas repetidas para la dieta ( $F_{1,30} = 4,57$ ;  $p = 0,0408$ ), el tiempo ( $F_{3,30} = 224,5$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el tiempo ( $F_{3,30} = 5,98$ ;  $p = 0,0025$ ). El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que la DAG de los machos HP a P14 y de las hembras a P21 fue significativamente menor que la de las crías NP. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 3-9$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

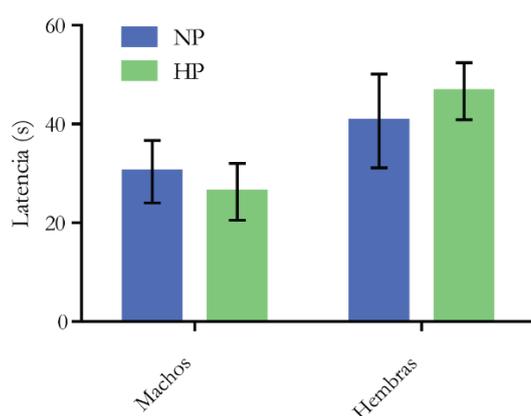
Si bien la disminución de la DAG en machos es consistente con estudios previos que utilizaron otros modelos de estrés perinatal (Desaulniers et al., 2016; Pallarés et al., 2013), los resultados observados en las hembras podrían estar relacionados con disregulaciones de las concentraciones de hormonas sexuales. Estas diferencias en la DAG

podrían ser un reflejo de las susceptibilidades diferenciales a ciertos desórdenes psiquiátricos entre machos y hembras (Weinstock, 2007).

### 3.1.3. Preferencia por el olor materno

Además de las posibles diferencias que podría generar la malnutrición perinatal en las hormonas que controlan el eje HPA o las que controlan el sistema de diferenciación sexual, recientes evidencias sugieren que la amígdala podría ser programada por un estrés temprano (Davidson and McEwen, 2012). Particularmente, alrededor del día P10 durante el desarrollo, las crías experimentan un periodo sensible para el aprendizaje del olor materno. Durante este periodo, las crías muestran una reducción del aprendizaje al miedo, el cual está mediado por la amígdala, y cuya disminución es crucial para el correcto desarrollo del apego entre madre y cría (Daskalakis et al., 2013; Sullivan and Holman, 2010). Además, ha sido reportado que el estrés de restricción física prenatal afecta negativamente la preferencia de ratas estresadas por el olor del nido materno en una forma sexo-dependiente, resultando las hembras más afectadas (De Souza et al., 2012).

Para evaluar si la adquisición del aprendizaje del olor materno era afectada por la malnutrición, se sometió a crías NP y HP a un test olfativo. A la edad de P10, se midió la latencia a acercarse a la viruta del nido materno. No se observaron diferencias significativas entre ratones NP y HP, ni en machos ni en hembras. Sin embargo, se encontró un efecto significativo del factor sexo, presentando las hembras una mayor latencia para acercarse a la viruta del nido (Figura 7), consistente con resultados previos (De Souza et al., 2012).



**Figura 7 | Evaluación de la preferencia al olor materno.**

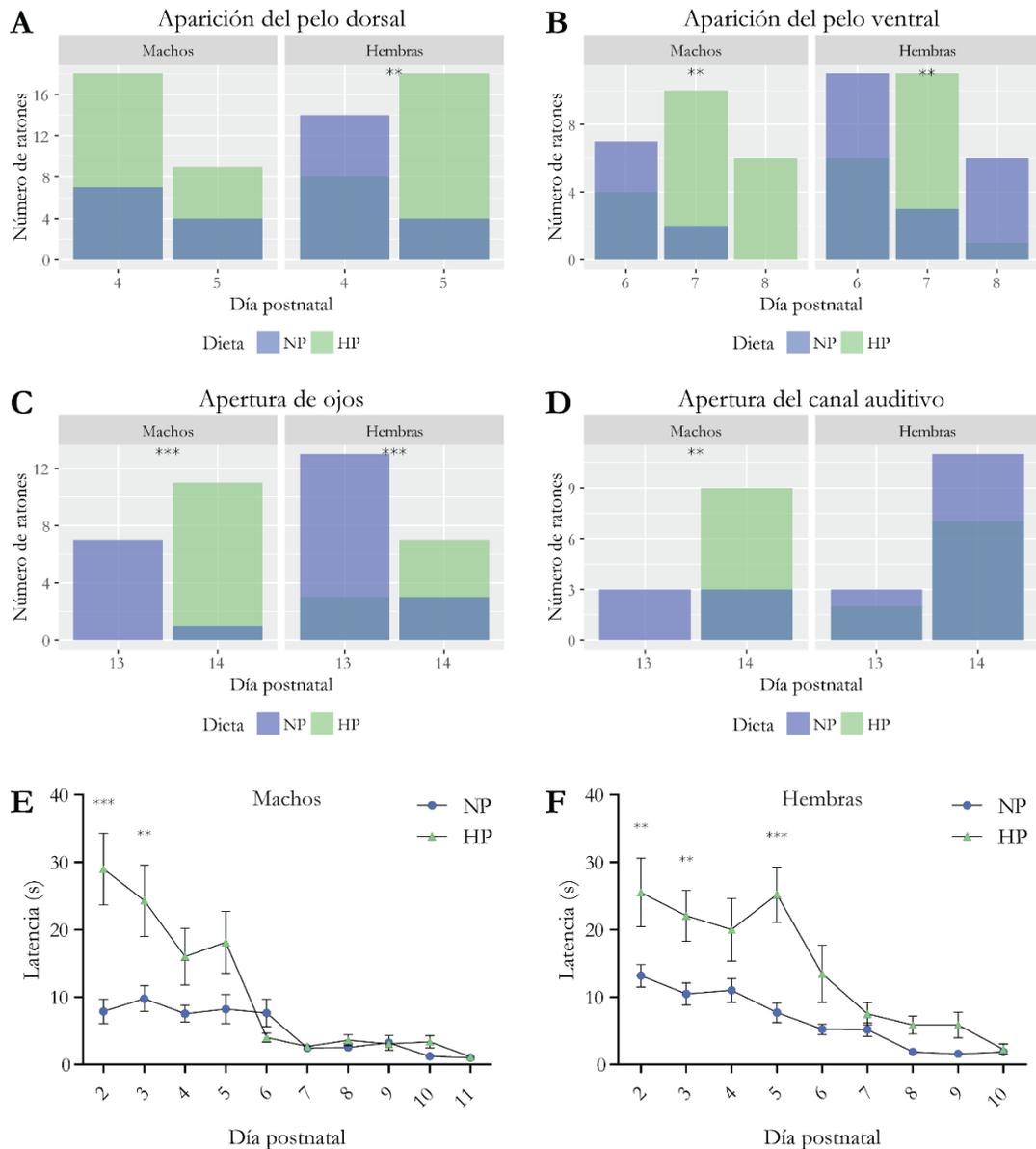
La preferencia al olor del nido materno se evaluó a P10 en ratones NP y HP, tanto en machos como en hembras. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,41} = 0,02$ ;  $p = 0,8880$ ), el sexo ( $F_{1,41} = 5,14$ ;  $p = 0,0287$ ) e interacción para la dieta con el sexo ( $F_{1,41} = 0,56$ ;  $p = 0,4585$ ). Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 11-15$ ).

Los resultados sobre la ausencia de diferencias en la preferencia al olor materno entre crías NP y HP podría sugerir que los ratones HP no presentan alteraciones en la formación de los circuitos responsables de este aprendizaje. Sin embargo, estudios previos de nuestro laboratorio (Belluscio et al., 2014; Gianatiempo, 2016) mostraron que las madres HP dispensan un comportamiento materno de cuidado más bajo que las madres NP, lo cual podría redundar en alteraciones de dicho aprendizaje que no se ven reflejadas en la preferencia al olor materno.

#### 3.1.4. *Desarrollo físico y neurológico*

Por otro lado, se evaluó el desarrollo físico y neurológico de las crías a través de la observación de la aparición del pelo dorsal y ventral, la apertura del canal auditivo, la apertura de ojos y la evolución del reflejo de enderezamiento. Estas características ya habían sido estudiadas previamente (Belluscio et al., 2014), pero se repitieron en este trabajo con el objetivo de validar el modelo de malnutrición. Se observó un retraso en la aparición del pelo dorsal sólo en hembras (**Figura 8A**), y un retraso en la aparición del pelo ventral en ambos sexos (**Figura 8B**), en los ratones HP respecto de los NP. Además, la apertura de ojos se produjo más tardíamente en ratones HP, tanto en machos como en hembras (**Figura 8C**). Y los machos HP presentaron una apertura del canal auditivo retrasada respecto de los NP (**Figura 8D**).

En cuanto al desarrollo neurológico, cuando se evaluó el reflejo de enderezamiento en superficie, se observaron diferencias significativas en la latencia al enderezamiento en los primeros días postnatales, tanto en machos (**Figura 8E**) como en hembras (**Figura 8F**). La adquisición de este reflejo es indicativa de la función cerebelar.



**Figura 8 | Evaluación de parámetros físicos y neurológicos del desarrollo.**

Desarrollo físico y neurológico de ratones NP y HP durante la lactancia. **A**, Día postnatal de aparición del pelo dorsal para machos y hembras. Test de Chi-cuadrado (machos:  $X^2_1 = 0,0319$ ;  $p = 0,4291$  y hembras:  $X^2_1 = 9,402$ ;  $p = 0,0011$ ). **B**, Día postnatal de aparición del pelo ventral para machos y hembras. Test de Chi-cuadrado (machos:  $X^2_2 = 9,32$ ;  $p = 0,0095$  y hembras:  $X^2_2 = 9,535$ ;  $p = 0,0085$ ). **C**, Día postnatal de apertura de ojos para machos y hembras. Test de Chi-cuadrado (machos:  $X^2_1 = 15,24$ ;  $p < 0,0001$  y hembras:  $X^2_1 = 6,829$ ;  $p < 0,0001$ ). **D**, Día postnatal de apertura del canal auditivo para machos y hembras. Test de Chi-cuadrado (machos:  $X^2_1 = 5,63$ ;  $p = 0,0089$  y hembras:  $X^2_1 = 0,002$ ;  $p = 0,4820$ ). **E**, Latencia a adquirir el reflejo de enderezamiento para machos NP y HP. ANOVA de dos factores con medidas repetidas para la dieta ( $F_{1,180} = 13,45$ ;  $p = 0,0015$ ), el tiempo ( $F_{9,180} = 11,73$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el tiempo ( $F_{9,180} = 4,14$ ;  $p < 0,0001$ ). **F**, Latencia a adquirir el reflejo de enderezamiento para hembras NP y HP. ANOVA de dos factores con medidas repetidas para la dieta ( $F_{1,240} = 18,62$ ;  $p = 0,0002$ ), el tiempo ( $F_{8,240} = 18,09$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el tiempo ( $F_{8,240} = 3,12$ ;  $p = 0,0022$ ). El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que la latencia para adquirir este reflejo fue significativamente mayor en los machos HP a P2 y P3, mientras que para las hembras HP fue significativamente mayor a P2, P3 y P5, comparados con machos y hembras NP, respectivamente. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 9-13$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

La evaluación del desarrollo físico y neurológico mostró que la malnutrición perinatal genera un retraso en la aparición de ciertas características, como ser, la aparición de pelo, la apertura de ojos y la adquisición del reflejo de enderezamiento, tanto en machos como en hembras HP, como fue demostrado previamente (Belluscio et al., 2014). Estos resultados validaron el modelo de malnutrición materna utilizado para los experimentos de esta tesis.

### 3.1.5. *Peso del cerebro*

En consonancia con el interés en el estudio de los efectos de la malnutrición perinatal sobre la conducta, tanto en la cognición como en los estados emocionales, se midió el peso del cerebro y de los hipocampos en ratones NP y HP recién destetados, es decir, a P21. El peso del cerebro resultó ser menor en los machos HP respecto de los machos NP, mientras que en las hembras se observó también una tendencia en el mismo sentido, sin resultar estadísticamente significativa (**Tabla 1**). El peso de los hipocampos resultó ser significativamente menor en los ratones HP que en los NP en ambos sexos (**Tabla 1**). Y cuando se relativizó el peso de los hipocampos al del cerebro, este cociente fue significativamente menor en los ratones HP, tanto en machos como en hembras (**Tabla 1**).

**Tabla 1 | Pesos del cerebro y de los hipocampos**

	Machos		Hembras	
	NP	HP	NP	HP
<b>Cerebro</b>				
Peso promedio (mg)	397,8	371,0 *	382,4	368,9
SD	30,91	25,96	28,96	28,96
<b>Hipocampos</b>				
Peso promedio (mg)	18,25	15,02 #	16,31	13,68 *
SD	3,79	2,18	3,16	3,36
<b>Hipocampos / Cerebro</b>				
Porcentaje (%)	4,56	4,04 †	4,27	3,70 †
SD	0,80	0,47	0,80	0,84
* Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) respecto de NP; <i>t-Student</i> desapareado				
† Significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) respecto de NP; <i>test de Mann-Whitney</i>				
# Significativamente diferente ( $p < 0,01$ ) respecto de NP; <i>corrección de Welch</i>				

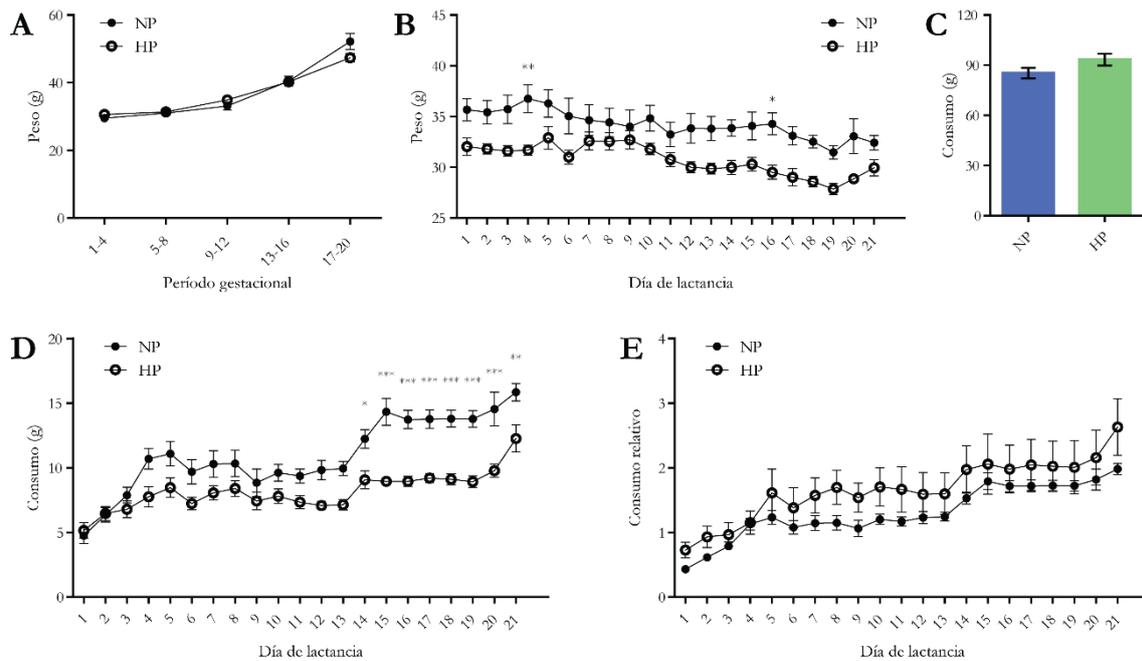
La malnutrición proteica perinatal generó una disminución en el peso del hipocampo relativo al peso del cerebro, lo cual podría conllevar consecuencias importantes a nivel conductual en la descendencia de las madres hipoproteicas (ver Discusión 4.2.3).

### 3.1.6. Pesos y consumo de la F0

El peso corporal de las madres F0 fue medido durante la gestación y la lactancia. Las hembras preñadas de ambos grupos mostraron un incremento de peso similar durante la gestación (**Figura 9A**). Sin embargo, después de parir, el peso de las madres HP presentó una tendencia a ser menor que el de las madres NP, mostrando diferencias significativas en los días P4 y P16 (**Figura 9B**).

La condición nutricional de las crías depende casi exclusivamente del consumo materno de nutrientes y calorías. Por lo tanto, se midió el consumo de comida de las madres NP y HP durante la preñez y la lactancia. Durante la preñez el consumo de comida resultó ser similar entre ambos grupos (**Figura 9C**). Después del nacimiento de la F1, se observó que las madres NP comieron más comida por día que las HP desde el día de lactancia 15 hasta el destete (**Figura 9D**). Sin embargo, el consumo relativo de comida, es decir, la cantidad de comida consumida por día relativa al número de crías lactantes, fue similar para ambos grupos (**Figura 9E**).

Dado que las dietas NP y HP son isocalóricas, estos resultados sugieren que las diferencias en el desarrollo físico y neurológico de las crías de ambos grupos (**Figura 8**) deberían tener como causa a la deficiencia de proteínas en la dieta y no a un menor consumo de calorías por parte de las madres.



**Figura 9 | Pesos corporales y consumo de comida en las madres F0.**

El peso corporal y el consumo de comida de las madres F0 se siguió durante la preñez y la lactancia. **A**, Peso de las madres NP y HP durante la gestación. ANOVA de dos factores con medidas repetidas para la dieta ( $F_{1,66} = 0,21$ ;  $p = 0,6456$ ), el tiempo ( $F_{4,66} = 67,16$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el tiempo ( $F_{4,66} = 1,37$ ;  $p = 0,2548$ ). **B**, Peso de las madres NP y HP durante la lactancia. ANOVA de dos factores con medidas repetidas para la dieta ( $F_{1,220} = 8,71$ ;  $p = 0,0132$ ), el tiempo ( $F_{20,220} = 12,33$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el tiempo ( $F_{20,220} = 1,59$ ;  $p = 0,0563$ ). **C**, Consumo de comida total durante la gestación. Test *t*-Student desapareado ( $t_{19} = 1,65$ ;  $p = 0,1149$ ). **D**, Consumo de comida de las madres NP y HP durante la lactancia. ANOVA de dos factores con medidas repetidas para la dieta ( $F_{1,220} = 14,82$ ;  $p = 0,0027$ ), el tiempo ( $F_{20,220} = 41,44$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el tiempo ( $F_{20,220} = 6,01$ ;  $p < 0,0001$ ). **E**, Consumo de comida de las madres NP y HP durante la lactancia relativizada al número de crías. ANOVA de dos factores con medidas repetidas para la dieta ( $F_{1,220} = 1,17$ ;  $p = 0,3018$ ), el tiempo ( $F_{20,220} = 25,80$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el tiempo ( $F_{20,220} = 0,64$ ;  $p = 0,8803$ ). El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que los pesos de las madres HP resultaron ser significativamente menores que los de las madres NP en los días P4 y P16. El consumo de las madres HP resultó ser significativamente menor que el de las madres NP entre los días P14 y P21. El consumo de las madres relativo al número de crías no resultó ser significativamente diferente entre madres NP y HP. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 6-7$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.2. Reversión del comportamiento

Resultados previos de nuestro laboratorio habían mostrado que los ratones sometidos a una dieta hipoproteica perinatal presentaban alteraciones en el comportamiento de tipo ansioso y, en particular en las hembras, comportamiento de tipo depresivo (Belluscio et al., 2014). Por otro lado, se observó que la malnutrición proteica perinatal genera déficits en la memoria de locación y de separación de patrones, así como también reduce la neurogénesis hipocampal en ratas (Pérez-García et al., 2016). Además,

como se mencionó en la Introducción 1.7.1, el enriquecimiento ambiental puede mitigar los efectos producidos por las adversidades del desarrollo temprano (Francis et al., 2002; Kentner, 2015). Por esta razón, nos propusimos estudiar la posible reversión de los trastornos de ansiedad y déficits de memoria causados por la malnutrición perinatal.

Para abordar este objetivo, ratones machos sometidos al modelo de malnutrición perinatal fueron alojados en un ambiente enriquecido o en un ambiente normal durante cinco semanas a partir del día de destete, es decir, P21. De esta manera, se trabajó con cuatro grupos experimentales: NP-NE, HP-NE, NP-EE y HP-EE (ver Materiales y Métodos 5.3 y 5.4) y se realizaron tests de comportamiento para evaluar ansiedad (Caja de luz-oscuridad, CLO, y laberinto elevado en cruz, LEC) y memoria (reconocimiento de un objeto novedoso, RON, laberinto en “Y” con claves espaciales, LY y aversión condicionada al gusto, ACG).

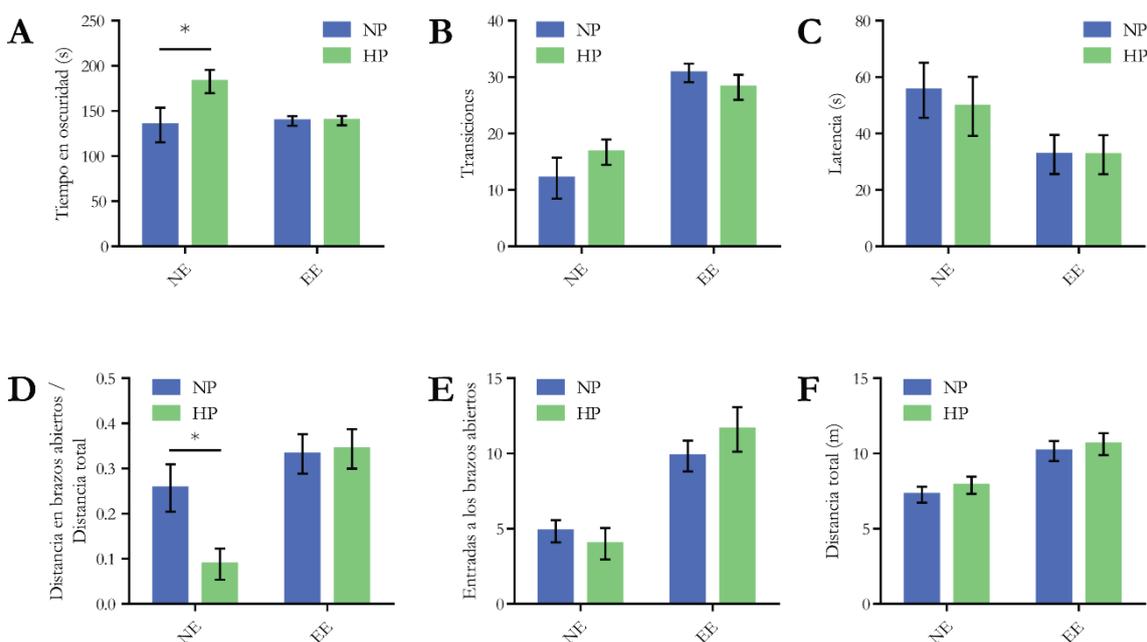
### 3.2.1. *Ansiedad: CLO y LEC*

Para este estudio se utilizó el denominado test de la caja de luz-oscuridad (CLO) y el laberinto elevado en cruz (LEC). Ambos paradigmas se basan en la evaluación de la ansiedad utilizando dispositivos que pongan en conflicto al ratón: por un lado, su tendencia natural por explorar un determinado ambiente lo llevará a recorrer zonas expuestas y, por otro, el rechazo que le genera dirigirse a ese ambiente, justamente a causa de su exposición, lo llevará a quedarse en zonas protegidas. Cuanto más tiempo pase protegido en las zonas ocultas, más rasgos ansiosos pueden asignársele. Es decir, si el ratón puede lidiar con el miedo que le genera explorar una zona desprotegida, esto se entiende como un buen manejo de la respuesta al estrés y, por lo tanto, son menos ansiosos.

En el paradigma de la CLO se midieron las siguientes variables: el tiempo de permanencia en la zona oculta, el número de transiciones entre la zona oscura y la luminosa, y la latencia a entrar a la zona oscura. Se observó un aumento significativo del tiempo en la zona oculta en los ratones HP-NE, que fue revertido cuando los ratones fueron expuestos a las cinco semanas de EE (**Figura 10A**). Por otro lado, las transiciones y la latencia mostraron una diferencia con el tratamiento ambiental, pero no con la dieta (**Figura 10B, C**). Este resultado es consistente con el aumento de locomoción reportado para los modelos de estímulo ambiental (Hendershott et al., 2016; Scrimshaw et al., 1968).

Se observó un resultado similar al anterior cuando los ratones fueron sometidos al paradigma del LEC. Se evaluó la distancia recorrida en los brazos abiertos relativa a la distancia total, el número de entradas a los brazos abiertos, y la distancia total recorrida.

Los ratones HP-NE recorrieron menor distancia en los brazos abiertos del laberinto respecto de la distancia total recorrida, evidenciando rasgos ansiosos. Nuevamente, esta característica fue revertida por el enriquecimiento ambiental en los ratones HP-EE (**Figura 10D**). Sin embargo, este aumento de la ansiedad en ratones HP-NE no se vio reflejado en el número total de entradas a los brazos abiertos (**Figura 10E**). Por último, consistente con los resultados de la CLO, se observó un aumento de la distancia total recorrida en ratones sometidos al enriquecimiento ambiental, independientemente de la dieta (**Figura 10F**).



**Figura 10 | Evaluación de la ansiedad en ratones malnutridos y su reversión por un ambiente enriquecido postdestate.**

La ansiedad de ratones NP y HP, sometidos a NE o EE, se evaluó a P56 mediante los tests de la caja de luz-oscuridad (CLO) y el laberinto elevado en cruz (LEC). **A**, Tiempo de permanencia en la zona oscura en el test de la CLO. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,38} = 3,58$ ;  $p = 0,0660$ ), el ambiente ( $F_{1,38} = 2,29$ ;  $p = 0,1386$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,38} = 3,49$ ;  $p = 0,0696$ ). **B**, Número de transiciones entre la zona oscura y la zona iluminada en el test de la CLO. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,40} = 9,16$ ;  $p = 0,06954$ ), el ambiente ( $F_{1,40} = 33,15$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,40} = 1,87$ ;  $p = 0,1790$ ). **C**, Latencia a entrar a la zona oscura en el test de la CLO. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,36} = 0,11$ ;  $p = 0,7383$ ), el ambiente ( $F_{1,36} = 5,41$ ;  $p = 0,0258$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,36} = 0,11$ ;  $p = 0,7441$ ). **D**, Distancia recorrida en los brazos abiertos respecto de la distancia total en el test del LEC. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,34} = 3,16$ ;  $p = 0,0844$ ), el ambiente ( $F_{1,34} = 13,99$ ;  $p = 0,0007$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,34} = 4,15$ ;  $p = 0,0494$ ). **E**, Número de entradas a los brazos abiertos en el test del LEC. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,40} = 0,19$ ;  $p = 0,6670$ ), el ambiente ( $F_{1,40} = 34,25$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,40} = 1,46$ ;  $p = 0,2343$ ). **F**, Distancia total recorrida en el test del LEC. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,40} = 0,75$ ;  $p = 0,3917$ ), el ambiente ( $F_{1,40} = 20,07$ ;  $p < 0,0001$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,40} = 0,02$ ;  $p = 0,8986$ ). El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que las diferencias que se marcan en los gráficos resultaron significativas. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 10-12$ ). \*  $p < 0,05$ .

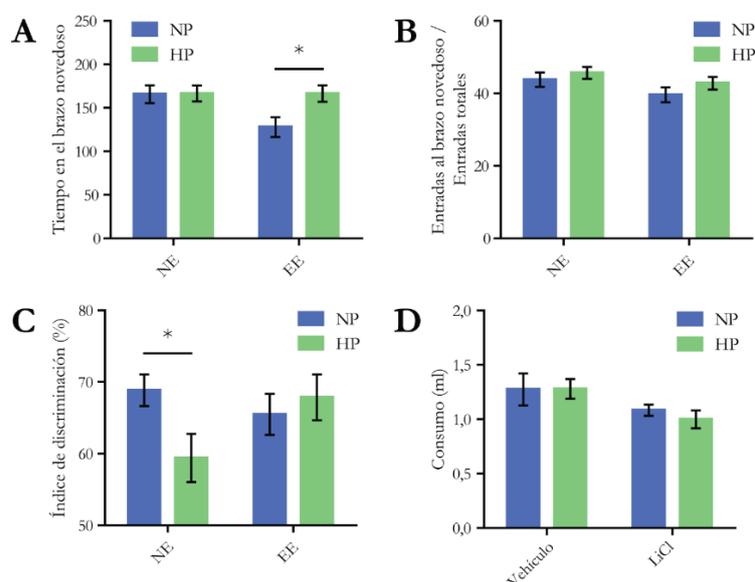
Estos resultados sugieren que la malnutrición afecta el estado de ansiedad de los ratones, haciéndolos menos capaces de lidiar con su estrés. Más aún, este fenotipo pudo ser revertido con el enriquecimiento ambiental luego del destete, es decir, varias semanas después del efecto de la deficiente nutrición materna. Es así que los mecanismos epigenéticos surgen como interesantes candidatos a ser responsables de la reversibilidad observada (ver Discusión 4.4.1).

### 3.2.2. Memoria: LY, RON y ACG

Para evaluar la memoria a corto plazo en ratones correspondientes a los cuatro grupos experimentales ya utilizados (NP-NE, HP-NE, NP-EE, HP-EE), se usó el laberinto en “Y” en su configuración de claves espaciales. El entrenamiento consistió en dejar al ratón recorrer 2 de los 3 brazos del laberinto durante 7 min. Pasados 20 min (memoria de corto plazo), se testeó al ratón dejándolo explorar los 3 brazos. Se midió el tiempo de permanencia en el brazo novedoso (el que resultaba inaccesible durante el entrenamiento) y el número de entradas al brazo novedoso respecto del número de entradas totales a cualquier brazo. Las claves espaciales colaboran a que el ratón identifique cada brazo y genera una memoria dependiente, en parte, del hipocampo. No se observaron diferencias en ninguna de las variables medidas entre las dietas NP y HP en un ambiente postnatal normal (**Figura 11A, B**). Sin embargo, los ratones HP-EE permanecieron más tiempo en el brazo novedoso respecto a los NP-EE (**Figura 11A**). La expresión de esta diferencia fenotípica entre ratones NP y HP, que sólo se produce en el contexto del enriquecimiento ambiental fue observada también para otros parámetros evaluados y constituye un ejemplo de interacción entre las variables utilizadas, lo cual se discutirá en detalle en la Discusión 4.1. Por último, no se observaron diferencias significativas en el número de entradas al brazo novedoso ante el estímulo ambiental (**Figura 11B**).

Por otro lado, se utilizó el paradigma del reconocimiento de un objeto novedoso (RON) para evaluar la memoria a largo plazo. Para esto, se entrenaron ratones de los cuatro grupos experimentales a reconocer dos objetos iguales ubicados en una arena cuadrada durante 10 min. Luego de 24 h (memoria a largo plazo), uno de los objetos fue reemplazado por otro novedoso para el ratón. Se midió el tiempo que el ratón dedicó a explorar el objeto novedoso respecto del tiempo de exploración total. Se observó una disminución en el índice de discriminación (Materiales y Métodos 5.7.5) en los ratones malnutridos, que pudo ser revertida por el enriquecimiento ambiental (**Figura 11C**).

Por último, se usó el test de aversión condicionada al gusto (ACG) para evaluar otro tipo de memoria asociativa (Welzl et al., 2001), que se ha visto relacionada con la desacetilación de histonas por HDACs (Morris et al., 2013). Este test consiste en adaptar a los ratones a un régimen de privación de agua. Luego, se asocia un estímulo condicionado (agua con sacarina como gusto dulce) a uno no condicionado (náusea por inyección de LiCl) y por último se testea el nivel de memoria en base a la cantidad de agua con sacarina consumida, incluyendo a un grupo de ratones que son inyectados con vehículo en lugar de LiCl. Menor cantidad de agua consumida supone una memoria mayor. Como es esperable para este test, la inyección con LiCl generó un menor consumo de agua con sacarina, tanto en los ratones NP como HP (Figura 11D). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre las dietas (Figura 11D).



**Figura 11 | Evaluación de la memoria a corto y largo plazo en ratones malnutridos y su reversión por un ambiente enriquecido post-destete.**

La memoria de corto y largo término de ratones NP y HP, sometidos a NE o EE, se evaluó a P56 mediante los tests del laberinto en “Y” con claves espaciales (LY), el reconocimiento del objeto novedoso (RON) y la aversión condicionada al gusto (ACG). **A**, Tiempo de permanencia en el brazo novedoso en el test del LY. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,40} = 3,65$ ;  $p = 0,0633$ ), el ambiente ( $F_{1,40} = 3,42$ ;  $p = 0,0718$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,40} = 3,38$ ;  $p = 0,0736$ ). **B**, Número de entradas al brazo novedoso relativo al número de entradas totales en el test del LY. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,40} = 2,27$ ;  $p = 0,1402$ ), el ambiente ( $F_{1,40} = 6,60$ ;  $p = 0,0140$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,40} = 0,01$ ;  $p = 0,9910$ ). **C**, Índice de discriminación entre objetos en el test de RON. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,35} = 1,46$ ;  $p = 0,2346$ ), el ambiente ( $F_{1,35} = 0,76$ ;  $p = 0,3899$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,35} = 4,11$ ;  $p = 0,0504$ ). **D**, Consumo de agua con sacarina en el test de la ACG. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,18} = 0,15$ ;  $p = 0,7059$ ), el condicionamiento ( $F_{1,18} = 5,28$ ;  $p = 0,0338$ ) e interacción para la dieta con el condicionamiento ( $F_{1,18} = 0,19$ ;  $p = 0,6684$ ). El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que las diferencias que se marcan en los gráficos resultaron significativas. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 10-12$ ). \*  $p < 0,05$ .

Los resultados obtenidos en esta sección muestran un efecto de la malnutrición materna sobre la memoria espacial a corto plazo (LY), así como también sobre la memoria de reconocimiento a largo plazo (RON) en machos. En particular, la deficiencia en la memoria de reconocimiento puede ser recuperada cuando se somete a los animales a un ambiente estimulante luego del destete. Por su parte, el fenotipo observado para la memoria espacial es dependiente del ambiente postdestete, y las diferencias por la dieta materna sólo se observan en un contexto de enriquecimiento ambiental. Por otro lado, no se encontraron efectos de la malnutrición perinatal sobre la memoria aversiva relacionada con el gusto. Notablemente, este último tipo de memoria no ha sido directamente relacionado con el hipocampo como estructura funcional (ver Discusión 4.4.2). En cambio, se ha demostrado que tanto la memoria espacial como la de reconocimiento necesitan del hipocampo para su establecimiento (Squire, 1992). Estos resultados podrían estar relacionados con la disminución del tamaño del hipocampo observada para los ratones HP.

### **3.3. Biogénesis de miRNAs**

Con el objetivo de encontrar potenciales mecanismos moleculares que expliquen, en parte, las diferencias fenotípicas en la conducta entre ratones NP y HP, decidimos evaluar el rol de los microRNAs (miRNAs), como un mecanismo epigenético que posibilita grandes cambios en los patrones de expresión génica. Estos cambios en los patrones de expresión permiten una adaptación a un ambiente adverso en base a pequeños cambios en la expresión de miRNAs, dado que cada miRNA controla varios genes y un mismo gen puede ser controlado por más de un miRNA, lo cual genera complejas redes de regulación postranscripcional. Los pequeños RNAs no codificantes, particularmente los miRNAs, juegan un papel importante en el desarrollo del cerebro y en la adaptación al estrés (ver Introducción 1.4.2 y 1.4.4).

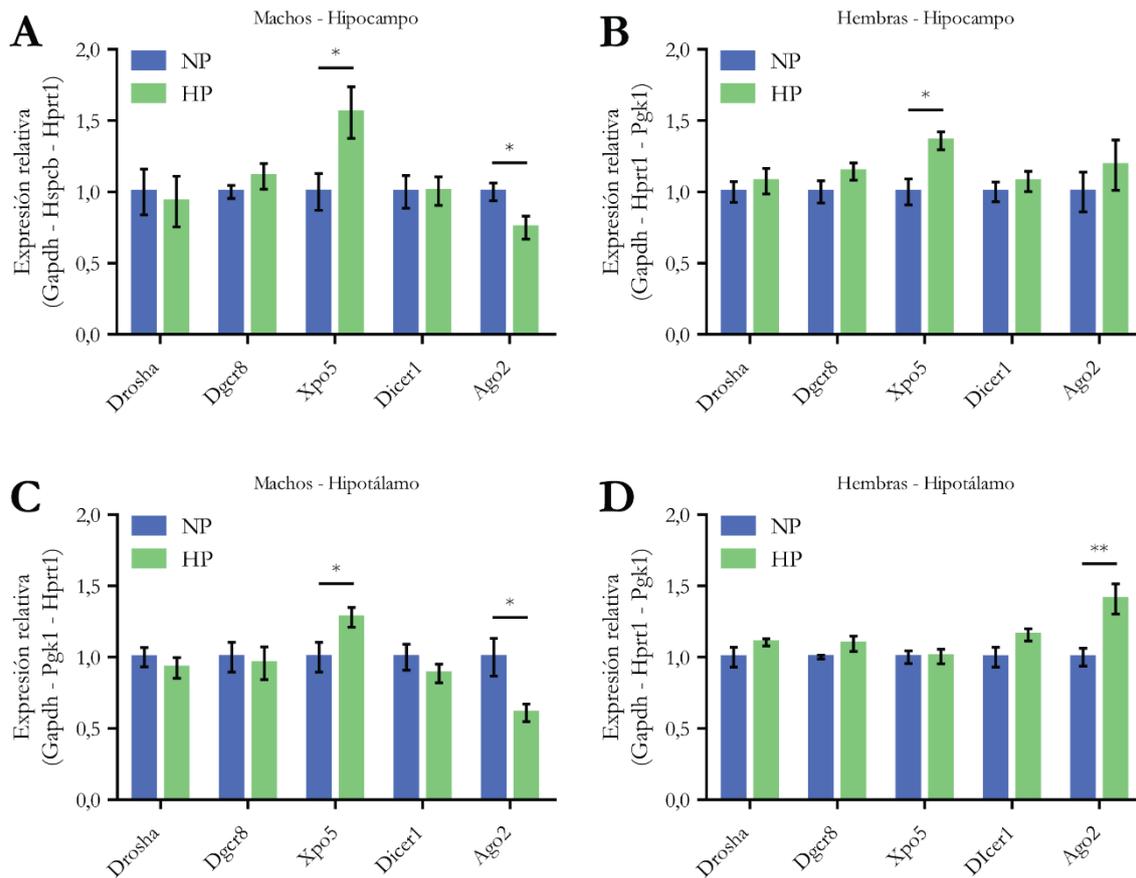
La biogénesis de miRNAs utiliza una vía celular común a todos ellos, que involucra, además de su transcripción, una maquinaria compleja de procesamiento, transporte y encuentro con sus mRNAs blanco. Esta maquinaria de procesamiento está compuesta por proteínas encargadas de las funciones descritas y se ha reportado que cambios en la expresión de estas proteínas generan consecuencias en el proceso de silenciamiento por miRNAs (ver Introducción 1.4.3).

Dado que alteraciones en los niveles de expresión y/o actividad de estos componentes de la biogénesis pueden afectar la disponibilidad y funcionalidad de los miRNAs, el objetivo consistió en evaluar si la malnutrición perinatal tiene algún efecto sobre el funcionamiento de la maquinaria de biogénesis de miRNAs. Estos experimentos se realizaron en machos y hembras a la edad de 21 días de la F1, momento en el cual finaliza el tratamiento dietario materno. Se buscó estudiar si una potencial desregulación de la biogénesis de miRNAs al momento de terminar el tratamiento podría generar cambios que tuvieran consecuencias en etapas más avanzadas de la vida de los ratones.

Se utilizaron cuatro zonas del cerebro que están involucradas en diversos procesos. El hipocampo y el hipotálamo tienen un rol fundamental en la respuesta fisiológica al estrés ambiental (ver Introducción 1.3.1). El bulbo olfatorio, y también el hipocampo, son capaces de producir neurogénesis y de responder a cambios en el ambiente a través de la plasticidad sináptica (Gage, 2012). Por último, la corteza cerebral posee una alta susceptibilidad al estrés oxidativo (Moura et al., 2015; Powell et al., 2012) que puede ser causado por una dieta deficiente en proteínas.

### 3.3.1. *Expresión de los componentes de la maquinaria de biogénesis de miRNAs*

Se determinó la expresión génica de la mayor parte de los componentes de la maquinaria de biogénesis de miRNAs en ratones NP y HP, tanto en machos como en hembras.

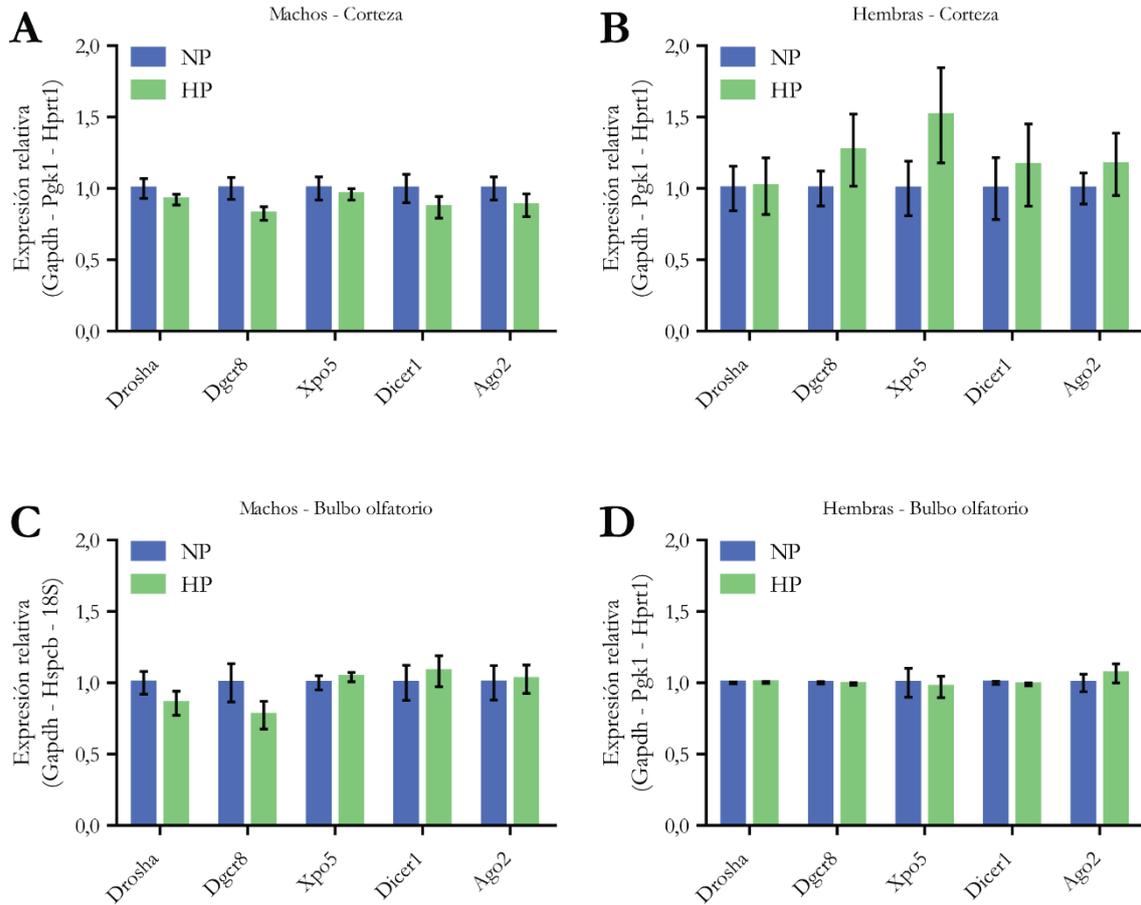


**Figura 12 | Expresión de los componentes de la maquinaria de biogénesis de miRNAs en hipocampo e hipotálamo.**

Expresión de los genes de la maquinaria de biogénesis de miRNAs en el hipocampo y el hipotálamo de ratones NP y HP a P21, tanto en machos como en hembras. **A**, Expresión génica en el hipocampo de machos. Test *t*-Student desapareado (Drosha:  $t_{10} = 0,28$ ;  $p = 0,7872$ ; Dgcr8:  $t_{10} = 1,08$ ;  $p = 0,3071$ ; Xpo5:  $t_8 = 2,51$ ;  $p = 0,0367$ ; Dicer1:  $t_{10} = 0,04$ ;  $p = 0,9717$ ) y test de Mann-Whitney (Ago2:  $U = 3,0$ ;  $p = 0,0303$ ). **B**, Expresión génica en el hipocampo de hembras. Test *t*-Student desapareado (Drosha:  $t_{10} = 0,66$ ;  $p = 0,5236$ ; Dgcr8:  $t_9 = 1,47$ ;  $p = 0,1794$ ; Xpo5:  $t_{10} = 3,26$ ;  $p = 0,0086$ ; Dicer1:  $t_{10} = 0,74$ ;  $p = 0,4753$ ; Ago2:  $t_{10} = 0,84$ ;  $p = 0,4230$ ). **C**, Expresión génica en el hipotálamo de machos. Test *t*-Student desapareado (Drosha:  $t_{10} = 0,75$ ;  $p = 0,4671$ ; Dgcr8:  $t_{11} = 0,25$ ;  $p = 0,8050$ ; Dicer1:  $t_{13} = 1,05$ ;  $p = 0,3135$ ; Ago2:  $t_{13} = 2,99$ ;  $p = 0,0105$ ) y test de Mann-Whitney (Xpo5:  $U = 11,0$ ;  $p = 0,0311$ ). **D**, Expresión génica en el hipotálamo de hembras. Test *t*-Student desapareado (Xpo5:  $t_{18} = 0,08$ ;  $p = 0,9410$ ; Dicer1:  $t_{17} = 1,89$ ;  $p = 0,0764$ ; Ago2:  $t_{17} = 3,22$ ;  $p = 0,0050$ ) y test *t*-Student desapareado con corrección de Welch (Drosha:  $t_{11} = 1,43$ ;  $p = 0,1806$ ; Dgcr8:  $t_{10} = 1,70$ ;  $p = 0,1192$ ). Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 6-10$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Se observó un incremento en la expresión de Xpo5 en el hipocampo y el hipotálamo de los machos HP respecto de los NP (**Figura 12A, C**). Un incremento similar se observó en las hembras HP, pero sólo en el hipocampo (**Figura 12B**). Por otro lado, los niveles de mRNA de Ago2 se encontraron disminuidos en las mismas estructuras cerebrales en los machos (**Figura 12A, C**). Notablemente, las hembras HP exhibieron una expresión aumentada de Ago2 en el hipotálamo, a diferencia de lo que se observó en los machos (**Figura 12D**).

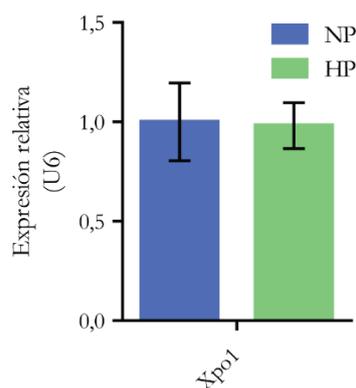
La expresión de Droscha y Dgcr8, los miembros del complejo Microprocesador, y la RNAsa citoplasmática Dicer no fue modificada por la malnutrición proteica perinatal, ni en machos ni en hembras (**Figura 12**). Por último, ningún componente de la maquinaria de biogénesis de miRNAs mostró una expresión alterada por la malnutrición ni en la corteza ni en el bulbo olfatorio (**Figura 13**).



**Figura 13 | Expresión de los componentes de la maquinaria de biogénesis de miRNAs en corteza y bulbo olfatorio.**

Expresión de los genes de la maquinaria de biogénesis de miRNAs en la corteza cerebral y el bulbo olfatorio de ratones NP y HP a P21, tanto en machos como en hembras. **A**, Expresión génica en la corteza de machos. Test *t*-Student desapareado (Droscha:  $t_{16} = 1,00$ ;  $p = 0,3342$ ; Dgcr8:  $t_{16} = 1,95$ ;  $p = 0,0690$ ; Xpo5:  $t_{17} = 0,47$ ;  $p = 0,6444$ ; Dicer1:  $t_{16} = 1,06$ ;  $p = 0,3073$ ; Ago2:  $t_{19} = 1,03$ ;  $p = 0,3167$ ). **B**, Expresión génica en la corteza de hembras. Test *t*-Student desapareado (Droscha:  $t_{12} = 0,06$ ;  $p = 0,9539$ ; Dgcr8:  $t_{12} = 0,95$ ;  $p = 0,3585$ ; Xpo5:  $t_{13} = 1,28$ ;  $p = 0,2217$ ; Dicer1:  $t_{12} = 0,46$ ;  $p = 0,6564$ ; Ago2:  $t_{14} = 0,75$ ;  $p = 0,4679$ ). **C**, Expresión génica en el bulbo olfatorio de machos. Test *t*-Student desapareado (Droscha:  $t_{12} = 1,24$ ;  $p = 0,2385$ ; Dgcr8:  $t_{11} = 1,32$ ;  $p = 0,2136$ ; Xpo5:  $t_{12} = 0,64$ ;  $p = 0,5321$ ; Dicer1:  $t_{11} = 0,50$ ;  $p = 0,6300$ ; Ago2:  $t_{12} = 0,16$ ;  $p = 0,8738$ ). **D**, Expresión génica en el bulbo olfatorio de hembras. Test *t*-Student desapareado (Droscha:  $t_{20} = 0,25$ ;  $p = 0,8082$ ; Dgcr8:  $t_{20} = 0,69$ ;  $p = 0,4964$ ; Xpo5:  $t_{20} = 0,23$ ;  $p = 0,8194$ ; Dicer1:  $t_{20} = 0,71$ ;  $p = 0,4866$ ; Ago2:  $t_{23} = 0,72$ ;  $p = 0,4759$ ). Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 7-11$ ).

Además del mecanismo de biogénesis de miRNAs denominado “canónico” existen otras vías “no canónicas” de generación de miRNAs. Por ejemplo, el primer paso de la biogénesis, mediado por el complejo Microprocesador (Drosha/Dgcr8) puede ser reemplazado por la maquinaria de *splicing*, lo cual da lugar a miRtrons (Berezikov et al., 2007; Yang and Lai, 2011). Otro ejemplo lo constituyen los caminos de procesamiento que no necesitan de Dicer para la biogénesis de miRNAs (Yang and Lai, 2011). Se ha demostrado que la exportina Xpo1 también es capaz de exportar e importar miRNAs. Por otro lado, Xpo1 coimmunoprecipita con Ago2 y otras proteínas relacionadas con la remodelación de la cromatina, lo cual constituye un nexo entre estos mecanismos de regulación epigenética (Muqbil et al., 2013). Teniendo en cuenta estas evidencias y habiendo observado un aumento en la expresión de Xpo5 en hipocampo e hipotálamo de ratones HP, se decidió estudiar la expresión de Xpo1 en el hipocampo. Sin embargo, no se encontró una desregulación de dicha exportina en los ratones malnutridos (**Figura 14**).



**Figura 14 | Expresión de Xpo1 en el hipocampo.**

Expresión de Xpo1 en el hipocampo de macho NP y HP a P21. Test *t*-Student desapareado ( $t_7 = 0,609$ ;  $p = 0,9340$ ). Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 6-7$ ).

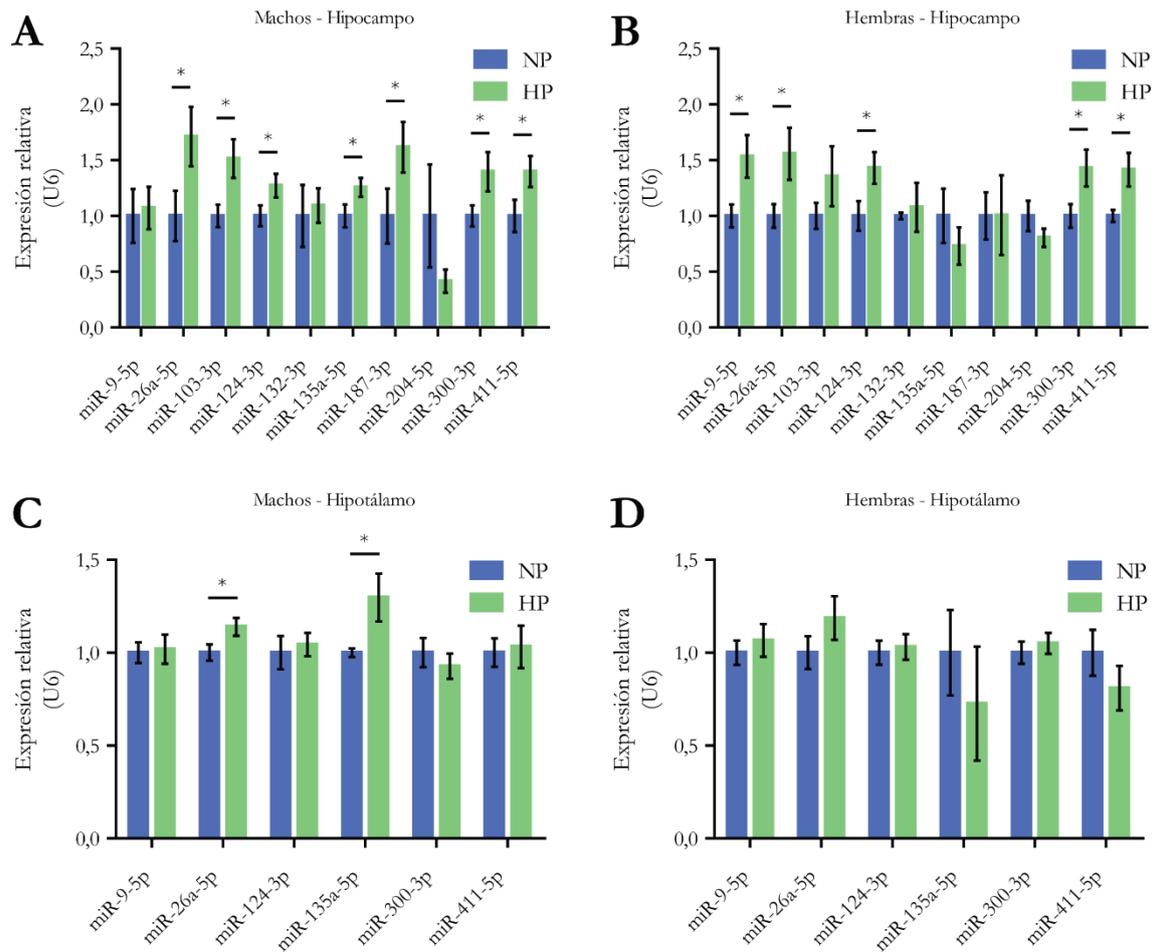
En resumen, estos resultados demuestran que el estrés nutricional temprano, particularmente, la exposición a una dieta hipoproteica materna durante la gestación y la lactancia, altera la expresión de componentes de la biogénesis de miRNAs en el hipocampo y en el hipotálamo de ratones P21. Esta alteración podría modificar la disponibilidad y la funcionalidad de los miRNAs, con consecuencias en el desarrollo de ratones HP. Particularmente, resulta sugestivo que los cambios debidos a la malnutrición se evidencien en regiones cerebrales estrechamente relacionadas con la regulación del eje HPA y la respuesta al estrés, como lo son el hipocampo y el hipotálamo. Numerosas evidencias señalan que la programación del eje HPA por estrés perinatal tiene a las modificaciones epigenéticas como base molecular (ver Discusión 4.5.1).

### 3.3.2. Expresión de miRNAs

Habiendo visto que el aumento de la expresión de Xpo5 en ratones malnutridos resultaba altamente consistente entre tejidos y sexos, se estudió si este cambio tenía alguna relevancia funcional. Debido a que Xpo5 media el paso de transporte del núcleo al citoplasma en la biogénesis de miRNAs, se hipotetizó que un aumento en la expresión de esta proteína daría como resultado un aumento generalizado de miRNAs maduros en el citoplasma.

Para testear esta hipótesis, se eligieron al azar 10 miRNAs de entre aquellos expresados en el cerebro de ratón, y se midió la expresión de su forma madura por RT-qPCR. Para ello, se utilizó el método del oligonucleótido *stem-loop* (ver Materiales y Métodos 5.8.3.2) (Chen et al., 2005), que consiste en una retrotranscripción específica de un miRNA con un oligonucleótido de 50 bases que se pliega sobre sí mismo dejando un extremo 3' protruyente que aparea con las últimas 6 bases del extremo 3' del miRNA.

Se observó que los niveles del 70% y 50% de los miRNAs analizados en hipocampo, en machos y hembras respectivamente, se encontraron aumentados en ratones HP comparado con los NP (**Figura 1A, B**). Seis de los 10 miRNAs medidos en hipocampo fueron también medidos en hipotálamo. En este caso, un 33% de esos 6 miRNAs mostró un aumento significativo de su expresión en machos HP (**Figura 15C**). Considerando el nivel de inducción de Xpo5 en el hipocampo (56%) y en el hipotálamo (28%) de machos HP, se observó que cuanto mayor era la expresión de Xpo5, mayor resultaba el número de miRNAs que aumentaban su expresión. Es de notar que en el hipotálamo de las hembras HP no se registraron aumentos en la expresión de miRNAs (**Figura 15D**), coincidentemente con la ausencia de inducción de Xpo5 en esa región del cerebro. Por otro lado, es importante destacar que ningún miRNA presentó un comportamiento opuesto, es decir, menores niveles de expresión en los ratones HP que en los NP.



**Figura 15 | Expresión de miRNAs maduros en hipocampo e hipotálamo.**

Expresión de miRNAs en el hipocampo y en el hipotálamo de ratones NP y HP a P21, tanto en machos como en hembras. **A**, Expresión de miRNAs en el hipocampo de machos. **B**, Expresión de miRNAs en el hipocampo de hembras. **C**, Expresión de miRNAs en el hipotálamo de machos. **D**, Expresión de miRNAs en el hipotálamo de hembras. En todos los casos se utilizó un test *t*-Student. Cuando no se cumplió la normalidad de los datos, se usó el test de Mann-Whitney. Cuando no se cumplió la homocedasticidad, se usó la corrección de Welch. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM (n = 6-10). \*  $p < 0,05$ .

Los resultados presentados en esta sección sugieren que existe una fuerte correlación entre los niveles de expresión del mRNA de Xpo5 y los niveles de expresión de los miRNAs en general, particularmente en el hipocampo y en el hipotálamo. La malnutrición perinatal produce un aumento en la expresión de Xpo5 lo cual correlaciona con un aumento general de la presencia de miRNAs maduros. Por lo tanto, el estrés nutricional temprano impacta sobre la disponibilidad de miRNAs y potencialmente sobre su funcionalidad, convirtiéndose en un posible factor causal de los efectos negativos de la malnutrición proteica.

### 3.4. Secuenciación masiva de RNAs pequeños

Una vez evaluados los efectos de la malnutrición proteica perinatal sobre la biogénesis de miRNAs, decidimos estudiar, a nivel global, los patrones de expresión de miRNAs en el hipotálamo de ratones jóvenes-adultos malnutridos perinatalmente, evaluando también una posible reversión de estos patrones por estimulación ambiental postdestete. Este experimento nos permitiría además correlacionar los niveles de expresión de miRNAs con los cambios en los fenotipos conductuales observados (ver Resultados 3.2).

Con este objetivo, se diseñó un experimento de secuenciación masiva de RNAs pequeños. Como se vio en la Introducción 1.2, el eje HPA es el principal sensor de estrés ambiental y, por otro lado, se sabe que el hipotálamo es una de las regiones del cerebro que media el comportamiento de ansiedad por control del estrés. Bajo la hipótesis de que los niveles hormonales (o de otros factores) que controlan el eje HPA podían ser programados epigenéticamente a través de su regulación postranscripcional por miRNAs, se evaluó la expresión global de miRNAs en el hipotálamo de ratones sometidos a una malnutrición proteica perinatal. Habiendo observado la reversión del comportamiento de tipo ansioso por el enriquecimiento ambiental (ver Resultados 3.2.1), se decidió incorporar el tratamiento con ambientes postdestete al experimento y, por lo tanto, trabajar con ratones de 8 semanas de edad (P56).

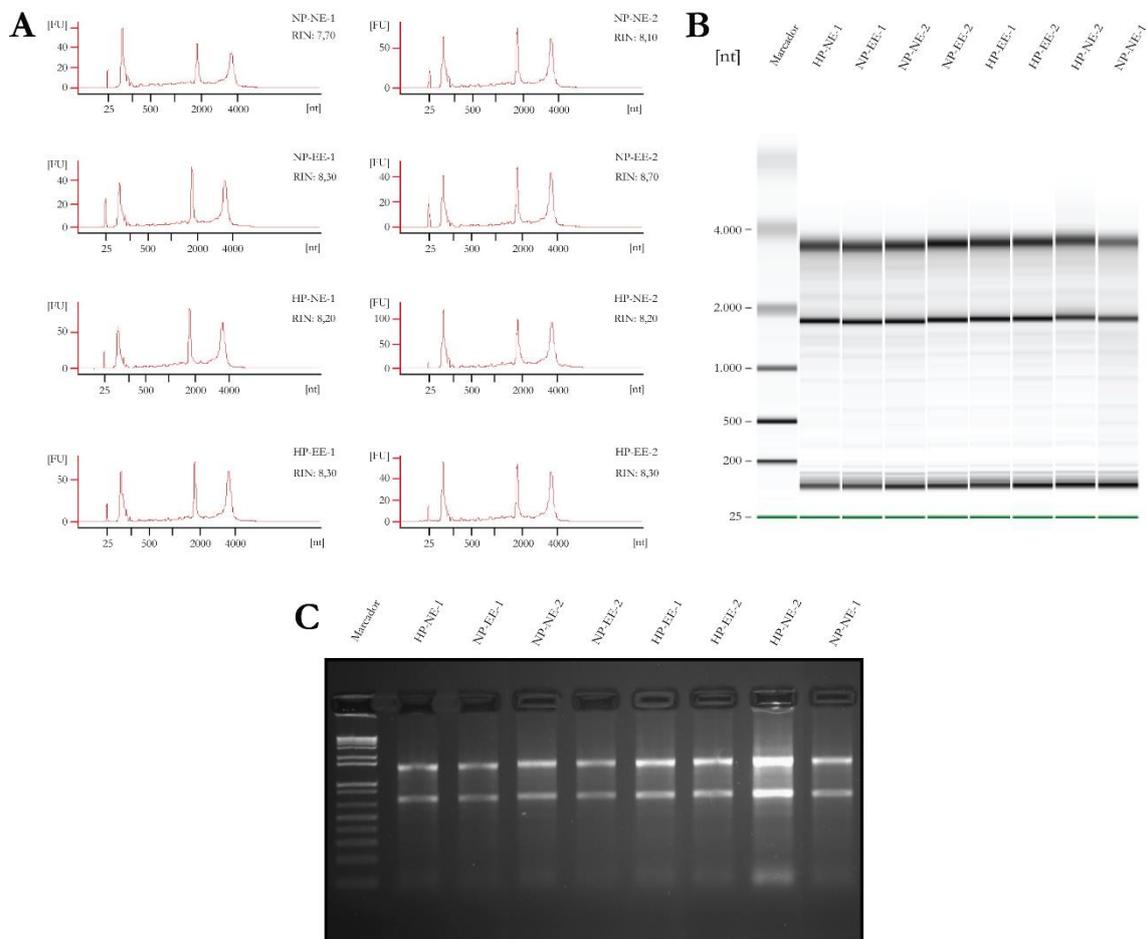
El objetivo consistió en evaluar si una desregulación en los patrones de expresión de miRNAs podría correlacionar con el fenotipo ansioso observado en ratones HP, y si la reversión conductual se veía reflejada en dichos patrones. Nuevamente, los grupos experimentales fueron: NP-NE, NP-EE, HP-NE y HP-EE.

#### 3.4.1. *Obtención de RNAs y características de la secuenciación*

Para investigar los perfiles globales de expresión de miRNAs hipotalámicos y sus potenciales cambios bajo una malnutrición proteica perinatal y/o un enriquecimiento ambiental, se utilizó una plataforma Illumina *HiSeq 1500* para secuenciación masiva. El material de partida fue extraído de dos ratones de cada tratamiento, provenientes de camadas independientes. El resto de los ratones de este experimento se utilizaron para validar por RT-qPCR los resultados de la secuenciación.

El primer paso para la secuenciación masiva fue obtener RNA total de hipotálamo de ratón con un alto grado de pureza. Para esto se realizaron variadas pruebas hasta lograr

un valor de RIN (*RNA Integrity Number*) mayor a 8 analizado por medio del sistema *Bioanalyzer 2100 Agilent* (**Figura 16A, B**), y además lograr una clara intensidad e integridad de las dos bandas del RNA ribosomal vistas en gel de agarosa (**Figura 16C**).



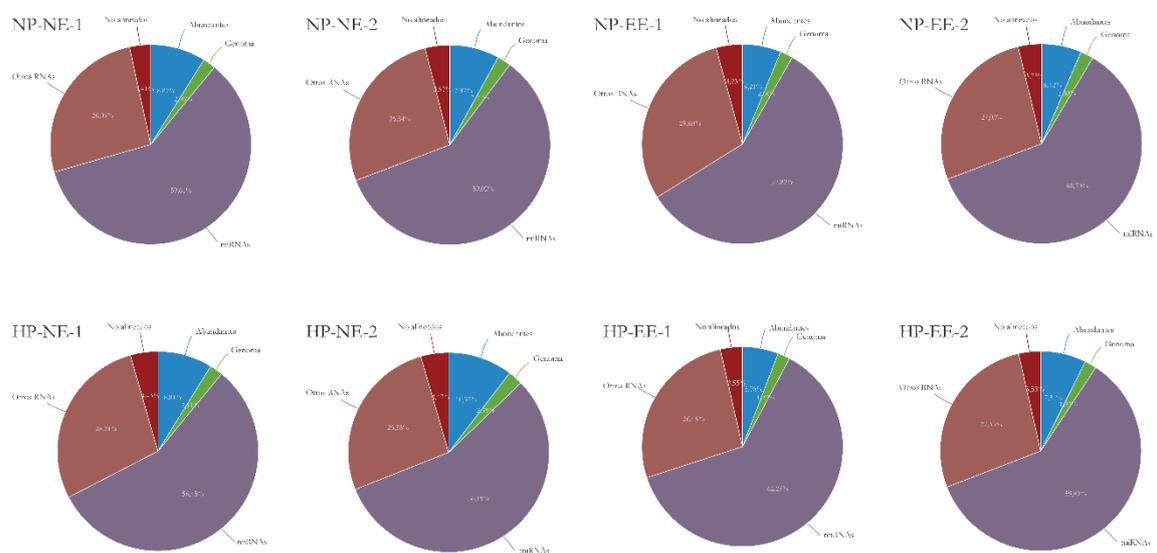
**Figura 16 | Evaluación de la calidad del RNA para secuenciación masiva.**

La calidad del RNA extraído del hipotálamo fue analizada mediante *Bioanalyzer 2100 Agilent* y gel de agarosa antes de ser utilizadas para el experimento. **A**, Electroferogramas de las 8 muestras utilizadas. Los picos corresponden a los conjuntos de moléculas de RNA con tamaños parecidos. En todas las muestras se observa que están presentes los RNAs pequeños (entre 20 y 50 nt). **B**, Los electroferogramas pueden traducirse a un gel virtual para observar las bandas. **C**, Gel de agarosa con las 8 muestras y un marcador de peso molecular. Este gel permitió hacer un segundo chequeo sobre la calidad de las muestras mediante la observación de las bandas del RNA ribosomal.

Posteriormente, se generaron las bibliotecas *TruSeq* de cDNA basadas en el RNA extraído, y se separó por tamaño mediante un gel de poliacrilamida la banda correspondiente a los cDNAs provenientes de los RNAs pequeños. Luego se secuenció el cDNA en una celda del secuenciador *HiSeq 1500* de Illumina en fragmentos de hasta 50 pb desde un único extremo (1 x 50 *single reads*) (ver Materiales y Métodos 5.9). Las lecturas

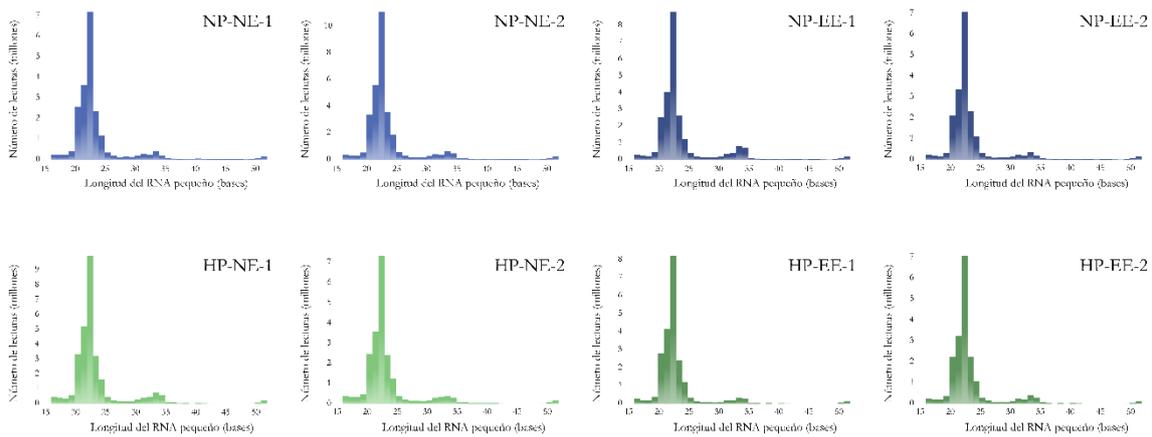
obtenidas fueron luego anotadas en base a los datos de miRBase v21 para el genoma de *Mus musculus* (mm10).

Las características de la corrida se encontraron dentro de los rangos esperables. Por un lado, el número total de lecturas fue de aproximadamente 25 millones por muestra. Además, la distribución de lecturas presentó una mayoritaria presencia de miRNAs en todas las muestras (**Figura 17**). Por otro lado, la distribución de longitudes de las lecturas presentó un pico en 22 nucleótidos (**Figura 18**), lo cual es consistente con el corte de la enzima Dicer1 que, por su estructura, deja un dúplex de RNA de 22 nucleótidos, es decir, la longitud promedio reportada para un miRNA (ver Introducción 1.4.3).



**Figura 17 | Distribución de lecturas de la secuenciación masiva de RNAs pequeños.**

La corrida de la secuenciación masiva arrojó una distribución de lecturas acorde a lo esperado. Para todas las muestras analizadas, más de la mitad de las lecturas mapearon en miRNAs y una proporción baja no pudo ser mapeada (“No alineadas”).



**Figura 18 | Distribución de longitudes de lecturas de la secuenciación masiva de RNAs pequeños.**

La distribución de longitudes de las lecturas mostró, para todas las muestras, un pico alrededor de los 22 nucleótidos, correspondiente a los miRNAs maduros. La evaluación de los gráficos de distribución de longitudes es otro punto de control de calidad de la secuenciación.

Notablemente, entre las lecturas de miRNAs obtenidas (**Figura 17**), aproximadamente la mitad corresponde a miRNAs maduros ya descritos y la otra mitad, a isomiRs para las 8 bibliotecas. Los isomiRs son secuencias que tienen variaciones en uno o unos pocos nucleótidos con respecto a la secuencia del miRNA maduro de referencia ([Morin et al., 2008](#)). La mayor parte de la variabilidad de los isomiRs puede ser explicada por la variabilidad en la posición de clivaje de Drosha o de Dicer1 sobre el pri-miRNA o el pre-miRNA, respectivamente. Otra fuente de variabilidad la constituyen las modificaciones enzimáticas de los miRNA maduros al final de su biogénesis. Dado que, en la mayoría de los casos, la especie de miRNA maduro anotada en miRBase v21 fue la secuencia más abundante, se tomaron solamente esas secuencias para el análisis, descartando los isomiRs. En el último tiempo, algunos trabajos han descrito funciones relevantes para los isomiRs ([Babapoor et al., 2014](#); [Llorens et al., 2013](#)). De todos modos, se requeriría un análisis más profundo para examinar la influencia de los isomiRs en la expresión diferencial entre tratamientos.

En un análisis global, previo al estudio de expresión diferencial según los tratamientos utilizados, se encontraron 662 miRNAs maduros presentes en las 8 muestras de hipotálamo. De todos ellos, 257 presentaron más de 100 lecturas y 37, más de 20.000 lecturas. Estos últimos 37 miRNAs más expresados se constituían en 26 familias, de las cuales 18 resultaron ser altamente conservadas evolutivamente entre mamíferos, 5 fueron medianamente conservadas y 3, pobremente conservadas ([Lewis et al., 2005](#)). El análisis de conservación evolutiva de la secuencia del mRNA complementaria a la “semilla” del miRNA tiene como objetivo proveer evidencia acerca de la funcionalidad de una

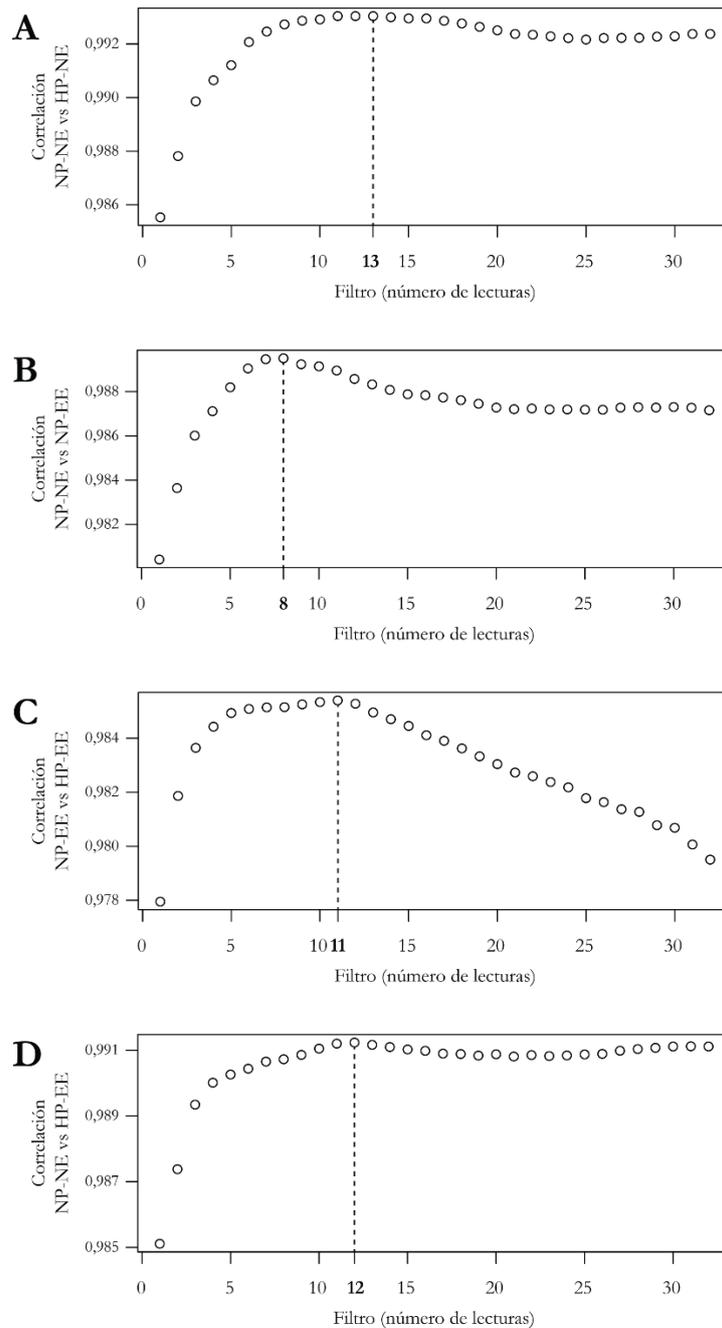
determinada familia de miRNAs. En este sentido, un nivel alto de conservación refleja una predicción más confiable (Friedman et al., 2009; Riffo-Campos et al., 2016). De esta forma, en un primer análisis, el alto grado de conservación de los sitios blanco evidencia una correcta realización del análisis de la secuenciación masiva hasta este punto.

### 3.4.2. Normalización y filtrado

El primer paso del análisis de la secuenciación masiva de microRNAs una vez mapeadas las lecturas, consistió en utilizar el método “TMM” (*Trimmed Mean of M values*) (Robinson and Oshlack, 2010) para la normalización de las muestras por su tamaño. Esta estrategia empírica se basa en igualar la expresión de todos los genes de las muestras asumiendo que la mayoría de ellos no están diferencialmente expresados entre los tratamientos.

Por último, antes del análisis de expresión diferencial, se realizó un filtrado de microRNAs con bajo número de lecturas. La determinación del límite bajo el cual se descartan dichos miRNAs consistió en la maximización de la correlación entre el promedio de las réplicas de cada tratamiento para una comparación en particular. Este filtrado se debe a que, a números bajos de lecturas, suele presentarse una dispersión mayor en la correlación de 2 tratamientos debida a la cercanía de los valores de lecturas con la variabilidad técnica. De esta manera, por ejemplo, si en un tratamiento se obtuvieron 2 lecturas para un miRNA y en otro tratamiento, 4 lecturas para ese miRNA, las veces de cambio entre tratamientos sería de 2 cuando en realidad la cantidad de lecturas se acerca mucho al ruido de la técnica como para decir que ese miRNA se indujo 2 veces. Por lo tanto, ese miRNA se descarta del análisis.

Los filtros se aplicaron a los pares de tratamientos en comparación. El motivo por el cual se eligieron los pares de tratamientos para el análisis se detalla en la siguiente sección. De esta forma, el filtro para la comparación NP-NE vs HP-NE fue de 13 lecturas (**Figura 19A**), para la NP-NE vs NP-EE fue de 8 lecturas (**Figura 19B**), para la NP-EE vs HP-EE fue de 11 lecturas (**Figura 19C**), y para la NP-NE vs HP-EE fue de 12 lecturas (**Figura 19D**). Los gráficos muestran en qué punto se maximiza la correlación entre tratamientos a medida que aumenta el número de lecturas bajo el cual se aplica el filtro.

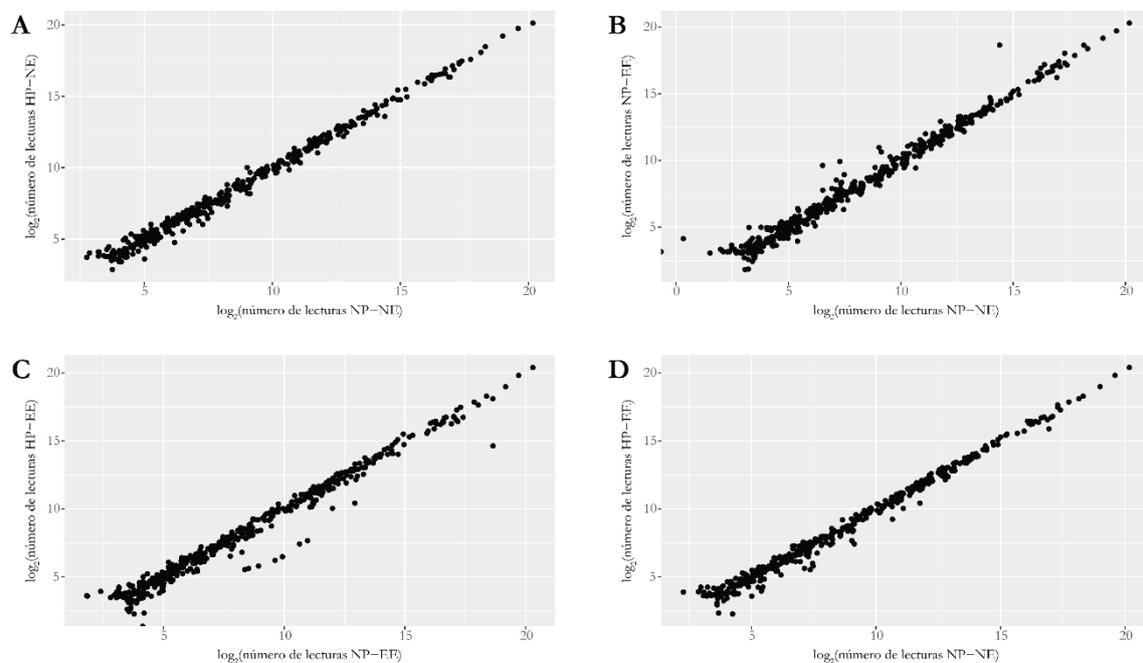


**Figura 19 | Línea de corte para el filtro de miRNAs con bajo número de lecturas en todas las comparaciones estudiadas.**

Para decidir qué miRNAs no se tomarían en cuenta para el análisis de expresión diferencial por tener un bajo número de lecturas, se estudió la correlación entre las muestras de los tratamientos que se usaron para cada comparación. El criterio consistió en filtrar los miRNAs que tuvieran menos lecturas que la cantidad de lecturas que maximizan la correlación entre tratamientos. **A**, En la comparación NP-NE vs HP-NE se filtraron los miRNAs con menos de 13 lecturas. **B**, En la comparación NP-NE vs NP-EE, con menos de 8 lecturas. **C**, En la comparación NP-EE vs HP-EE, con menos de 11 lecturas. **D**, En la comparación NP-NE vs HP-EE, con menos de 12 lecturas.

Una vez filtradas las muestras, se graficó la correlación entre tratamientos para visualizar el aumento de la dispersión hacia bajo número de lecturas, por un lado, y para

chequear que los puntos correspondientes a los miRNAs se acomodaran, en su mayoría, sobre la recta 1:1, por otro (**Figura 20**). Esta última observación se debe a que los tratamientos aplicados no generan un cambio drástico en los patrones de expresión de miRNAs, lo cual es consistente con el tipo de tratamiento aplicado. El paradigma de malnutrición perinatal comprende aproximadamente 7 semanas durante etapas tempranas del desarrollo. En este tiempo el individuo puede adaptarse a los cambios del ambiente y, por lo tanto, los efectos fenotípicos pueden ser más sutiles que en el caso de tratamientos más puntuales. Lo mismo ocurre con el tratamiento de enriquecimiento ambiental, aunque, si se observan las lecturas de los miRNAs que involucran comparaciones con ambiente enriquecido (**Figura 20B, C**), puede notarse una mayor dispersión de puntos, es decir, un desajuste mayor, que el debido a la dieta materna.

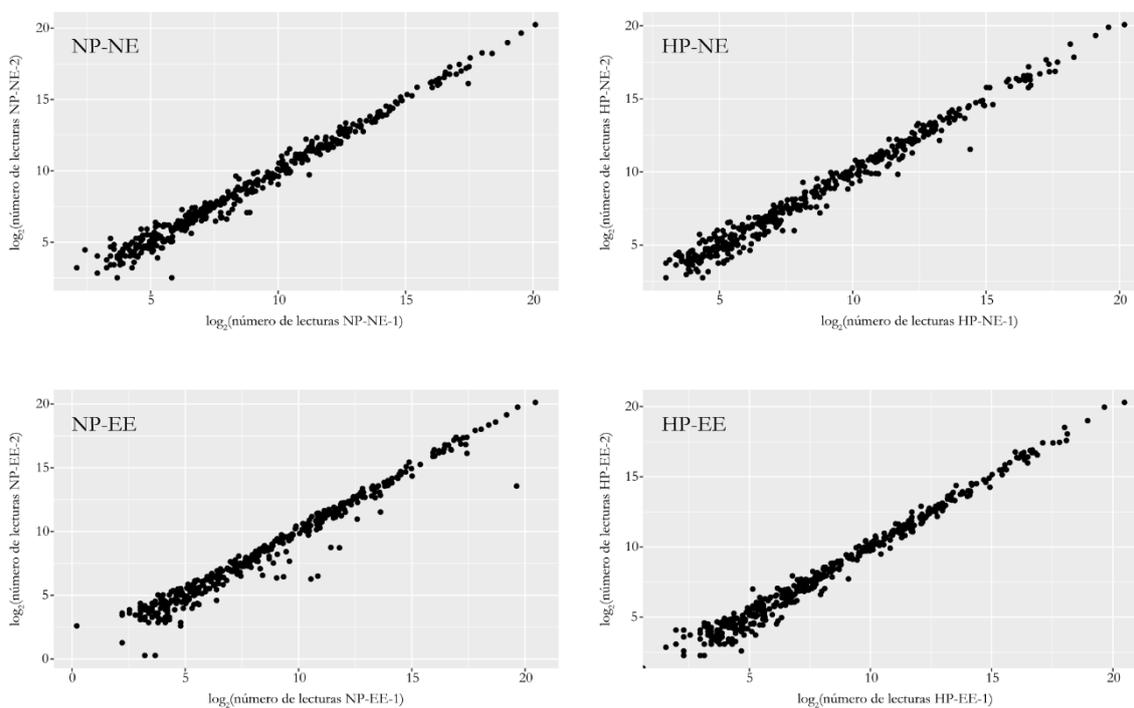


**Figura 20 | Correlación entre tratamientos en el número de lecturas.**

La evaluación de la dispersión de miRNAs en base a su número de lecturas permite sacar conclusiones sobre la calidad de los datos. Cuando se correlacionan los números de lecturas para cada miRNA entre 2 tratamientos se espera que los puntos se acomoden en la recta 1:1 debido a que, en principio, no se esperan cambios bruscos en los tratamientos utilizados. Además, en estos gráficos puede verse cómo aumenta la dispersión de los datos hacia números de lectura bajos, razón por la cual es necesario filtrar los miRNAs de baja expresión. **A**, Comparación NP-NE vs HP-NE. **B**, Comparación NP-NE vs NP-EE. **C**, Comparación NP-EE vs HP-EE. **D**, Comparación NP-NE vs HP-EE.

Por último, se observó que la correlación de lecturas entre las 2 réplicas de cada tratamiento no presentaba grandes desvíos (**Figura 21**), lo cual mostró una consistencia en la expresión génica de las réplicas a pesar de la alta variabilidad que presenta la colonia CF-

1 *per se*. En estos gráficos también se puede observar el aumento de la dispersión a bajo número de lecturas.



**Figura 21 | Correlación entre réplicas en el número de lecturas.**

Cuando se grafica la dispersión de las muestras entre réplicas, se espera que pocos puntos se desvíen de la recta 1:1 dado que se trata de 2 réplicas del mismo tratamiento. Si bien se observa cierta variabilidad, sumada al ya mencionado aumento de la variabilidad por bajo número de lecturas, las réplicas biológicas parecen ser consistentes en sus niveles de expresión de miRNAs. **A**, Réplicas del tratamiento NP-NE. **B**, Réplicas del tratamiento HP-NE. **C**, Réplicas del tratamiento NP-EE. **D**, Réplicas del tratamiento HP-EE.

Los resultados sobre la secuenciación masiva muestran que el experimento tuvo las características esperadas y que los datos resultantes están en condiciones de ser analizados para evaluar la expresión diferencial entre tratamientos.

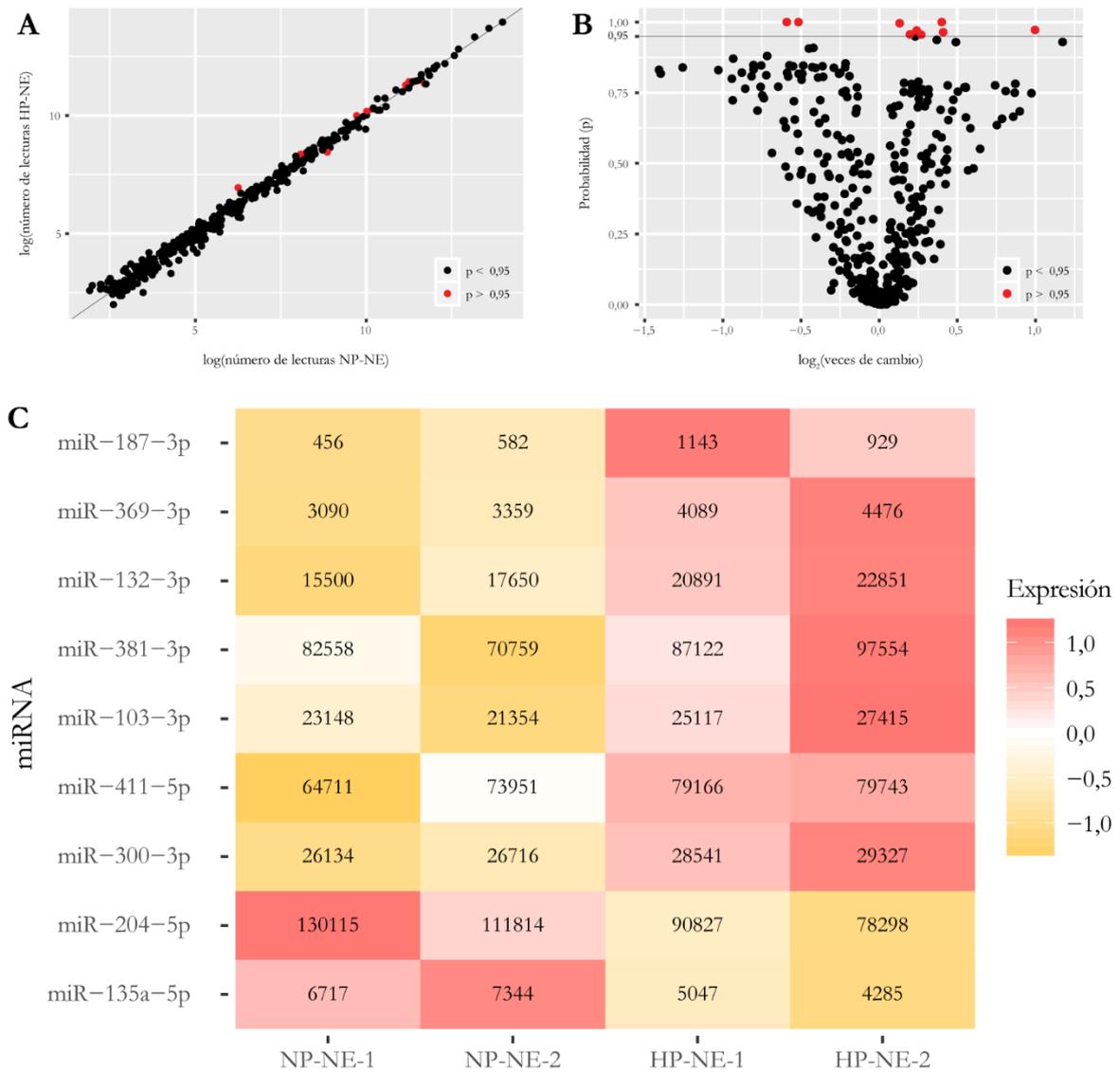
### 3.4.3. Análisis de expresión diferencial de miRNAs

Para evaluar la expresión diferencial de los miRNAs se tomaron, en primer lugar, los grupos NP-NE y HP-NE, es decir, ratones de dieta materna normal o hipoproteica, ambos alojados en ambientes normales a partir de P21. Con esta comparación se estudió el efecto de la malnutrición perinatal en la expresión global de miRNAs.

Para decidir qué miRNAs se encontraban diferencialmente expresados, se utilizó el paquete estadístico *NOISeqBIO* (Tarazona et al., 2015), el cual está optimizado para, al menos, 2 réplicas biológicas. Este análisis calcula una distribución de probabilidad en base a

la diferencia de expresión entre dos tratamientos y a la cantidad de lecturas para cada miRNA. Los miRNAs que superaron el valor de probabilidad de 0,95 fueron considerados como diferencialmente expresados.

Se encontraron 9 miRNAs diferencialmente expresados entre los tratamientos NP-NE y HP-NE (**Figura 22A**), 7 estaban regulados positivamente y 2, regulados negativamente en ratones hipoproteicos, como puede verse en el gráfico de tipo volcán (**Figura 22B**). Entre los miRNAs sobreexpresados, el miR-187-3p presentó el cambio más alto que alcanzó las 2 veces de inducción, mientras que el segundo miRNA de mayor cambio fue el miR-369-3p con 1,33 veces de cambio, seguido por el miR-132-3p con 1,32. Los miRNAs regulados negativamente fueron el miR-135a-5p y el miR-204-5p con 0,66 y 0,7 veces de cambio, respectivamente (**Figura 22C**).

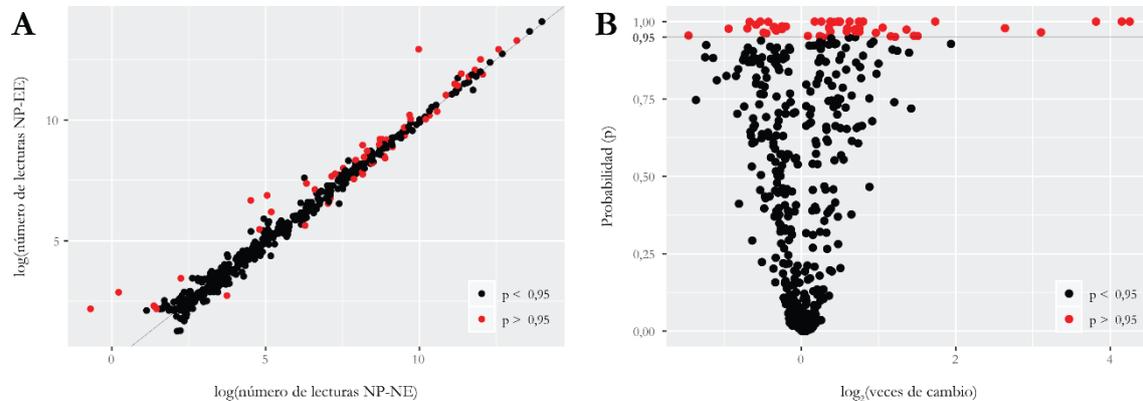


**Figura 22 | miRNAs diferencialmente expresados por la malnutrición.**

Análisis de expresión diferencial entre los tratamientos NP-NE vs HP-NE. **A**, Gráfico de dispersión de lecturas entre los tratamientos en el cual se marcan en rojo los miRNAs diferencialmente expresados. **B**, Los gráficos “volcán” suelen ser útiles para visualizar diferencias en patrones de expresión. Se grafica la probabilidad estadística en función de las veces de cambio. **C**, Los mapas de intensidad (o “*heatmap*”) también se utilizan para visualizar patrones de expresión diferencial. miRNAs menos expresados tienden al color naranja, mientras que miRNAs más expresados tienden al rojo. Los valores que figuran en cada celda corresponden a las lecturas normalizadas de los miRNAs para cada tratamiento. Se encontraron 9 miRNAs expresados diferencialmente por la malnutrición proteica perinatal, 7 de los cuales aumentaron su expresión, mientras que 2 la disminuyeron.

Luego, el análisis se orientó a estudiar los cambios en los patrones de expresión de miRNAs debidos al ambiente enriquecido, para lo cual se trabajó con la comparación NP-NE vs NP-EE. Se observó que 57 miRNAs estaban diferencialmente expresados debido al ambiente (**Figura 23A**), 39 de ellos resultaron regulados positivamente y 18, regulados negativamente (**Figura 23B**). Estos resultados son consistentes con el análisis visual de los

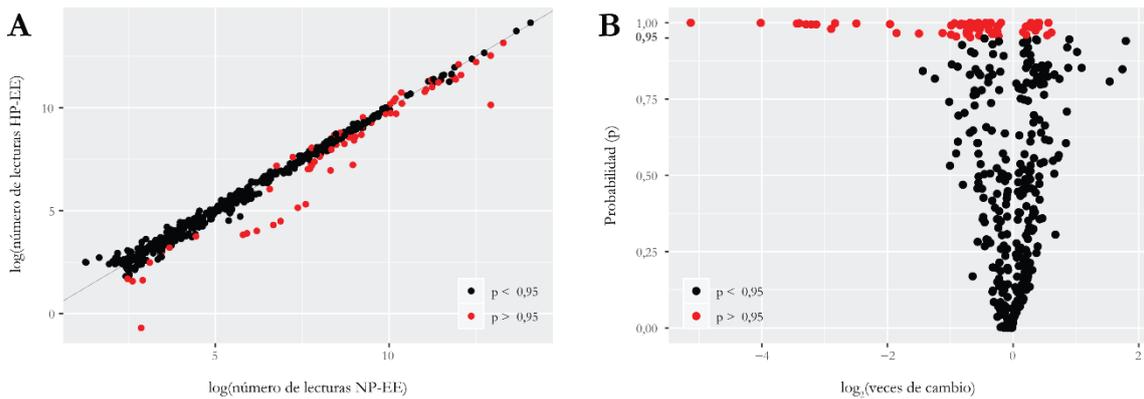
gráficos de correlación entre tratamientos, que sugerían que los cambios en la expresión de miRNAs producidos por el ambiente (**Figura 20B**) resultaban más drásticos que los producidos por la malnutrición (**Figura 20A**).



**Figura 23 | miRNAs diferencialmente expresados por el ambiente enriquecido.**

Análisis de expresión diferencial entre los tratamientos NP-NE vs NP-EE. **A**, Gráfico de dispersión de lecturas entre los tratamientos en el cual se marcan en rojo los miRNAs diferencialmente expresados. **B**, Cambios en los patrones de expresión de miRNAs visualizados mediante el gráfico “volcán”. Se encontraron 57 miRNAs expresados diferencialmente por el enriquecimiento ambiental, 39 de los cuales aumentaron su expresión, mientras que 18 la disminuyeron.

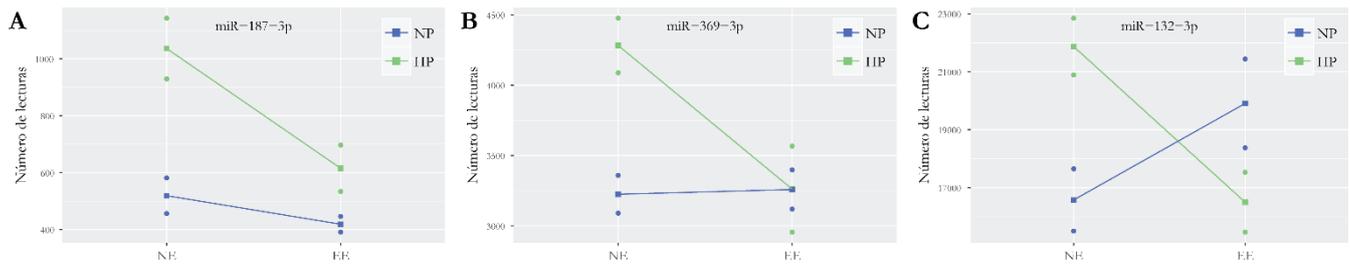
A continuación, se estudió si la dieta materna podría tener algún efecto sobre los ratones que son alojados en un ambiente enriquecido postdestete, con la hipótesis de que no generaría el mismo efecto la exposición a un ambiente estimulante cuando los ratones vivieron una adversidad temprana o cuando no. La comparación entre los grupos NP-EE y HP-EE dio como resultado 64 miRNAs diferencialmente expresados (**Figura 24A**). De ellos, 12 se encontraron regulados positivamente y 52, regulados negativamente (**Figura 24B**). Notablemente, la malnutrición perinatal generó mayores diferencias fenotípicas en la expresión de miRNAs en el contexto de un ambiente estimulante que las generadas por la malnutrición cuando los ratones no fueron sometidos al enriquecimiento (**Figura 22**). Si bien esta comparación no tiene una relevancia directa para el diseño de una intervención ambiental que reviera el fenotipo de los ratones hipoproteicos, permite evaluar el efecto del desajuste entre el ambiente temprano y el ambiente joven-adulto, y así contrastarlo con las hipótesis del desarrollo.



**Figura 24 | miRNAs diferencialmente expresados por la malnutrición materna en un contexto de enriquecimiento ambiental.**

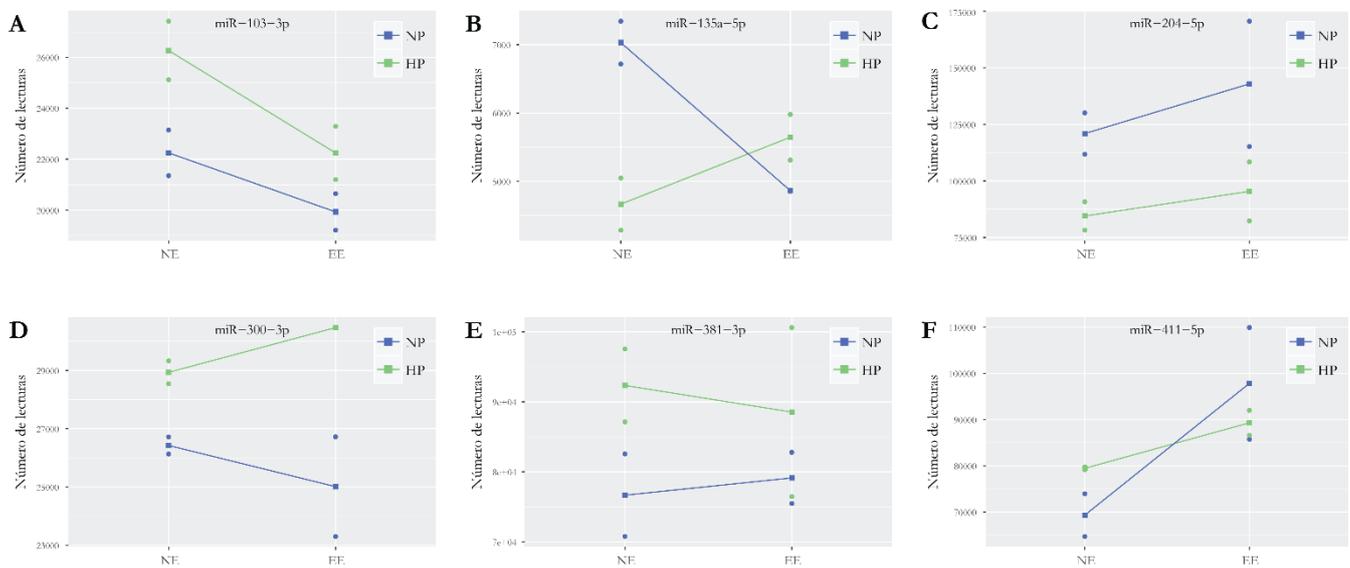
Análisis de expresión diferencial entre los tratamientos NP-EE vs HP-EE. **A**, Gráfico de dispersión de lecturas entre los tratamientos en el cual se marcan en rojo los miRNAs diferencialmente expresados. **B**, Cambios en los patrones de expresión de miRNAs visualizados mediante el gráfico “volcán”. Se encontraron 64 miRNAs expresados diferencialmente por el enriquecimiento ambiental, 12 de los cuales aumentaron su expresión, mientras que 52 la disminuyeron.

Para analizar la reversión de la expresión de los miRNAs, se utilizó la última de las 4 comparaciones, NP-NE vs HP-EE. De esta forma, se buscó estudiar si los cambios observados en la expresión de miRNAs para la comparación NP-NE vs HP-NE no se encontraban presentes o revertían su patrón de expresión en la comparación NP-NE vs HP-EE. Esto mostraría que el ambiente enriquecido en los ratones hipoproteicos genera una reversión del patrón de expresión hacia el de los ratones alimentados con una dieta materna normal y alojados en un ambiente normal. Por lo tanto, el principal interés de esta comparación radicó en contrastar sus resultados con los de la comparación NP-NE vs HP-NE. De esta manera, se estudiaron aquellos miRNAs que presentaban diferencias significativas en la comparación NP-NE vs HP-NE, y no estuvieran comprendidos en la lista de los diferencialmente expresados en la comparación NP-NE vs HP-EE. De los 9 miRNAs modificados por la malnutrición en condiciones ambientales normales, 3 de ellos (miR-187-3p, miR-369-3p y miR-132-3p) mostraron un patrón de expresión revertido por el ambiente enriquecido (**Figura 25**). Otros 5 miRNAs mostraron cambios en la expresión debidos a la dieta que no eran modificados por el estímulo ambiental (**Figura 26**). El caso del miR-135a-5p es diferente a los otros 3 debido a que el ambiente, en este caso, parece estar influyendo sobre la expresión de los ratones NP y no de los HP. El resultado, de todos modos, es una reversión. Pero, dado que nos interesa evaluar la reversión, en particular, del fenotipo HP, utilizaremos los 3 primeros miRNAs mencionados.



**Figura 25 | miRNAs desregulados con la malnutrición perinatal que reversion su patrón de expresión ante el ambiente enriquecido postdestete.**

Se tomaron 3 miRNAs que revertían su patrón de expresión con el EE y se los graficó de manera individual para visualizar la interacción entre los tratamientos. Los cuadrados representan las medias entre las réplicas y los círculos, cada réplica individual. **A**, miR-187-3p. **B**, miR-369-3p. **C**, miR-132-3p.



**Figura 26 | miRNAs desregulados con la malnutrición perinatal y que no reversion su expresión ante el ambiente enriquecido.**

De los 9 miRNAs desregulados por la malnutrición, 6 de ellos no parecieron interactuar con el ambiente postdestete. Estos 6 miRNAs se graficaron individualmente. Los cuadrados representan las medias entre las réplicas y los círculos, cada réplica individual. **A**, miR-103-3p. **B**, miR-135a-5p. **C**, miR-204-5p. **D**, miR-300-3p. **E**, miR-381-3p. **F**, miR-411-5p.

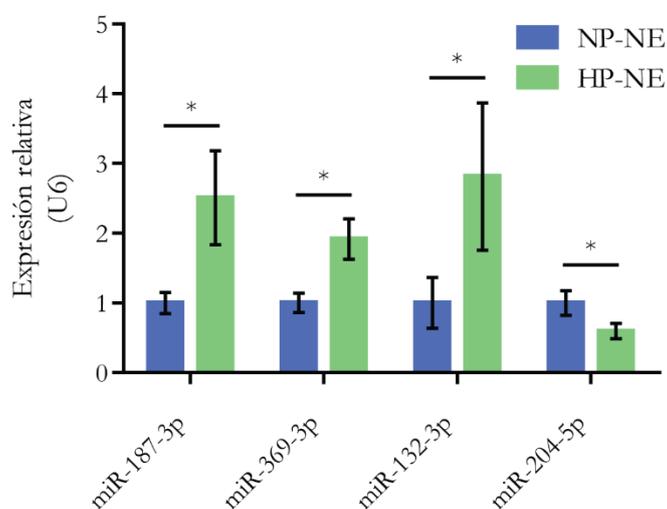
Estos resultados muestran que existe una correlación entre el nivel de expresión de los miRNAs miR-187-3p, miR-369-3p y miR-132-3p, y los fenotipos conductuales observados en ratones malnutridos que se reversion con la exposición a un ambiente enriquecido.

### 3.4.4. Validación

La secuenciación masiva es una técnica poderosa para el análisis global de la transcriptómica, pero suele carecer de poder estadístico debido a la limitante técnica y

económica de estudiar un número apropiado de réplicas biológicas. Por este motivo, los experimentos de análisis globales se validan utilizando técnicas más simples y focalizadas aplicadas a otro conjunto de muestras que permitan un mayor número de réplicas.

La validación de la secuenciación masiva de miRNAs consistió en la medición de la expresión de ciertos miRNAs por RT-qPCR. En primer lugar, se corroboró la expresión de 4 de los 9 miRNAs desregulados por la malnutrición materna: miR-187-3p, miR-369-3p, miR-132-3p y miR-204-5p. Los tres primeros resultaron regulados positivamente en ratones HP-NE respecto de ratones NP-NE, y el último, regulado negativamente (**Figura 27**). Este análisis por RT-qPCR validó los resultados de la secuenciación masiva.

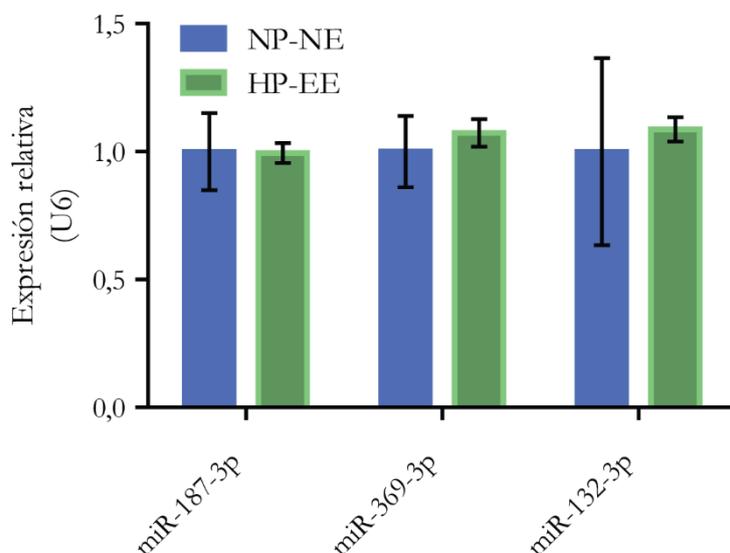


**Figura 27 | Validación de los resultados de la secuenciación masiva por RT-qPCR para la comparación NP-NE vs HP-NE.**

Se tomaron 4 miRNAs diferencialmente expresados por la malnutrición para validar el experimento de secuenciación masiva. Tres de ellos fueron los que revirtieron su patrón de expresión con el EE, y el cuarto fue uno de los dos que se regula negativamente. En ensayos de RT-qPCR, se validaron los patrones de expresión de estos miRNAs, coincidentes con los resultados de la secuenciación masiva. En todos los casos se utilizó un test *t*-Student. Cuando no se cumplió la normalidad de los datos, se usó el test de Mann-Whitney. Cuando no se cumplió la homocedasticidad, se usó la corrección de Welch. miR-187-3p, miR-369-3p y miR-132-3p resultaron aumentados por la malnutrición perinatal, mientras que miR-204-5p se vio disminuido. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM (n = 5-8). \* p < 0,05.

#### 3.4.5. Reversión

Una vez validado el experimento de secuenciación masiva, se decidió probar que los 3 miRNAs que revertían su patrón de expresión en la comparación NP-NE vs HP-EE (**Figura 25**), efectivamente no estuvieran desregulados. Cuando se los analizó por RT-qPCR, los miRNAs miR-187-3p, miR-369-3p y miR-132-3p no mostraron diferencias en el hipotálamo de ratones entre los tratamientos NP-NE y HP-EE (**Figura 28**).



**Figura 28 | Reversión de los patrones de expresión de miRNAs con el ambiente enriquecido postdestete.**

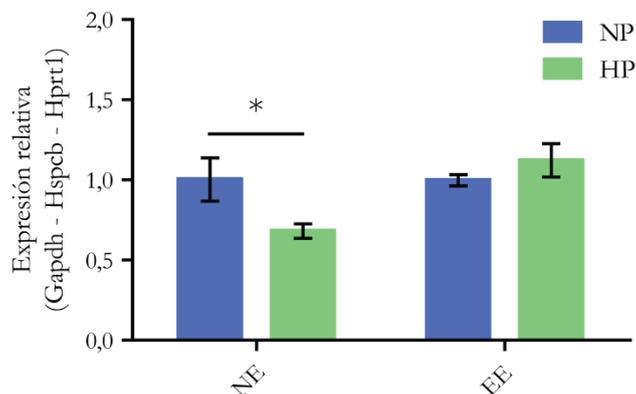
En ensayos de RT-qPCR se pudo validar la ausencia de cambio en los patrones de expresión de miRNAs cuando se comparan los ratones NP-NE vs HP-EE. En todos los casos se utilizó un test *t*-Student. Cuando no se cumplió la normalidad de los datos, se usó el test de Mann-Whitney. Cuando no se cumplió la homocedasticidad, se usó la corrección de Welch. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM (n = 5-8).

Estos resultados corroboran que ciertos miRNAs que están regulados positivamente por la malnutrición materna revierten su patrón de expresión cuando los ratones son sometidos a un ambiente enriquecido. Además, estos datos correlacionan con la reversión del comportamiento de tipo ansioso y de memoria que se mostró previamente (ver Resultados 3.2). Es de particular interés la reversión de la ansiedad debido a que la expresión de miRNAs se estudió en el hipotálamo, principal región del cerebro encargada de la regulación del estrés. Así, miR-187-3p, miR-369-3p y miR-132-3p podrían ser en parte responsables del fenotipo ansioso y su efecto de reversión por el ambiente.

Por último, decidimos evaluar la expresión de algún mRNA blanco de los miRNAs validados. Numerosos trabajos han estudiado el rol de miR-132-3p en el cerebro y, particularmente, en la regulación de la neuroplasticidad. Ni miR-187-3p ni miR-369-3p han sido relacionados con el sistema nervioso tan ampliamente como miR-132-3p. Recientemente, se ha descrito que miR-132-3p regula la expresión de BDNF, y viceversa. No es claro si lo hace de manera directa o indirecta (Klein et al., 2007), pero resultó interesante conocer si BDNF estaba desregulado en nuestro modelo de malnutrición y si el EE tenía algún efecto sobre su expresión.

Primero, se estudió si el mRNA de BDNF era blanco de miR-132-3p en base a la predicción de alguna de las bases de datos utilizadas. MicroT4, RNA22 y RNAhybrid

predijeron que miR-132-3p podría regular a distintas isoformas de BDNF. Cuando se midió la expresión de BDNF, se observó que este mRNA se encontraba disminuido en ratones HP, y que este patrón de expresión era revertido por el EE (**Figura 29**). Sugerentemente, los niveles de expresión de BDNF resultaron contrapuestos con los de miR-132-3p.



**Figura 29 | Expresión de BDNF como potencial blanco de miR-132-3p.**

Se midió la expresión del mRNA de BDNF por RT-qPCR en ratones de los 4 tratamientos utilizados a P56. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,7} = 2,59$ ;  $p = 0,1518$ ), el ambiente ( $F_{1,7} = 7,20$ ;  $p = 0,0314$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,7} = 10,77$ ;  $p = 0,0135$ ). El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que las diferencias que se marcan en los gráficos resultaron significativas. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$ ). \*  $p < 0,05$ .

La desregulación de BDNF resulta prometedora para el estudio de las bases moleculares de los fenotipos conductuales dado que este factor trófico ha sido involucrado en procesos de neurogénesis y plasticidad sináptica (Numakawa et al., 2011). Pero, más relevante a este trabajo, le otorga a los miRNAs un potencial rol en dichos procesos, mediante la regulación postranscripcional de los genes involucrados.

#### 3.4.6. Análisis bioinformático

Se consideró que la validación de un set de muestras permite concluir que, en su generalidad, los resultados de la secuenciación podrían ser replicados con la técnica de RT-qPCR. Por esta razón, para realizar el análisis de predicción de mRNAs blancos y posteriores análisis bioinformáticos, se trabajó con todos los miRNAs significativamente desregulados según el experimento de secuenciación masiva, aún si los mismos no habían sido validados por RT-qPCR.

#### 3.4.6.1. **Predicción de genes blanco**

En primer lugar, se realizó una predicción de mRNAs potencialmente blancos de los 9 miRNAs desregulados por la malnutrición. Se utilizó la base de datos miRWalk 2.0 (Dweep and Gretz, 2015), que permite el uso simultáneo de varios algoritmos de predicción en una única búsqueda, lo cual es útil debido a las diferencias de especificidad y sensibilidad de cada algoritmo. Para aumentar la credibilidad de la predicción y disminuir el número de falsos positivos, se tomó el resultado predictivo de la intersección entre 9 algoritmos: miRWalk, MicroT4, miRanda, miRMap, miRNAMap, PITA, RNA22, RNAhybrid y TargetScan. Tomando como punto de partida la lista de los 9 miRNAs diferencialmente expresados en ratones malnutridos se obtuvieron 424 mRNAs objetivo potencialmente regulados por, al menos, 1 de los 9 miRNAs (ver **Anexos Anexo 1**).

#### 3.4.6.2. **Predicción de vías celulares y Ontología de Genes (GO)**

En base a una lista de genes es posible predecir bioinformáticamente las vías celulares en las cuales dichos genes están involucrados. Una de las herramientas que permite esta predicción es la herramienta ToppGene (Chen et al., 2009), que evalúa el enriquecimiento de vías celulares asociadas a los genes dados y los compara con el enriquecimiento que se esperaría por azar. Además, ToppGene permite clasificar los genes ingresados dentro de los términos de *Gene Ontology* y evaluar cuáles son los dominios más representados divididos en tres categorías: componente celular (*cellular component*, CC), proceso biológico (*biological process*, BP) y función molecular (*molecular function*, MF).

Mediante esta herramienta se obtuvieron las vías celulares enriquecidas en la lista de 424 mRNAs predichos como posibles blancos de miRNAs desregulados (**Tabla 2**). La primera vía sugerida por este análisis fue la de direccionamiento axonal (*axon guidance*). Diversos estudios han demostrado el rol de los miRNAs en dicha vía durante el desarrollo, particularmente en los procesos de direccionalidad de largo alcance, fasciculación axonal y *targeting* axonal (Iyer et al., 2014). Además, también se encontró enriquecida la vía de señalización por ErbB1 que regula, a través de las vías de Akt y MAPK, procesos relacionados con el crecimiento del axón, como ser, la movilidad y migración celular. La vía de ErbB1 posee una fina regulación por miRNAs (Park et al., 2013). También relacionado con el direccionamiento axonal, se encontró que las interacciones por L1CAM estaban enriquecidas entre las vías celulares de la lista de potenciales genes blanco. La familia L1CAM ha sido implicada en procesos que integran el desarrollo del sistema nervioso,

incluyendo crecimiento y fasciculación de neuritas y adhesión entre neuronas (Duan et al., 2014). Por otro lado, se presentó la cascada de señalización de mTOR, la cual es responsable de sensar claves nutricionales ambientales, como la presencia de aminoácidos, y regular el crecimiento celular (Zhang et al., 2017).

**Tabla 2 | Vías celulares potencialmente desreguladas por la malnutrición perinatal**

ID	Nombre	p-valor	Genes en la lista	Genes en la categoría
105688	Direccionamiento axonal	0,000021	24	262
477129	Biología del desarrollo	0,000101	30	419
83059	Vía de señalización de mTOR	0,000168	11	60
106459	Señalización de NGF vía TRKA de la membrana plasmática	0,001844	18	201
161003	Interacciones por L1CAM	0,002660	12	94
138057	Señalización río abajo de ErbB1	0,007016	12	103
198762	Señalización por TOR	0,014090	7	34
106439	Señalización por NGF	0,019230	20	284
530734	Señalización por ERBB2	0,031800	14	159
198868	Señalización por AMPK	0,036010	9	68
161004	Vía de reciclado por L1	0,037280	6	27
198878	Señalización por Receptor de serotonina 2 y ELK-SRF/GATA4	0,039550	5	17
160957	Señalización río abajo de FGFR activado	0,046970	13	144

Por último, se evaluaron los términos de *Gene Ontology* más representados por la lista de mRNAs blanco (**Tabla 3**). Para la categoría de Funciones Moleculares, los términos significativamente representados englobaron al mecanismo de unión a purinas y de unión a la cromatina, lo cual es consistente con los resultados obtenidos para Procesos Biológicos, en los cuales figuraron términos relacionados con modificaciones de la cromatina. De esta manera se sugiere indirectamente el impacto que puede tener la malnutrición perinatal sobre la epigenética como mecanismo de regulación de procesos celulares que afectan el comportamiento. Por otro lado, en la categoría de Procesos Biológicos se presentaron términos como neurogénesis, diferenciación de neuronas y, particularmente interesante, el desarrollo de las proyecciones axonales, consistente con la desregulación de la vía de direccionamiento axonal. En consonancia con el resultado obtenido para las vías celulares

que involucran a esta lista de genes, los términos del grupo de Compartimiento Celular mostraron un enriquecimiento en el axón y en la post-sinapsis.

**Tabla 3 | Términos de Ontología de Genes**

GO: Función Molecular

ID	Nombre	p-valor	Genes en la lista	Genes en la categoría
GO:0044877	Unión a complejo molecular	0,000568	68	1641
GO:0017076	Unión a purinas	0,002367	73	1881
GO:0019899	Unión a enzimas	0,006271	73	1933
GO:0030554	Unión a adenil nucleótidos	0,016170	60	1531
GO:0035174	Actividad de histona serina quinasa	0,016400	4	8
GO:0003682	Unión a cromatina	0,017400	28	516
GO:0005524	Unión a ATP	0,021080	58	1476
GO:0042054	Actividad de histona metiltransferasa	0,049580	8	59

GO: Proceso Biológico

ID	Nombre	p-valor	Genes en la lista	Genes en la categoría
GO:0016570	Modificación de histonas	< 0,000001	36	453
GO:0016569	Modificación covalente de la cromatina	< 0,000001	36	468
GO:0022008	Neurogénesis	0,000002	75	1638
GO:0006325	Organización de la cromatina	0,000002	46	776
GO:0030182	Diferenciación de neuronas	0,000003	67	1405
GO:0045595	Regulación de la diferenciación celular	0,000009	75	1706
GO:0051960	Regulación del desarrollo del sistema nervioso	0,000014	48	886
GO:0031175	Desarrollo de la proyección neuronal	0,000020	50	956

GO: Compartimiento Celular

ID	Nombre	p-valor	Genes en la lista	Genes en la categoría
GO:0030424	Axón	0,001227	32	567
GO:1990234	Complejo transferasa	0,001914	37	724
GO:0097458	Parte neuronal	0,006555	61	1552
GO:0098794	Postsinapsis	0,009642	26	454
GO:1902494	Complejo catalítico	0,014180	46	1080
GO:0014069	Densidad postsináptica	0,022510	17	238
GO:0099572	Especialización postsináptica	0,022510	17	238
GO:0044463	Parte de la proyección celular	0,033680	47	1152
GO:0043005	Proyección neuronal	0,044360	48	1199
GO:0036477	Compartimento somatodendrítico	0,049520	38	871

Estos resultados en su conjunto permitieron predecir un posible efecto de la disregulación de miRNAs por la malnutrición perinatal sobre la vía de orientación axonal. Esta vía es la responsable de que se establezcan las correctas conexiones sinápticas entre los

axones y las dendritas durante el desarrollo temprano (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Yamamoto et al., 2002), así como también el balance entre sinapsis inhibitorias y excitatorias en los adultos (Lai and Ip, 2009; Pasterkamp and Giger, 2009). Ha sido demostrado que el estrés, en particular el nutricional, puede alterar esta vía impidiendo la correcta estructuración de regiones cerebrales (Coupé et al., 2010) y, además, que desregulaciones en las proteínas involucradas en la orientación axonal son la causa de enfermedades neurológicas (Van Battum et al., 2015).

La regulación del estrés por el eje HPA involucra varias regiones del cerebro, teniendo al hipotálamo como núcleo principal y al sistema límbico como el regulador de la respuesta a estrés y la formación de memorias sobre los estímulos que generaron ese estrés. La vía de orientación axonal es necesaria para que este complejo sistema neuroendócrino funcione correctamente, debido a que las conexiones entre estas diferentes zonas deben estar correctamente formadas. Por esta razón, hipotetizamos que, si esta vía estaba alterada en ratones malnutridos, las conexiones entre el hipotálamo y otros núcleos del sistema límbico podrían verse afectadas.

Las conexiones entre regiones del cerebro están compuestas por conjuntos de axones empaquetados. La rápida y fidedigna transmisión de potenciales de acción a través de estos axones se logra gracias a que los mismos están recubiertos por una capa de lípidos formando la vaina de mielina. Una forma de evaluar si las conexiones entre diferentes regiones del cerebro están correctamente desarrolladas consiste en estudiar la mielinización de estas rutas de axones que comunican diferentes áreas del cerebro.

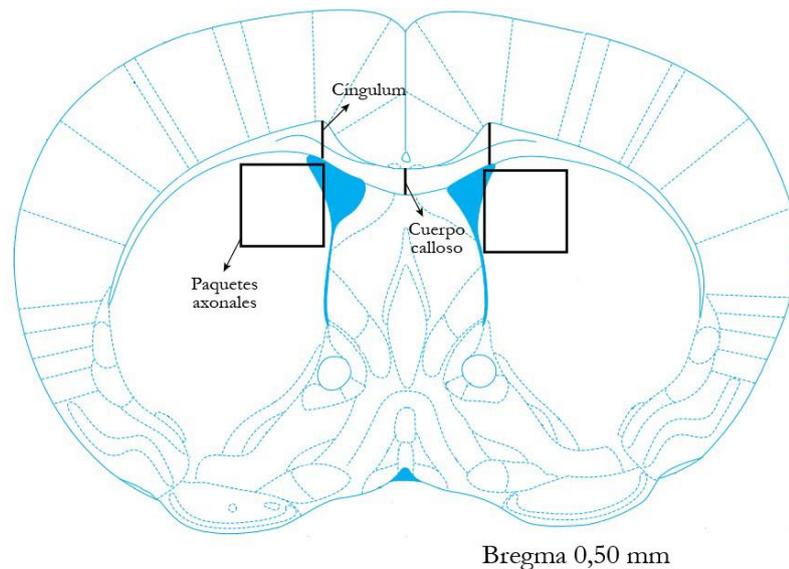
### **3.5. Mielinización**

El estrés temprano afecta numerosos procesos biológicos durante el desarrollo del individuo y, particularmente, a nivel del sistema nervioso. Uno de estos procesos es el de mielinización, responsable de la formación de la vaina de mielina alrededor de los axones para su correcta transmisión de potenciales de acción. Además, la formación de mielina se produce en un período crítico del desarrollo, durante el cual la exposición a adversidades ambientales genera cambios irreversibles que pueden llevar al progreso de enfermedades (Makinodan et al., 2012).

### 3.5.1. *Evaluación general del estado de mielinización*

Habiendo visto que la vía de orientación axonal podría estar afectada por la malnutrición a través de los miRNAs, nos propusimos estudiar si las conexiones entre ciertas regiones del cerebro, mediadas por los haces de axones, estarían alteradas en ratones HP. Para ello, utilizamos la tinción de Klüver-Barrera que, haciendo uso del colorante Luxol *Fast Blue* (ver Materiales y Métodos 5.11.1), tiñe la materia blanca y permite hacer un análisis global morfológico de las principales zonas que contienen axones. Este colorante es lipofílico y tiene alta afinidad por la mielina.

Para evaluar el efecto de la malnutrición perinatal y el del ambiente enriquecido sobre la mielinización, se utilizaron los 4 tratamientos ya mencionados: NP-NE, HP-NE, NP-EE y HP-EE. Se evaluaron cortes coronales de ratones machos a P56 mediante la tinción de Klüver-Barrera. En cortes que correspondían a regiones del cerebro que se encontraban entre el Bregma 0,38 y 0,50 mm, se midieron los siguientes parámetros: tamaño del cíngulum, tamaño del cuerpo caloso y superficie de los paquetes axonales (**Figura 30**). La razón por la cual se eligieron estas conexiones radica en que son, en parte, las responsables de comunicar al hipotálamo con el sistema límbico en general, pero, particularmente, con la corteza prefrontal (PFC), constituyendo un nexo importante entre las regulaciones homeostáticas por estrés, la regulación del eje HPA y las características emocionales y cognitivas.

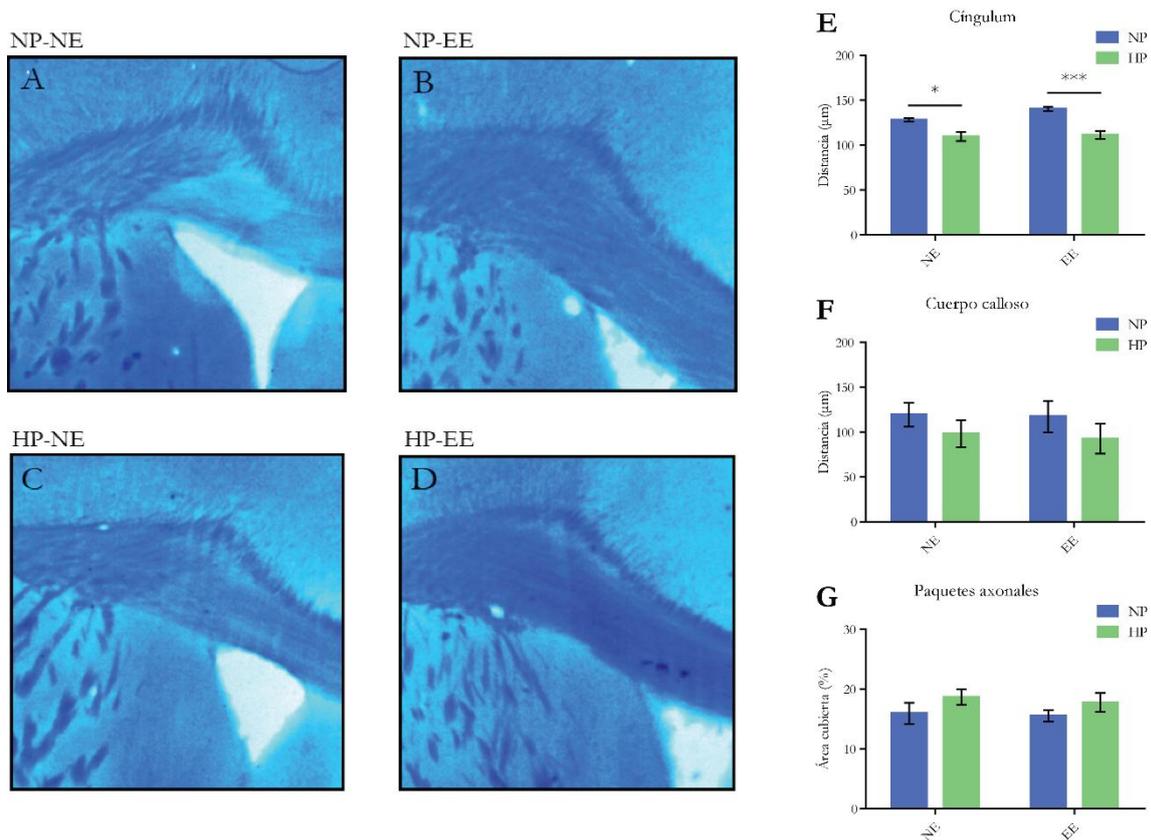


**Figura 30 | Regiones elegidas para el análisis de la mielinización.**

Se eligieron 3 zonas principales para medir el grado de mielinización en cortes coronales de cerebro. El cíngulum se midió sobre la línea que indica la figura, en ambos hemisferios y se promediaron los valores. El cuerpo calloso se midió centralmente, como indica la figura. Por último, se midió la superficie ocupada por los paquetes axonales dentro del cuadro delimitado en la figura. Las mediciones se hicieron con cortes que correspondieran al Bregma 0,5 mm aproximadamente.

Se encontró que el tamaño del cíngulum estaba disminuido en ratones HP para ambos tratamientos ambientales, sin encontrarse diferencias entre el ambiente postdestete normal y el enriquecido (**Figura 31E**). En la **Figura 31A, B, C, D**, se muestran fotos representativas para esta zona en cada uno de los 4 tratamientos. Esta disminución resultó ser específica del cíngulum dado que no se encontraron diferencias ni en el tamaño del cuerpo calloso (**Figura 31F**) ni en la superficie de los paquetes axonales del estriado (**Figura 31G**).

Estos resultados sugieren que la malnutrición perinatal tiene un efecto sobre la estructuración de las conexiones mediadas por el cíngulum, haciendo más delgada esta zona. El ambiente postdestete parece no tener efecto sobre ninguna de las zonas evaluadas. La disminución en el tamaño del cíngulum podría ser parte de la razón por la cual se observan diferencias en la conducta en ratones malnutridos perinatalmente y podría tener sus bases moleculares en la regulación epigenética por miRNAs.



**Figura 31 | Evaluación de las estructuras miélicas.**

Se estudió la mielinización mediante la técnica de Klüver-Barrera en ratones sometidos al paradigma de malnutrición perinatal y enriquecimiento ambiental. En esta figura se muestra, como ejemplo, una foto representativa de cada tratamiento para la medición del parámetro que resultó estar modificado, el tamaño del cíngulum. **A**, Cíngulum de un ratón NP-NE. **B**, Cíngulum de un ratón NP-EE. **C**, Cíngulum de un ratón HP-NE. **D**, Cíngulum de un ratón HP-EE. **E**, Medición del tamaño del cíngulum. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,13} = 33,70$ ;  $p < 0,0001$ ), el ambiente ( $F_{1,13} = 2,91$ ;  $p = 0,1117$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,13} = 1,61$ ;  $p = 0,2265$ ). **F**, Medición del tamaño del cuerpo caloso. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,13} = 1,75$ ;  $p = 0,2085$ ), el ambiente ( $F_{1,13} = 0,05$ ;  $p = 0,8271$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,13} = 0,01$ ;  $p = 0,9183$ ). **G**, Medición de la superficie de los paquetes axonales. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,10} = 1,99$ ;  $p = 0,1891$ ), el ambiente ( $F_{1,10} = 0,13$ ;  $p = 0,7218$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,10} = 0,02$ ;  $p = 0,8926$ ). El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que las diferencias que se marcan en los gráficos resultaron significativas. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 3-6$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

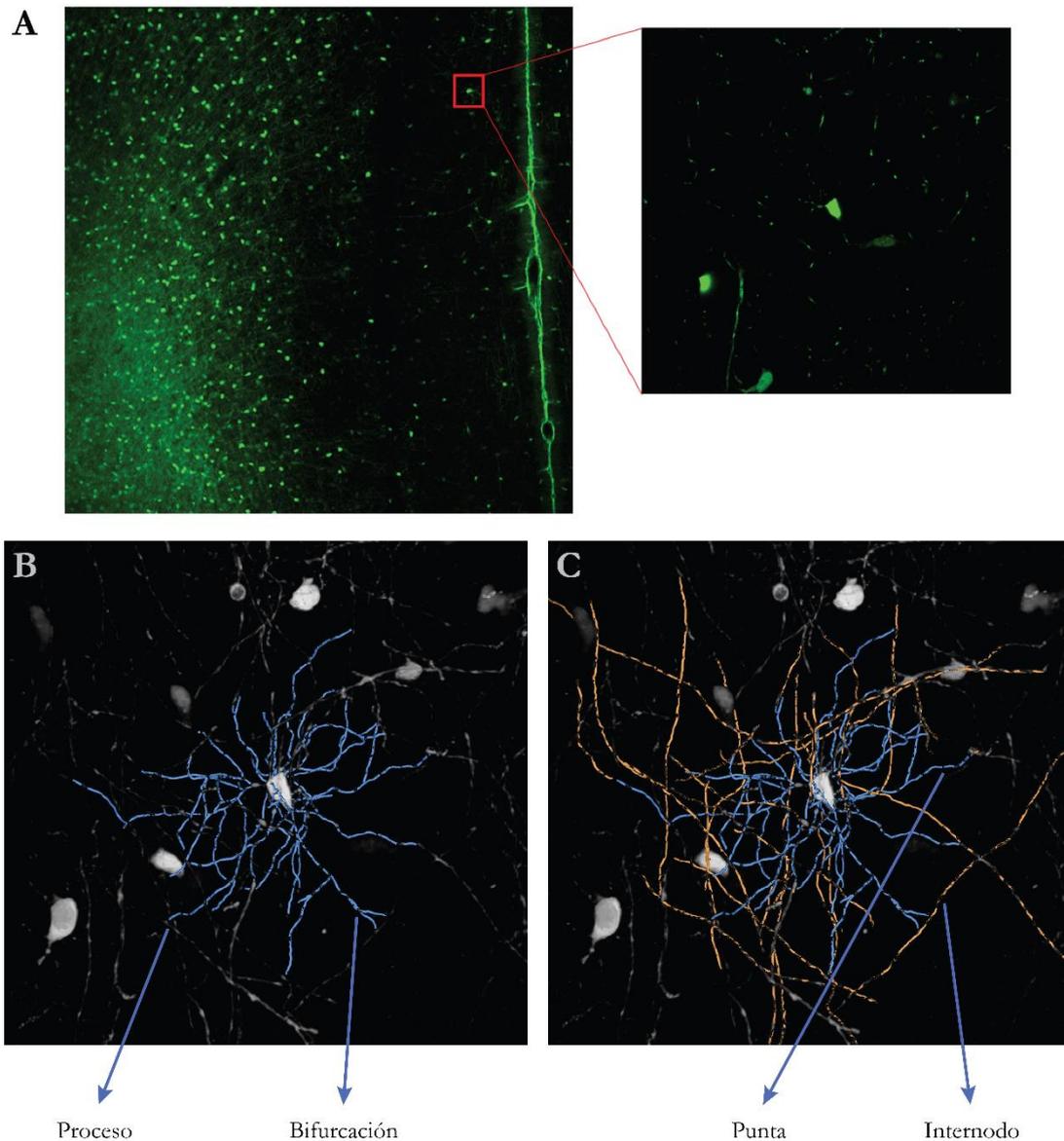
### 3.5.2. Estudio de la morfología de oligodendrocitos en la mPFC

En vista de los resultados obtenidos sobre el efecto de la malnutrición perinatal sobre la estructuración de las zonas de materia blanca, decidimos estudiar si esta alteración se debía a la función de los oligodendrocitos. Los oligodendrocitos son células gliales encargadas de generar la mielina que envuelve a los axones, permitiendo el aislamiento eléctrico necesario para la propagación de potenciales de acción. Uno de los factores que

puede determinar el grado de mielinización axonal es la morfología oligodendrocítica (Murtie et al., 2007).

Dado que se observó una disminución significativa en el tamaño del cíngulum en ratones HP, y que esta estructura media las conexiones axonales entre el hipotálamo y la corteza prefrontal medial (mPFC), entre otras, para este estudio se eligió la mPFC. Para esto, pudimos hacer uso de una cepa de ratones transgénicos FVB/NJ que expresan la *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) bajo las órdenes del promotor del gen específico de oligodendrocitos, *Plp*. El análisis de la morfología de los oligodendrocitos maduros de la mPFC estuvo basado en reportes previos de evaluación morfológica de estas células (Liu et al., 2012; Makinodan et al., 2012; Murtie et al., 2007) (ver Materiales y Métodos 5.3 y 5.4).

Para hacer la reconstrucción tridimensional de los oligodendrocitos, se siguieron todos los procesos primarios con sus ramificaciones, a partir del soma celular (**Figura 32A**). Al final de aproximadamente la mitad de las ramificaciones se registraron los internodos de mielina, es decir, las bandas de mielina que van desde un nodo de Ranvier hasta el siguiente. Las ramificaciones que terminaron o no en internodos fueron también contabilizadas y ambas englobadas con el nombre de *tips* o puntas. Los internodos se identificaron por la presencia de nodos de Ranvier y por ser ligeramente más gruesos que los procesos (**Figura 32B**). Luego de hacer la reconstrucción tridimensional de las células, se analizaron los siguientes parámetros: cantidad de internodos por célula, longitud promedio de los internodos, suma de la longitud de internodos, internodos sobre puntas, longitud total de los procesos, longitud promedio de los procesos, puntas por célula, ramificaciones por célula, y máximo orden de ramificación.

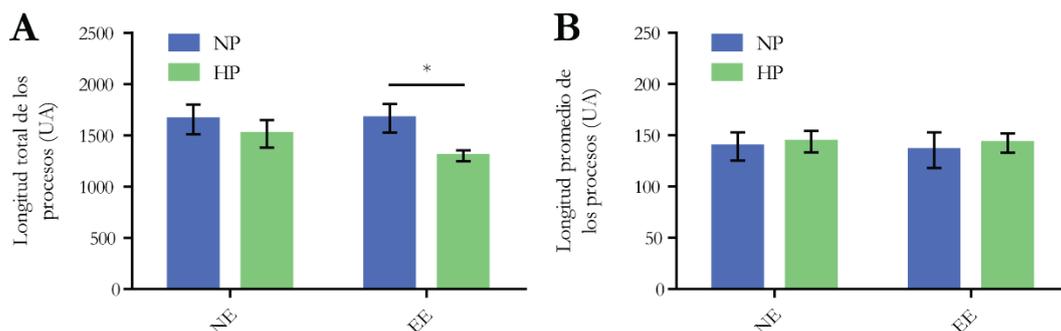


**Figura 32 | Reconstrucción tridimensional de oligodendrocitos.**

La reconstrucción tridimensional de oligodendrocitos en una cepa de ratones transgénicos que expresan eGFP bajo las órdenes de un promotor específico de linaje oligodendrocítico, permitió analizar la morfología de estas células. **A**, Corte coronal de ratón observado al microscopio confocal en el que puede notarse el estriado. Una ampliación de la zona muestra un oligodendrocito con sus procesos. **B**, A modo de ejemplo, se muestra la reconstrucción tridimensional de los procesos de un oligodendrocito. En gris se observa el soma celular y algunos procesos o internodos que corresponden a la pila de imágenes confocales. En azul puede verse la reconstrucción una vez terminada. **C**, La reconstrucción del mismo oligodendrocito que en el panel A, pero agregando ahora todos los internodos mielinizados por esta célula.

En primer lugar, se caracterizaron los parámetros relacionados con los procesos oligodendrocíticos. No se observaron diferencias en la longitud total de los procesos entre ratones NP-NE y HP-NE (**Figura 33A**). Sin embargo, cuando los ratones son sometidos a un ambiente enriquecido, se observa una disminución de este parámetro en los ratones

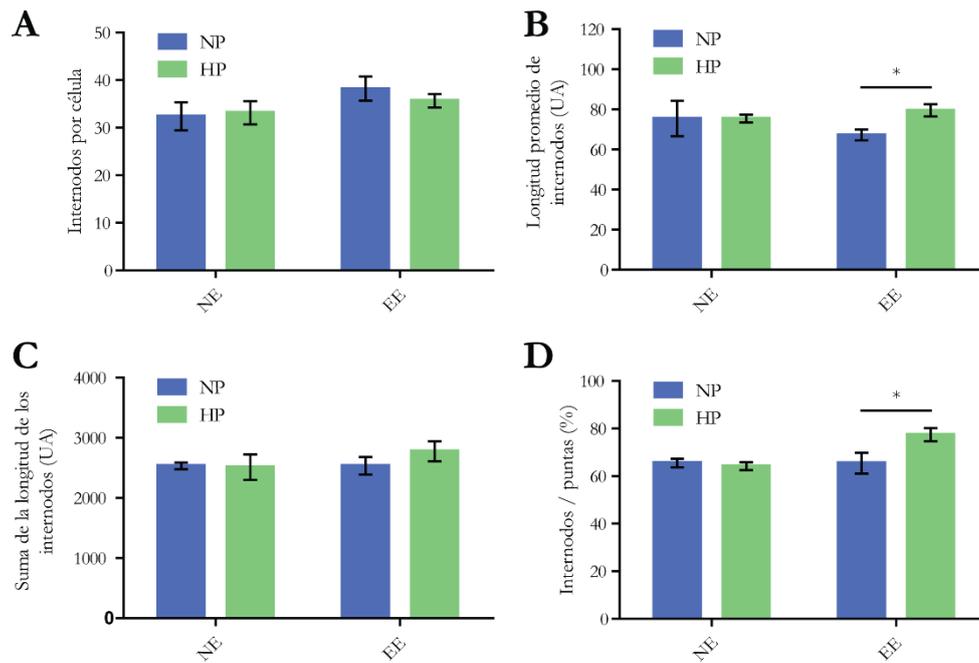
malnutridos (**Figura 33A**). Cuando se analizó la longitud promedio de los procesos celulares, no se observaron diferencias entre ratones NP-EE y HP-EE, ni tampoco en los ratones alojados en ambientes normales postdestete independientemente de la dieta (**Figura 33B**). Por lo tanto, este resultado sugeriría que, al presentar el mismo tamaño promedio los procesos de los ratones de los cuatro tratamientos, existe una menor cantidad de procesos totales en ratones HP-EE que resultan en una menor longitud total.



**Figura 33 | Caracterización de la morfología de oligodendrocitos relacionada con los procesos celulares.**

Medición de los parámetros relacionados a los procesos de los oligodendrocitos en ratones P56 de los cuatro grupos utilizados en el paradigma de malnutrición con posterior enriquecimiento ambiental. **A**, Longitud total de los procesos. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,30} = 4,28$ ;  $p = 0,0474$ ), el ambiente ( $F_{1,30} = 0,69$ ;  $p = 0,4126$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,30} = 0,84$ ;  $p = 0,3663$ ). **B**, Longitud promedio de los procesos. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,31} = 0,17$ ;  $p = 0,6846$ ), el ambiente ( $F_{1,31} = 0,03$ ;  $p = 0,8666$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,31} = 0,01$ ;  $p = 0,9369$ ). El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que las diferencias que se marcan en los gráficos resultaron significativas. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 4-6$ ). \*  $p < 0,05$ .

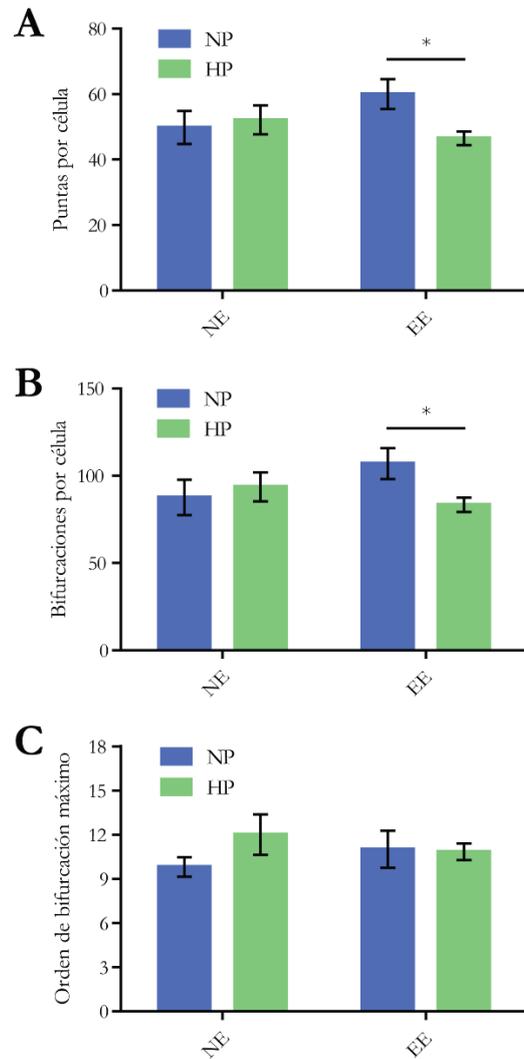
En segundo lugar, se estudió el efecto de la dieta y el ambiente en las características morfológicas de los internodos que generan los oligodendrocitos. No se encontraron diferencias en la cantidad total de internodos por célula (**Figura 34A**) en ninguno de los tratamientos. En este caso, si bien no se notaron diferencias en la longitud total de los internodos (**Figura 34C**), sí se observó un aumento de su longitud promedio en ratones HP-EE respecto de ratones NP-EE (**Figura 34B**). Nuevamente, el ambiente enriquecido operó como un factor de presión que evidenció diferencias fenotípicas (ver Discusión 4.6.3). Además, cuando se evaluó el número de internodos respecto del número de puntas, es decir, qué proporción de ramificaciones terminaban en un internodo, se encontró un aumento significativo en los ratones HP-EE respecto de los NP-EE (**Figura 34D**).



**Figura 34 | Caracterización de la morfología de los internodos generados por los oligodendrocitos.**

Medición de los parámetros relacionados con los internodos mielinizados por los oligodendrocitos en ratones P56 de los cuatro grupos utilizados en el paradigma de malnutrición con posterior enriquecimiento ambiental. **A**, Cantidad de internodos por célula. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,31} = 0,15$ ;  $p = 0,7032$ ), el ambiente ( $F_{1,31} = 3,15$ ;  $p = 0,0859$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,31} = 0,48$ ;  $p = 0,4935$ ). **B**, Longitud promedio de internodos. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,29} = 2,68$ ;  $p = 0,1128$ ), el ambiente ( $F_{1,29} = 0,31$ ;  $p = 0,5841$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,29} = 2,70$ ;  $p = 0,1114$ ). **C**, Suma total de los internodos. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,31} = 0,37$ ;  $p = 0,5483$ ), el ambiente ( $F_{1,31} = 0,53$ ;  $p = 0,4709$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,31} = 0,53$ ;  $p = 0,4731$ ). **D**, Internodos relativos a las puntas. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,31} = 2,36$ ;  $p = 0,1345$ ), el ambiente ( $F_{1,31} = 3,58$ ;  $p = 0,0679$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,31} = 3,65$ ;  $p = 0,0654$ ). El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que las diferencias que se marcan en los gráficos resultaron significativas. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 4-6$ ). \*  $p < 0,05$ .

Por último, se estudiaron parámetros generales de la ramificación de los procesos celulares. Se presentó una menor cantidad de puntas totales en los ratones HP-EE respecto de los NP-EE (**Figura 35A**), lo cual es consistente con la reducción en las ramificaciones por célula (**Figura 35B**). Sin embargo, cuando se analizó el máximo orden de ramificaciones, es decir, no se encontraron diferencias entre los tratamientos (**Figura 35C**).



**Figura 35 | Caracterización de la morfología oligodendrocítica relacionada con las ramificaciones de los procesos celulares.**

Medición de los parámetros relacionados con las ramificaciones de los procesos oligodendrocíticos en ratones P56 de los cuatro grupos utilizados en el paradigma de malnutrición con posterior enriquecimiento ambiental. **A**, Cantidad de puntas por célula. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,31} = 1,89$ ;  $p = 0,1799$ ), el ambiente ( $F_{1,31} = 0,32$ ;  $p = 0,5783$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,31} = 3,78$ ;  $p = 0,0611$ ). **B**, Cantidad de bifurcaciones por célula. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,31} = 1,22$ ;  $p = 0,2773$ ), el ambiente ( $F_{1,31} = 0,33$ ;  $p = 0,5688$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,31} = 3,49$ ;  $p = 0,0711$ ). **C**, Orden de bifurcación máximo. ANOVA de dos factores para la dieta ( $F_{1,31} = 0,84$ ;  $p = 0,3651$ ), el ambiente ( $F_{1,31} = 0,01$ ;  $p = 0,9881$ ) e interacción para la dieta con el ambiente ( $F_{1,31} = 1,14$ ;  $p = 0,2930$ ). El análisis *post hoc* de Bonferroni indicó que las diferencias que se marcan en los gráficos resultaron significativas. Los valores están expresados como promedios  $\pm$  SEM ( $n = 4-6$ ). \*  $p < 0,05$ .

En resumen y tomando en cuenta todos los resultados obtenidos relacionados con los parámetros morfológicos de los oligodendrocitos, podemos concluir que las diferencias fenotípicas en cuanto a la morfología de estas células gliales entre ratones malnutridos y normales, se evidencia sólo cuando los mismos son sometidos a un ambiente enriquecido postdestete. La imagen final que sugieren los datos acerca de la morfología

oligodendrocítica en ratones HP-EE es: un árbol de procesos menos complejo por la disminución en las ramificaciones y en la longitud total de procesos, pero una mayor eficiencia de mielinización debido a que la cantidad de internodos por célula resulta similar en todos los tratamientos y a que la longitud promedio de los internodos es mayor que en ratones NP-EE.

Si bien estos resultados no explican las diferencias entre ratones malnutridos perinatalmente y los alimentados con una dieta normal, sí podrían constituir una de las causas de la reversión observada ante la exposición a un ambiente enriquecido. Sugerentemente, el aumento de la eficiencia en la mielinización está relacionado con la vía celular de orientación axonal debido a la comunicación existente entre las neuronas y los oligodendrocitos. De esta forma, el escenario en el cual los miRNAs participan de esta comunicación resulta una posible explicación de la reversión.

Sumado a los resultados previos sobre la disminución de la mielina en el cíngulum, puede especularse con que las diferencias producidas por la malnutrición temprana generan un efecto en la formación de los caminos axonales que interconectan al hipotálamo con la PFC, sin que se presente un efecto del ambiente para esta característica. La reversión de la conducta de ansiedad y memoria podría estar relacionada, entonces, con el aumento de la eficiencia de mielinización en los ratones malnutridos pero que fueron sometidos a un ambiente enriquecido. Tanto en la formación de las conexiones entre diferentes regiones del cerebro como en el aumento de la eficiencia de los oligodendrocitos, los patrones de expresión de miRNAs podrían tener un rol importante, siendo que correlacionan con los fenotipos conductuales observados.

## 4. Discusión y Conclusiones

### 4.1. Complejidad del modelo de malnutrición

La malnutrición es una condición que afecta, aún, a una gran proporción de la población mundial. Las investigaciones tendientes a estudiar los efectos de la malnutrición en humanos son complejas debido a la inevitable presencia de otros factores ambientales, como las enfermedades y la privación social, intelectual y física. Es decir, la gente que sufre de malnutrición durante alguna etapa de su vida suele ser la que también tiene que soportar una educación pobre, malas condiciones de vivienda y adversidades ambientales. En este sentido, resulta prácticamente imposible detectar poblaciones “controles” para comparar.

Por su parte, los trabajos con animales de laboratorio tampoco están exentos de estas complejidades y suelen presentarse numerosas limitaciones cuando se diseñan los experimentos. Es importante destacar que los resultados sobre los cambios fenotípicos medidos (principalmente, la expresión génica y la conducta) en ratones a P21 y P56 reflejan los efectos acumulativos de todas las experiencias de vida. Es decir, todo lo que el animal vivió hasta ese momento podría alterar el fenotipo y, consecuentemente, algunas de estas alteraciones podrían interactuar con variables que no pueden controlarse, aún en las condiciones de cuidado de un bioterio. Esta falta de control de variables se hace aún más evidente en un paradigma experimental que dura aproximadamente 3 meses, y en el que se sabe que hay variables que interactúan (por ejemplo, la ya mencionada relación entre el estrés materno y el cuidado que se dispensa a las crías). Por último, los organismos tienen cierto grado de variabilidad individual y que no se explica por los tratamientos que se aplican experimentalmente (Bateson, 2015).

#### 4.1.1. *Respuestas fenotípicas adaptativas*

Algunos autores ya han sugerido que deberíamos “sacar a las ratas del laboratorio” para estudiar la plasticidad del desarrollo en un contexto más natural para los animales (Macrì and Würbel, 2006). El 90% de los estudios en animales han sido realizados en 2 especies, rata y ratón, de las cuales no se conoce prácticamente nada de su conducta ecológica.

Es posible demostrar que una variable o dimensión de un fenotipo está respondiendo “plásticamente”. Lo que resulta imposible es clasificar a una variable como “no plástica”, porque, para eso, habría que evaluar todos las claves ambientes posibles que

puedan modificarla en todas las ventanas temporales del desarrollo (Pigliucci, 2001; West-Eberhard, 2003). En experimentos de laboratorio se intenta evaluar una variable fenotípica controlando la variabilidad ambiental para generar datos menos “ruidosos” a nivel estadístico. Sin embargo, quitar variables ambientales puede resultar en un reduccionismo que se aleje fuertemente del verdadero proceso biológico que se estudia.

Un caso paradigmático de este concepto lo constituye un estudio longitudinal realizado en persons con diversos grados de depresión en el que se evaluó la relación entre la presencia de este desorden neurológico y la variante genética para el gen del transportador de serotonina (5-HTT) (Caspi et al., 2003). Las evidencias experimentales en modelos animales predecían que tener la versión corta de este gen resultaría en una mayor incidencia de depresión. Sin embargo, los resultados mostraron que la incidencia de depresión según el genotipo dependía del ambiente durante la vida temprana. Los individuos que no presentaron ningún evento estresante durante los primeros años de vida (por ejemplo, pérdida de un familiar, divorcio, abuso) no mostraban diferencias en cuanto a la incidencia de depresión según la variante del gen de 5-HTT. Sin embargo, esta diferencia se evidenciaba y se hacía cada vez más marcada a medida que aumentaban los eventos estresantes durante la niñez. Este estudio constituye un claro ejemplo de interacción entre genes y ambiente (“ $G \times E$ ”). En este trabajo, pudo verse una situación análoga, pero con los niveles de expresión de miRNAs de ratones NP y HP en diferentes ambientes postnatales (Figura 25 y Figura 26). Por esta razón, los parámetros fenotípicos son más informativos si se los evalúa a lo largo de un gradiente de variabilidad ambiental.

#### 4.1.2. Variabilidad en los resultados relacionados con el funcionamiento del eje HPA

Debido a su estrecha relación, la variabilidad entre el estrés prenatal y el funcionamiento del eje HPA en respuesta al estrés es extremadamente alta entre los individuos de la descendencia. Esto además se debe a la complejidad de los modelos de estrés perinatal en los que, aun intentando controlar la mayor cantidad de variables posibles, los factores que intervienen en la plasticidad del desarrollo son inmanejables. Un claro ejemplo de este concepto es que la malnutrición aplicada a las madres en el presente trabajo covaría con el cuidado materno, por lo que los efectos de estos dos factores son indisolubles. Y se ha visto que los distintos factores de estrés activan distintas vías de procesamiento, las cuales, a su vez, son afectadas de manera particular por cada estímulo ambiental (Andrews and Matthews, 2004; Herman et al., 1996; Palkovits et al., 1999).

## 4.2. Cambios fenotípicos durante el desarrollo inducidos por la malnutrición perinatal

### 4.2.1. *Peso corporal*

Las curvas de peso corporal de los ratones NP y HP durante la lactancia muestran una separación a partir de P9 en los machos y P7 en las hembras. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los pesos al momento del nacimiento.

Mientras el peso corporal al nacimiento puede estar afectado por el ambiente prenatal, parece ser un efecto lateral del desarrollo de una respuesta adaptativa a la malnutrición materna y no siempre correlaciona con el resto de las características fenotípicas que se moldean ante dicha adversidad prenatal. En este sentido, se mostró que, en humanos, la inducción de efectos generados por una nutrición materna desbalanceada en la estructura cardiovascular no estaba acompañada de una alteración del peso al nacer (Gale et al., 2006). Otro estudio demostró que ciertas modificaciones epigenéticas en el DNA de niños recién nacidos están asociadas a cambios en la nutrición materna durante el primer trimestre de gestación. Pero estas modificaciones no correlacionaron con el peso corporal de esos niños al nacer (Bateson et al., 2014; Godfrey et al., 2011). Un efecto similar se observa en los hijos del invierno Holandés de 1944 – 1945, en los cuales se vio una alteración del metabolismo de glucosa e insulina que no correlaciona con el peso al nacer (Barker, 1998; Hoet and Hanson, 1999). Por lo tanto, el metabolismo, la epigenética o alguna otra característica fenotípica pueden reprogramarse durante la etapa prenatal, sin alterar el peso corporal al nacimiento.

### 4.2.2. *Desarrollo físico y neurológico*

Además de las diferencias en el tamaño corporal, tanto los machos como las hembras HP presentaron un retraso en el desarrollo de diversas características del desarrollo físico, tales como la aparición del pelo ventral y la apertura de ojos. La aparición de pelo dorsal sólo se vio retrasada en las hembras del grupo HP, mientras que la apertura del canal auditivo, sólo en machos HP. Estas observaciones sugieren la existencia de un retraso general en el desarrollo epitelial y en la maduración de los sistemas visual y auditivo (Belluscio et al., 2014).

El desarrollo neurológico también se vio afectado por la malnutrición proteica perinatal. Las crías de las madres HP mostraron un retraso en la ejecución del reflejo de

enderezamiento en la superficie, la cual está comandada por la función cerebelar. El cerebelo es fundamental para el ajuste postural necesario para mantener el balance (Secher et al., 2006), y está también relacionado con el desarrollo del sistema auditivo. Por lo tanto, como los reflejos perinatales pueden ser considerados como un índice de maduración del cerebelo, los resultados obtenidos sugieren que la exposición perinatal a la malnutrición afecta los mecanismos embrionarios responsables del correcto desarrollo del mismo. Además, las hembras HP mostraron un retraso más pronunciado que los machos HP, constituyendo otra diferencia sexual en el efecto del estrés temprano (ver Discusión 4.3).

#### 4.2.3. *Peso del cerebro y del hipocampo*

El peso del cerebro resultó ser significativamente menor en los ratones HP respecto de los NP en los machos y no en las hembras. Sin embargo, el peso de los hipocampos se redujo en ambos sexos a la edad de P21. Cuando se estudió el cociente entre el peso de los hipocampos relativo al peso del cerebro total, el mismo resultó ser significativamente menor para los ratones HP que para los NP, tanto en machos como en hembras.

El tamaño y peso del hipocampo ha merecido marcada atención en la literatura, particularmente, en su relación con el estrés ambiental durante la formación de esta estructura. En parte, esto se debe a que los glucocorticoides son capaces de degenerar neuronas piramidales del hipocampo de forma dosis dependiente. La disminución del tamaño del hipocampo se vio en primates, luego de la inyección de glucocorticoides sintéticos durante la gestación tardía. Esta disminución del volumen del hipocampo se mantuvo hasta la adultez. Por otro lado, otro estudio asoció la malnutrición prenatal con cambios morfológicos en las células piramidales de la región CA3 del hipocampo, observando un menor tamaño del soma, menor longitud de las dendritas apicales y de la densidad de espinas (Díaz-Cintra et al., 1994). Dado el rol central del hipocampo en la regulación del eje HPA, es probable que estos cambios estructurales ante el estrés tengan profundas influencias sobre la función del eje HPA a lo largo de la vida. De hecho, ha sido demostrado que la reducción en el volumen del hipocampo en pacientes que sufren desórdenes psiquiátricos (Geuze et al., 2005) podría ser una consecuencia de los efectos neurotóxicos del estrés, aumentando la vulnerabilidad a déficits cognitivos y emocionales (Figueiredo et al., 2016; Gilbertson et al., 2002).

### 4.3. Hormonas sexuales y dimorfismo sexual

La “hipótesis organizacional del desarrollo del cerebro” sugiere que las hormonas gonadales o sexuales organizan el cerebro de una forma sexualmente dimórfica durante el periodo crítico perinatal. Luego, en la adultez, estas hormonas gonadales pueden activar estos circuitos neuronales previamente “organizados” para expresar los fenotipos conductuales correspondientes a cada sexo, incluida la respuesta a estrés a través del eje HPA (Bingham and Viau, 2008; Morgan and Bale, 2011; Seale et al., 2005). El estrés perinatal, entonces, puede afectar la trayectoria de este desarrollo organizacional durante los periodos sensibles a las adversidades ambientales.

En particular, se demostró que distintos tipos de estrés materno inhiben la normal aparición de testosterona en machos y reduce la actividad de la enzima aromatasa, encargada de metabolizar la testosterona en su producto activo, el estradiol. Estas perturbaciones “feminizan” el cerebro del macho, modificando la morfología y afectando la actividad de neurotransmisores (Weinstock, 2007).

Es importante destacar que, si bien en los experimentos de este trabajo que involucraron crías o ratones al destete se utilizaron machos y hembras, en los experimentos con ratones jóvenes-adultos a P56 en los que se incluía el EE, el aumento en la cantidad de ratones debido a este tratamiento nos imposibilitó trabajar con ambos sexos. Por lo tanto, elegimos a los machos por 3 principales razones: 1) presentaron mayores diferencias en el desarrollo físico durante la lactancia, 2) hipotetizamos que la regulación hormonal de las hembras podría agregar más variabilidad que la de los machos, y 3) existe más literatura disponible en cuanto a los efectos del estrés perinatal en machos en modelos de roedores.

#### 4.3.1. Distancia ano-genital (DAG)

En este trabajo se observó una disminución de la DAG en machos a P14 y en hembras a P21, lo cual resulta consistente con resultados previamente reportados (Barrett and Swan, 2015; Gerardin et al., 2005; Rodriguez et al., 2007; Sarkar et al., 2007; Weinstock, 2011). La disminución observada en la DAG podría deberse a una disminución de la testosterona circulante durante el periodo gestacional debida al estrés nutricional materno. Esto sugeriría una desregulación del sistema de hormonas sexuales que, o bien podría estar relacionado con una concomitante desregulación del eje HPA, o bien tener causas más directas, como ser, modificaciones epigenéticas de los factores responsables del correcto funcionamiento del sistema.

Recientemente, se ha mostrado que las hormonas gonadales organizacionales para el establecimiento de un fenotipo sexual tienen un impacto en la expresión de miRNAs durante el periodo perinatal (Morgan and Bale, 2011). Previamente, ya se había relacionado a los mecanismos epigenéticos con el estado de las hormonas gonadales y con la diferenciación sexual del cerebro (Auger et al., 2011; McCarthy et al., 2009). Por lo tanto, los miRNAs aparecen como nuevos actores que pueden interactuar para programar el sistema de hormonas sexuales durante el desarrollo del cerebro (Morgan and Bale, 2011). Estas observaciones podrían explicar el dimorfismo sexual observado en la expresión de los componentes de la maquinaria de biogénesis de miRNAs (ver Discusión 4.5). La expresión de *Xpo5* resultó estar aumentada en el hipocampo y en el hipotálamo de los machos HP, mientras que, en las hembras, sólo aumentó en el hipocampo. En cuanto a la expresión de *Ago2*, la misma presentó un mayor dimorfismo sexual: mientras que en el hipocampo y en el hipotálamo de los machos HP resultó estar disminuida, en las hembras HP no se encontraron cambios en el hipocampo y el hipotálamo presentó un aumento de la expresión.

#### 4.3.2. *Eje HPA*

Si bien en este trabajo no se midieron directamente los factores que participan del eje HPA, los mismos pueden explicar algunas diferencias observadas entre machos y hembras, tanto en las características morfológicas y neurológicas evaluadas, como en las mediciones de la expresión génica.

Ha sido demostrado que el eje HPA es más susceptible a la programación por estrés perinatal en las hembras que en los machos (Andrews and Matthews, 2004). Esto puede deberse, en parte, a que los glucocorticoides maternos, aumentados por estrés, atraviesan la placenta más fácilmente en las hembras respecto de los machos (Andrews and Matthews, 2004; Montano et al., 1993). Las evidencias sugieren que existen diferencias entre sexos en la vulnerabilidad o sensibilidad a los efectos del estrés prenatal y que hay asociaciones entre el estrés y la actividad de las hormonas gonadales, tanto durante la gestación como la vida postnatal de los individuos (Barrett and Swan, 2015; Lim et al., 2014; Piccinelli and Wilkinson, 2000).

#### 4.4. Reversión fenotípica del comportamiento

##### 4.4.1. *Ansiedad y regulación del estrés*

Cuando se evaluó la ansiedad de ratones HP en los tests de caja de luz-oscuridad (CLO) y laberinto elevado en cruz (LEC), se encontró un aumento de la ansiedad respecto de los NP. Esto es consistente con los estudios que, en general, evalúan la ansiedad ante un estrés perinatal. De todos modos, la forma en que este comportamiento es alterado depende del momento en el cual las madres son sujetas a un estrés durante la preñez, la naturaleza del estrés, la especie en estudio y la edad de testeo de las crías (Glover and Hill, 2012).

En el test del LEC, se observó una menor motivación exploratoria general, y un mayor nivel de comportamiento de tipo ansioso en el grupo HP, reflejado en una menor distancia recorrida en los brazos abiertos del laberinto. El test de la CLO, mostró también un aumento de la ansiedad en ratones HP, evidenciado por una mayor permanencia en la zona oscura.

Una de las primeras explicaciones que surge para estas observaciones relacionadas con alteraciones en el comportamiento ansioso radica en una desregulación del eje HPA, programado diferencialmente en los ratones HP durante el período de estrés nutritivo perinatal (Lesage et al., 2006; Schäffer et al., 2009). Estos estudios sugieren que la programación durante el desarrollo del eje HPA en ratones malnutridos perinatalmente puede resultar en un defecto persistente en la retroalimentación del eje, que conduce a la expresión de comportamientos diferentes. Se ha encontrado también un aumento en los niveles basales de corticosterona en ratas adultas cuyas madres fueron malnutridas (Reyes-Castro et al., 2012). Otras explicaciones podrían incluir cambios estructurales y neuroquímicos en ciertas zonas del cerebro, como el sistema GABAérgico hipocampal, que han sido asociados con comportamientos de tipo ansioso (Pereira-da-Silva et al., 2009).

La reversión fenotípica, a través de un ambiente enriquecido (EE), de las conductas relacionadas con la programación del eje HPA por un estrés perinatal, ha sido ampliamente estudiada y revisada en diferentes contextos y zonas cerebrales (Fox et al., 2006; Hirase and Shinohara, 2014; van Praag et al., 2000). Sin embargo, hasta el presente trabajo, no hay evidencias acerca de la reversión en el fenotipo ansioso de ratones malnutridos de manera hipoproteica durante la preñez y la lactancia.

Si bien el mecanismo fisiológico por el cual el EE genera la reversión fenotípica observada no ha sido estudiado en este trabajo, se sugiere que los miRNAs podrían estar

involucrados en este proceso, lo cual se discutirá en otra sección (ver Discusión 4.5.3). De todos modos, a otro nivel de análisis, ha sido sugerido que el EE podría representar un mecanismo de “inoculación de estrés”. La introducción repetida de objetos novedosos al ambiente y la oportunidad de explorarlos podría ser comparable con una exposición a un estrés moderado (Larsson et al., 2002). De hecho, algunos estudios mostraron que, en lugar de bajar, aumentan levemente los niveles basales de corticosterona en sangre (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Moncek et al., 2004). Si bien este aumento podría deberse al mayor ejercicio físico realizado por los animales en el EE, las exposiciones repetidas a un estrés moderado pueden generar mayor estabilidad emocional (Chorpita and Barlow, 1998). La “inoculación de estrés” por EE podría explicar sus efectos ansiolíticos y ha sido demostrado que podría también explicar el aumento de la excitabilidad y exploración ante un estímulo novedoso (Fox et al., 2006; Larsson et al., 2002). Esta última observación es consistente con el aumento de la locomoción observado en ratones NP-EE y HP-EE, tanto en el test de la CLO como en el LEC.

Uno de los descubrimientos revolucionarios en el estudio de los efectos del EE fue el aumento de la neurogénesis hipocampal mediada por este tratamiento ambiental en animales jóvenes-adultos (Kempermann et al., 1997). Esto tiene implicancias directas en la mejora de la memoria, lo cual se discutirá en la siguiente sección (ver Discusión 4.4.2). Sin embargo, una consecuencia indirecta de esta neurogénesis hipocampal es su potencial efecto en la ansiedad, debido a que el hipocampo, junto con el resto del sistema límbico, está implicado en la regulación de la respuesta a estrés (LeDoux, 1992). Es posible que el nacimiento de nuevas neuronas en el hipocampo impacte en el procesamiento de emociones y de la respuesta a estrés a través de los circuitos interconectados que relacionan a la amígdala y el hipotálamo, respectivamente (Fox et al., 2006).

Otro estudio mostró que las neuronas del hipotálamo sufren cambios en respuesta al EE. Particularmente, el EE genera un aumento de andrógenos que puede ser sentido por sus receptores hipotalámicos. Los sistemas endócrinos de las hormonas sexuales y el eje HPA están interconectados en el hipotálamo, y se ha visto que las hormonas esteroideas modulan la neuroplasticidad (Cooke and Woolley, 2005; McEwen et al., 1991; Mong and McCarthy, 1999). Este estudio resulta interesante a la luz de los resultados del presente trabajo, debido a la disminución de la DAG observada en machos y hembras (ver Discusión 4.3.1), la cual puede estar asociada, en machos, a una disminución del nivel de andrógenos producto del estrés nutricional, que genera un fenotipo feminizante (Mitra and Sapolsky, 2012).

#### 4.4.2. Memoria

Los distintos tipos de memoria fueron evaluados en este trabajo a través de los paradigmas del laberinto en “Y” con claves espaciales (LY), reconocimiento de un objeto novedoso (RON), y aversión condicionada al gusto (ACG). El LY fue utilizado para evaluar la memoria a corto plazo; el RON, la memoria a largo plazo; y la ACG, un tipo de memoria aversiva.

El test del LY no mostró diferencias en la memoria a corto plazo entre los ratones NP-NE y HP-NE, por lo que la malnutrición perinatal pareciera no ejercer ningún efecto sobre este tipo de memoria. Sin embargo, cuando los ratones fueron sometidos al EE se observó una diferencia significativa en la permanencia en el brazo novedoso del laberinto entre los grupos NP-EE y HP-EE. Como se discutió previamente (ver Discusión 4.1.1), es posible que el ambiente enriquecido postdestete evidencie diferencias fenotípicas conductuales entre ratones NP y HP que no se ven en un ambiente normal. Nuevamente, para concluir sobre un fenotipo suele ser importante la variabilidad ambiental.

Cuando se evaluó la memoria a largo plazo (es decir, a 24 horas luego del entrenamiento) con el test de RON, los ratones HP-NE presentaron una memoria disminuida respecto de los NP-NE. Numerosos estudios ya han demostrado los efectos de la malnutrición perinatal sobre la memoria en humanos (Galler et al., 1987; Walker et al., 2005) y roedores (Barnes et al., 1966; Castro et al., 1989; Jordan et al., 1981; Tonkiss and Galler, 1990). Sin embargo, existen algunas controversias en cuanto a estos efectos adversos (Campbell and Bedi, 1989; Tonkiss et al., 1994). Por ejemplo, en los adultos expuestos a la hambruna holandesa prenatalmente no se registraron defectos en las habilidades para el aprendizaje (de Groot et al., 2011; Stein et al., 1972). Los resultados contrapuestos podrían explicarse teniendo en cuenta las diferencias en los paradigmas de malnutrición utilizados (Laus et al., 2011). Pero, más importante, los estudios para evaluar la capacidad cognitiva son difícilmente dissociables de los componentes estresantes de las pruebas utilizadas. Por lo tanto, la ansiedad producida por la malnutrición podría constituir un factor que dificulta la interpretación de los resultados sobre la memoria. Aún así, otros estudios han mostrado que la malnutrición perinatal genera un número disminuido de neuronas, espinas y sinapsis en el hipocampo, región fundamental para la formación de memorias (Barker and Warburton, 2011; Pérez-García et al., 2016).

La memoria a largo plazo evaluada mediante el RON pudo ser revertida por la estimulación con un EE durante 5 semanas luego del destete. Como ya se mencionó en la

sección anterior (ver Discusión 4.4.1), ha sido descrito que el EE aumenta la neurogénesis hipocampal (Kempermann et al., 1997), y que este aumento puede ser la causa del mejoramiento cognitivo por EE. Conjuntamente, el EE modifica otros factores involucrados en la neuroplasticidad. Se demostró que el EE aumenta el peso total del cerebro y de la corteza (Henderson, 1970; Rosenzweig and Bennett, 1972), junto con un incremento de la densidad neuronal (Kempermann et al., 1997), el número de ramificaciones dendríticas (Greenough et al., 1973), de sinapsis (Turner and Greenough, 1985) y de niveles de factores neurotróficos (Ickes et al., 2000; Pham et al., 1999). Todos o algunos de estos efectos podrían inducir cambios que expliquen la reversión fenotípica del EE en cuanto a la memoria (Fox et al., 2006).

La memoria aversiva, evaluada a través de la ACG, no mostró diferencias entre los ratones NP y HP a P56. Sin embargo, esto podría deberse a la interacción entre el estrés y la anhedonia, es decir, la pérdida de interés ante estímulos usualmente placenteros. Ha sido demostrado que un paradigma de estrés crónico moderado en ratas causa una disminución en el consumo de sacarosa (anhedonia) (Zurawek et al., 2016).

#### 4.5. Rol de los microRNAs

Como se mencionó previamente (ver Introducción 1.4.4), los miRNAs cumplen un rol fundamental en la interacción entre la plasticidad fenotípica y los estímulos ambientales. Además, se ha demostrado que tanto el proceso de neurogénesis como el de muerte celular están modulados por miRNAs (Sabirzhanov et al., 2016; Shi et al., 2010). Además, numerosos estudios han remarcado el rol central de los miRNAs y, en particular, de las proteínas responsables de su biogénesis, en la regulación de la expresión génica dependiente de la actividad neuronal (Ashraf et al., 2006; Banerjee et al., 2009; Lugli et al., 2005), controlando procesos adaptativos, como el mantenimiento de espinas dendríticas y la plasticidad sináptica (Schouten et al., 2013).

Por lo tanto, la desregulación de la expresión de los componentes de la biogénesis de miRNAs, generada por la malnutrición perinatal, y su concomitante aumento generalizado de miRNAs en el hipocampo y en el hipotálamo, podría afectar estos y otros procesos celulares relacionados con la neuroplasticidad.

Es importante aclarar en este punto que las mediciones de expresión génica de los componentes de la biogénesis de miRNAs se realizaron en ratones NP y HP de 3 semanas

de edad, es decir, al destete. La idea de elegir esta edad radicó en evaluar el estado general de la biogénesis de miRNAs una vez finalizado el protocolo de malnutrición, es decir, una vez que los eventos críticos del desarrollo que se presentan durante este periodo pudieron haber sido afectados por el estrés nutricional materno.

Muy pocos estudios evaluaron la reversibilidad o la persistencia de los cambios en los patrones de expresión de miRNAs en el cerebro como resultado de un estrés temprano. Uchida *et al.* intentaron contestar esta pregunta mostrando que la separación materna, y su concomitante reprogramación del eje HPA, afecta la expresión de miRNAs relacionados con la neuroplasticidad en adultos (Uchida *et al.*, 2010). En este estudio, miR-132-3p, miR-124-3p, miR-9-5p y miR-29a-3p mostraron una expresión aumentada en la PFC de ratas a P14 expuestas al estrés temprano. Cuando estas ratas alcanzaron la adultez (P60), los niveles de expresión de miR-132 y miR-124 continuaban aumentados respecto de las ratas no expuestas al estrés, lo cual sugiere que este aumento de ambos miRNAs es parte de los cambios epigenéticos persistentes inducidos por una adversidad temprana en la neuroplasticidad de la PFC (Schouten *et al.*, 2013).

#### 4.5.1. Efecto de la desregulación de la maquinaria de biogénesis de miRNAs

El funcionamiento óptimo del hipocampo y del hipotálamo es crucial para la modulación del eje HPA y la respuesta a estrés. En este sentido, las alteraciones en la expresión de Xpo5 y Ago2 en estas regiones del cerebro de los ratones HP podrían estar afectando estos procesos. Los niveles de expresión de un mRNA no siempre tienen un correlato directo con los niveles proteicos del gen en estudio. Por esta razón, se decidió evaluar una potencial consecuencia del aumento de Xpo5, es decir, la disponibilidad de miRNAs maduros, de forma tal que, para que el aumento generalizado de miRNAs ocurra, la proteína Xpo5 también debería estar aumentada. Este razonamiento es posible debido a que se demostró que Xpo5 constituye un paso limitante en la biogénesis de miRNAs (Grimm *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2005). Además, otros estudios han mostrado que el silenciamiento de la expresión de Xpo5 resulta en una reducción global de miRNAs, sin una acumulación de los pre-miRNA nucleares, lo cual sugiere que Xpo5, además de exportar los precursores, también los protege de los ataques nucleolíticos en el núcleo (Ha and Kim, 2014; Yi *et al.*, 2003).

Los resultados mostraron que el aumento en la expresión de Xpo5 parece tener un rol funcional en cuanto a la disponibilidad de miRNAs. Dos evidencias experimentales sugieren esta declaración. Primero, se encontró una correlación directa entre el nivel de

inducción del mRNA de Xpo5 y el número de miRNAs maduros cuyos niveles aumentaron en el hipocampo y en el hipotálamo de los ratones malnutridos. Segundo, no se encontraron cambios en los niveles de miRNAs en las regiones en donde Xpo5 no resultó inducida, es decir, en el hipotálamo de las hembras, sugiriendo una relación causal entre el aumento de la expresión de Xpo5 y el aumento generalizado de miRNAs maduros. Estas dos observaciones muestran un rol biológico importante de la desregulación de Xpo5, generada por la malnutrición perinatal.

Por otro lado, la alteración en la expresión de Ago2 es más difícil de interpretar, en parte, por la inconsistencia entre tejidos y sexos y, además, porque no podría establecerse una relación directa entre el nivel de expresión de miRNAs maduros y los niveles de expresión de esta proteína. Sin embargo, la alteración en la expresión de Ago2 observada en el hipocampo y en el hipotálamo de ratones HP sugiere que la funcionalidad de ciertos miRNAs podría verse afectada, dado que Ago2 es el efector de la vía de silenciamiento por RNAs pequeños.

En base a lo discutido acerca de la expresión de Xpo5 y Ago2, los resultados sugieren que la disponibilidad de miRNAs en el citoplasma, debido a la inducción de Xpo5, y su funcionalidad, debido a la alteración en la expresión de Ago2, están comprometidas en los ratones sometidos a una dieta materna hipoproteica.

Notablemente, los cambios en la expresión de los componentes de la biogénesis de miRNAs debidos a la malnutrición materna resultó diferente entre sexos. Si bien los orígenes de estas diferencias son difíciles de explicar (ver Discusión 4.3), sus consecuencias pueden estar relacionadas con la susceptibilidad diferencial a los déficits emocionales generados por las adversidades tempranas entre machos y hembras ([Bale and Epperson, 2015](#); [Gomez and Luine, 2014](#)).

Por último, el aumento generalizado de miRNAs ya ha sido descrito en otros modelos de estrés ([Mannironi et al., 2013](#); [Zurawek et al., 2016](#)). Y esto podría deberse a una desregulación de la maquinaria de biogénesis.

#### 4.5.2. *miRNAs desregulados por la malnutrición perinatal*

Los miRNAs desregulados al destete constituyen la base de las diferencias que generó la deficiencia proteica en este paradigma de malnutrición materna. A partir del destete, tanto los ratones NP como HP son criados con comida normal, por lo que los efectos observados a edades más avanzadas deberían estar basados en la programación ya experimentada hasta la edad de P21.

Otra salvedad que cabe hacer en este punto es que, si bien pueden analizarse los potenciales efectos de los miRNAs de forma individual, en base a los estudios realizados y predicción bioinformáticas de mRNAs blanco, el efecto de los miRNAs es generalmente global y es necesario estudiar su patrón de expresión. Sin embargo, describiremos las principales funciones de algunos de los miRNAs desregulados en este modelo y que tienen relación con la regulación del estrés y otros sistemas endócrinos, los estímulos ambientales, la cognición y el metabolismo.

Uno de los miRNAs cuya expresión se vio alterada tanto en el hipocampo como en el hipotálamo de ratones HP es miR-135a-5p. Este miRNA está involucrado en enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer (Ko et al., 2014; Liu et al., 2014) y Parkinson (Liu et al., 2016), así como también en procesos de aprendizaje (Chu et al., 2015). Notablemente, uno de los efectos de la sobreexpresión de miR-135a-5p en el cerebro en desarrollo es la reducción de los primordios hipocampales (Caronia-Brown et al., 2016), resultado consistente con la disminución del hipocampo en ratones HP a P21. También se mostró que miR-135a-5p es inducido por andrógenos (Wan et al., 2016) y regula negativamente al receptor de andrógenos constituyendo un ciclo de retroalimentación negativa (Coarfa et al., 2015). El aumento en la expresión de miR-135a-5p en los machos HP a P21 podría estar explicado, en parte, por esta regulación por andrógenos, que, como se dijo previamente (ver Discusión 4.3.1) podrían encontrarse aumentados ante el estrés nutricional perinatal. Del mismo modo, y teniendo en cuenta la participación de miR-135a-5p en la regulación de la respuesta a estrés por unión a MR (Söber et al., 2010), la reducción de este miRNA en ratones HP a P56 puede estar explicada por el balance dinámico de ambos factores interconectados (regulación por andrógenos y balance entre GR y MR para lidiar con el estrés) (Mannironi et al., 2013). Por último, miR-135a-5p mostró estar asociado a la resiliencia a la depresión luego de un paradigma de estrés moderado crónico (Zurawek et al., 2016).

En este punto, cabe destacar el aumento en miR-124-3p en el hipocampo de ratones HP a P21. Este miRNA, al igual que miR-135a-5p, también está involucrado en la respuesta a estrés, por regulación de MR y GR en el hipocampo y la amígdala (Mannironi et al., 2013; Vreugdenhil et al., 2009). Este aumento en la expresión de miR-124-3p en el grupo HP no persiste hasta P56, luego de que los ratones son destetados y alimentados con comida normal. Este tipo de regulaciones temporales es usual en los complejos patrones de expresión de miRNAs de mamíferos, y podría especularse que el efecto de miR-124-3p sobre la respuesta a estrés a P21 programa otros factores del eje HPA o ciertos patrones de

expresión genética o epigenética que luego se mantienen sin necesidad de que persista el aumento de este miRNA.

Dos miRNAs que se encontraron inducidos en el hipocampo de machos y hembras HP al destete, miR-124-3p y miR-26a-5p, han sido reportados como interactores de los mRNA que codifican para ciertas proteínas miembro de las familias Gst (glutación-S-transferasa) y Txn (tioredoxina), respectivamente, enzimas que pertenecen al sistema antioxidante del cerebro (Chi et al., 2009; Yu et al., 2008). Los miRNAs son capaces de modular la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y la expresión de dichos genes de defensa a antioxidantes. Además, el estrés redox puede alterar la biogénesis de miRNAs (Cheng et al., 2013). En este sentido, las proteínas de la dieta son importantes para los mecanismos antioxidantes y ha sido demostrado que la malnutrición proteica puede producir un aumento en el daño oxidativo a través de la disminución de las defensas antioxidantes de los tejidos (Bonatto et al., 2005). Por lo tanto, la deficiencia proteica y la desregulación de la biogénesis de miRNAs podrían resultar en un aumento de la formación de ROS y aumentar así la vulnerabilidad al daño cerebral. Por otra parte, en cultivos astrogiales primarios de rata, se demostró que miR-187-3p es regulado por la ausencia de la hemoxigenasa-1 (HO-1). Bajo condiciones de estrés oxidativo, la inducción de HO-1 protege a las células aumentando el catabolismo del hemo pro-oxidante y hemoproteínas a quelantes de radicales libres, como la bilirrubina (Barañano and Snyder, 2001; Dore et al., 1999). La predicción bioinformática mostró que miR-187-3p está extensamente involucrado en el estrés oxidativo, el malfuncionamiento mitocondrial y la macroautofagia, procesos que caracterizan enfermedades neurodegenerativas (Lin et al., 2015).

Además, se ha reportado una disminución de miR-26a-5p y miR-124-3p ante la estimulación para generar LTP en la zona CA1 del hipocampo en cortes de rata. Particularmente, la disminución en miR-26a-5p es necesaria para el mantenimiento de la LTP y para el crecimiento de espinas dendríticas (Gu et al., 2015). El aumento observado en este trabajo en la expresión de estos miRNAs sugiere una desregulación de la neuroplasticidad asociada a la LTP. Por otro lado, ha sido reportado que miR-26a-5p regula la expresión de genes relacionados con desórdenes neurodegenerativos en humanos (Saba et al., 2014).

En otro estudio realizado en ratas, la expresión de miR-26a-5p y miR-103-3p resultó alterada ante el consumo de alcohol durante la adolescencia. Si bien este tratamiento no modificó los niveles de testosterona en sangre, el consumo de alcohol puede significar

una situación de estrés ambiental. De hecho, se han encontrado alteraciones en la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés ante este paradigma de consumo de alcohol (Allen et al., 2011; Prins et al., 2014; Przybycien-Szymanska et al., 2011). Otros autores predijeron bioinformáticamente que tanto miR-26a-5p como miR-103-3p tienen como mRNAs blanco a BDNF y a SIRT1, ambas proteínas involucradas en procesos de neuroplasticidad (Prins et al., 2014). La interacción entre miR-26a-5p y el mRNA de BDNF fue demostrada experimentalmente (Caputo et al., 2011). Particularmente, se sugirió que SIRT1, como modificadora de la cromatina, podría ser en parte responsable de las marcas epigenéticas que se programan durante el desarrollo y que perduran durante la vida adulta (Gao et al., 2010; Prins et al., 2014).

Por su parte, miR-103-3p se vio alterado en enfermedades neurodegenerativas, particularmente, Alzheimer (Finnerty et al., 2010). Otro miRNA desregulado en ratones HP, miR-187-3p, también ha sido descrito como regulador de la secreción de insulina e involucrado en la progresión de la diabetes de tipo 2 (Locke et al., 2014), lo cual puede sugerir programaciones perinatales debidas a la malnutrición proteica materna.

Tanto miR-124-3p como miR-9-5p están altamente expresados en el cerebro en desarrollo y en el cerebro adulto, y están conservados entre muchas especies, sugiriendo un rol fundamental. Ambos miRNAs han sido involucrados en procesos de desarrollo del sistema nervioso, como la proliferación, la migración y la diferenciación de linajes neuronales o no neuronales (Gao, 2010; Yuva-Aydemir et al., 2011). A su vez, han sido relacionados con la neuroplasticidad, modulando sinapsis, arborización dendrítica y conectividad neuronal (Giusti et al., 2014; Olde Loohuis et al., 2012; Sun et al., 2010). Estos dos miRNAs regulan la expresión de Rest para permitir la maduración de las células madres neurales (Tyler et al., 2016), por lo que un aumento en su expresión durante el proceso de diferenciación neuronal podría evidenciar una aceleración de la diferenciación en ratones HP. Esta observación podría estar explicada por el sensado de claves ambientales durante el período perinatal que generan respuestas fenotípicas en los ratones HP tendientes a mejorar su adaptabilidad a un ambiente adverso. De todos modos, la regulación del eje miR-9/Rest es compleja y no se conocen completamente sus funciones en neuronas postmitóticas (Giusti et al., 2014).

Mientras miR-124-3p se encontró regulado positivamente en ratones HP tanto en machos como en hembras, miR-9-5p mostró un aumento en su expresión sólo en las hembras. Este resultado resulta interesante para explicar algunas de las diferencias sexuales ya mencionadas (ver Discusión 4.3). Recientemente, se observó que existía un dimorfismo

sexual en cuanto a la respuesta a la exposición prenatal a arsénico. Las hembras mostraron una diferenciación neuronal acelerada respecto de los machos (Tyler et al., 2016), consistente con nuestros resultados que muestran una inducción de miR-9-5p en hembras HP, lo cual podría explicar dicha aceleración.

De los miRNAs desregulados en ratones HP a P21, miR-300-3p y miR-411-5p no presentan bibliografía que respalde una relación con los procesos de interés para este trabajo. Del mismo modo, miR-381-3p, uno de los miRNAs cuya expresión se vio alterada en ratones HP a P56, no parece tener una relación directa con alguno de los procesos celulares de interés para este trabajo. Al igual que muchos miRNAs, los tres últimos mencionados sí han sido involucrados en procesos de progresión tumoral y cáncer. Queda por investigar cuál podría ser la función de miR-300-3p y miR-411-5p en el hipocampo e hipotálamo de ratones malnutridos, siendo que presentaron un patrón de expresión consistente entre tejidos, y de miR-381-3p en el hipotálamo de ratones jóvenes-adultos.

Entre los miRNAs regulados por la malnutrición a P56, pero cuyas diferencias no se ven a P21, se encuentra miR-132-3p. Este miRNA es necesario para la maduración y morfogénesis de neuronas (Wanet et al., 2012) y ha sido involucrado en procesos de neuroplasticidad (Bicker et al., 2014). La regulación transcripcional de miR-132-3p es compleja e involucra numerosos factores (por ejemplo, BDNF) y circuitos de retroalimentación, así como también involucra cambios circadianos (Wanet et al., 2012; Wayman et al., 2008). Por esta razón, los resultados de su expresión son difíciles de interpretar. De todos modos, y consistente con nuestros resultados, se demostró que miR-132-3p es regulado positivamente en el hipotálamo de ratones a los que se los sometió a una restricción calórica. Si bien este paradigma no incluía una dieta perinatal, los efectos en la expresión de este miRNA fueron revertidos con inyecciones de la hormona leptina (Sangiao-Alvarellos et al., 2014), sugiriendo una regulación reversible, al igual que se observa con el EE (ver Discusión 4.5.3). Por otro lado, se ha visto que, en cultivos celulares desprovistos de suero, es decir, ante un estrés nutricional, miR-132-3p se induce e inhibe al remodelador de la cromatina SIRT1 (Strum et al., 2009). Estos resultados, junto con los del presente trabajo, sugieren que miR-132-3p en el contexto de un estrés nutricional es inducido y genera modificaciones epigenéticas reversibles.

Este mecanismo parecería estar regulado por factores diferentes a los que relacionan a miR-132-3p con la neurogénesis hipocampal (Lv et al., 2013; Shaltiel et al., 2013). Sin embargo, otro estudio reciente ha reportado un aumento de miR-132-3p en el hipocampo de ratones sometidos a un paradigma de estrés crónico para inducir depresión.

La expresión de miR-132-3p correlacionó negativamente con la de BDNF, posiblemente, de manera indirecta a través del control de la expresión de MeCP2 (Su et al., 2015). Este resultado recapitula lo observado en nuestro trabajo sobre la disminución de la expresión de BDNF y aumento de miR-132-3p en los ratones HP-NE comparado con los ratones NP-NE. Una función de BDNF que conviene remarcar a la luz de los presentes resultados, es su capacidad de favorecer la remielinización o la reparación de la mielina (KhorshidAhmad et al., 2016). En este contexto, BDNF podría constituir uno de los nexos entre las neuronas y la glia que expliquen nuestros resultados. Para terminar, la idea de que el control de la expresión y/o actividad de BDNF sea controlada por un miRNA desregulado por la malnutrición proteica perinatal resulta intrigante para continuar esta línea de investigación. Particularmente, porque se ha visto, además, que BDNF sufre un importante control epigenético a nivel de su promotor ante situaciones de estrés ambiental (Kundakovic et al., 2015; Roth et al., 2009).

Otro miRNA regulado positivamente por la dieta hipoproteica materna en ratones P56 resultó ser miR-369-3p. El mismo constituye uno de los pocos casos en los cuales su función se ejerce estabilizando los mRNAs blanco y favoreciendo su traducción, en lugar de inhibiéndola (Shobha Vasudevan, Yingchun Tong, 2007). Se ha demostrado que este miRNA estabiliza sus proteínas blanco ante estrés celular. Se vio que la sobreexpresión de miR-369-3p favoreció la inducción de la reprogramación celular a través de modificaciones epigenéticas (Konno et al., 2015). Además, ha sido demostrado que miR-369-3p regula la expresión de N-cadherina, proteína de membrana responsable de la interacción célula-célula, en la corteza durante el desarrollo. De esta forma, miR-369-3p regula la proliferación de células madre, la neurogénesis y la migración neuronal (Rago et al., 2014). Dados los resultados que predicen que la vía de orientación axonal está alterada en ratones HP (ver Discusión 4.6), miR-369-3p surge como un potencial regulador de este proceso.

miR-204-5p resultó negativamente regulado en los ratones HP a P56, sin presentar cambios a P21. Este miRNA tiene como blanco directo a EphB2, conocido regulador de la plasticidad sináptica en neuronas hipocampales (Danka Mohammed et al., 2016) y participante de la vía de orientación axonal (Kaalund et al., 2014). Notablemente, se ha demostrado que la expresión de miR-204-5p está alterada en ratas expuestas a etanol durante el periodo prenatal, y que esta expresión puede ser revertida por un ambiente enriquecido socialmente luego del destete (Ignacio et al., 2014).

Todo lo discutido anteriormente acerca de la funcionalidad de los miRNAs alterados por la malnutrición, adquiere otro nivel de complejidad a la luz de recientes

descubrimientos que muestran que los miRNAs pueden circular por la sangre, lo cual resalta su potencial como moléculas de señalización para el sistema endócrino o como biomarcadores de enfermedades. (Rottiers and Nää, 2012)

#### 4.5.3. *Reversión de la expresión de miRNAs por EE*

En lugar de realizar un enfoque sobre un único gen, la secuenciación masiva permite entender cuál es la relevancia de un patrón de expresión. Y habiendo centrado el análisis sobre el estrés ambiental, lo que estudiamos es la desregulación de circuitos de genes que dan lugar a la desregulación de procesos celulares, más que de genes individuales que explican un fenotipo. En este sentido, observamos que la malnutrición perinatal tiene efectos duraderos sobre la expresión de patrones de expresión y sobre la conducta, en particular, sobre la ansiedad y la memoria. Los miRNAs pueden tener efectos sobre la expresión génica a nivel global y además responden fuertemente ante ambientes estresantes para mediar respuestas adaptativas (Ignacio et al., 2014; Leung and Sharp, 2010; Mendell and Olson, 2012). Notablemente, una característica significativa de los mecanismos de regulación de la expresión génica mediados por miRNAs es su reversibilidad. Mientras el decaimiento del mRNA es un proceso irreversible, la inhibición de la traducción dependiente de miRNAs puede reanudarse una vez eliminada la represión dependiente del miRNA. La inhibición de la traducción por miRNAs es un proceso rápido que permite una regulación dinámica a nivel de las sinapsis, de modo que constituye un proceso íntimamente ligado a la neuroplasticidad (Schouten et al., 2013).

En este trabajo se mostró que miR-187-3p, miR-132-3p y miR-369-3p son regulados positivamente por la malnutrición proteica perinatal. A su vez, los niveles de expresión de estos miRNAs se revierten luego de la exposición a un EE durante 5 semanas luego del destete. La reversión de los cambios en la expresión de miRNAs a través de una intervención relativamente simple, como lo es el EE, es consistente con las reversiones fenotípicas observadas en otros estudios en los que se evaluaron los efectos beneficiosos del EE sobre la neuroplasticidad (ver Introducción 1.7). Dado que los cambios en la expresión de miRNAs, particularmente, miR-187-3p, miR-132-3p y miR-369-3p, correlacionó con los fenotipos conductuales observados para la malnutrición y el EE, es posible que estos cambios estén más directamente relacionados con los mecanismos que subyacen a cada fenotipo.

La reversión fenotípica podría representar un proceso por el cual los efectos celulares y moleculares (por ejemplo, la regulación epigenética) que ocurren en la vida

temprana, y que persistirían en la vida adulta, son revertidos por eventos ambientales producidos en un período de desarrollo más tardío. Sin embargo, y alternativamente, esta reversión también podría estar dada por efectos compensatorios a otros niveles de regulación fisiológica de los organismos, por ejemplo, la regulación hormonal a través del eje HPA. Por ejemplo, un estudio mostró que ni la expresión hipocampal de GR ni la expresión hipotalámica de CRH eran modificadas por el EE ante un evento de separación materna, pero sí se encontró una variación en los niveles de corticosterona en sangre entre estos grupos (Francis et al., 2002).

Más estudios son necesarios para determinar en qué medida los cambios en la expresión de miRNAs son puntos irreversibles en el establecimiento de un fenotipo o nuevas ventanas temporales para oportunidades de intervención.

#### **4.6. Cambios fenotípicos asociados al direccionamiento axonal y la mielinización**

El estudio de la expresión de miRNAs durante el desarrollo conjuntamente con el análisis de sus mRNAs blanco es, actualmente, la mejor práctica para predecir la función de los miRNAs. La predicción de todos los blancos de un grupo de miRNAs y la posterior evaluación de los procesos celulares representados por la lista de genes blanco puede realizarse con herramientas bioinformáticas (ver Materiales y Métodos 5.9.4). Si los mRNAs blancos de un grupo de miRNAs están enriquecidos en un proceso biológico particular, entonces es lógico inferir que dichos miRNAs están involucrados en ese proceso. De todos modos, hay algunas limitaciones para esta metodología. Por un lado, no se suele tener en cuenta el grado de desregulación de los mRNAs blancos, es decir, si son regulados positiva o negativamente. Por otro lado, tampoco se considera la importancia relativa de cada mRNA en el proceso biológico predicho. Estas observaciones hacen que no existe una total consistencia entre los resultados experimentales y las predicciones bioinformáticas, por lo que los resultados aquí presentados deben ser interpretados cuidadosamente (Schouten et al., 2013).

##### *4.6.1. Vía de orientación axonal*

La predicción de los procesos celulares en los cuales están involucrados los genes regulados por los miRNAs alterados en ratones HP mostró que la vía de orientación axonal podría estar afectada por la malnutrición. Esta vía es necesaria para que se produzcan las

conexiones entre las diferentes regiones del cerebro en desarrollo, lo cual resulta de particular interés en el hipotálamo, dado que es una de las estructuras cerebrales con más conexiones con otras áreas. El hipotálamo debe sensar todo tipo de parámetros ambientales y, particularmente, desencadenar la respuesta a estrés integrándola con las zonas responsables de recordar una determinada situación de miedo y retornar a los valores homeostáticos de hormonas del estrés, procesos llevados a cabo por el sistema límbico. Esta integración entre áreas es fundamental y los circuitos neuronales que la componen tienen una relevancia particular. De hecho, una mala orientación de los axones durante el desarrollo podría generar una desarticulación entre el hipocampo o la PFC y el hipotálamo explicando, en parte, los déficits conductuales observados en los ratones malnutridos.

Si bien está clara la importancia de la vía de orientación axonal durante el desarrollo, menos clara resulta su función en los ratones jóvenes-adultos en los que hemos visto que esta vía podría estar afectada. Una posibilidad es que regule procesos de neuroplasticidad en el hipotálamo (Simerly, 2005). Pero, más sugestivamente, algunas de las proteínas involucradas en la vía de orientación axonal, particularmente, las Semaforinas, son también necesarias para la proliferación y diferenciación de células gliales, que resulta en una correcta mielinización de axones. Las interacciones entre los axones y las células gliales influyen en la mielinización, lo cual es interesante a la luz de que este proceso continúa en desarrollo aún en etapas avanzadas de la vida de los individuos (Battistini and Tamagnone, 2016; Bernard et al., 2012). En este punto conviene destacar que la vía de orientación axonal tiene cierta amplitud espacial en el cerebro por ser la responsable de la correcta migración de axones hasta sus objetivos. Esto hace que, a pesar de haber sido predicha como potencial responsable de los efectos de la malnutrición materna a partir de los miRNAs desregulados en el hipotálamo, es una vía que podría estar afectando otras regiones distantes al hipotálamo.

Por otro lado, las neuronas maduras del sistema nervioso central pueden regenerar sus axones a través de un proceso molecular aparentemente conservado a lo largo del desarrollo. El factor limitante para generar esta regeneración es el sostenimiento del crecimiento a larga distancia a través de factores tróficos (como BDNF) y moléculas de la matriz extracelular que sirven de claves para la orientación de esos axones (como las Semaforinas de secreción). Este proceso es posible en el cerebro adulto.

#### 4.6.2. Efecto de la malnutrición perinatal sobre la mielinización

La mielinización incrementa la velocidad de conducción de las neuronas y facilita la activación sincrónica de varias neuronas reduciendo los efectos de la distancia en circuitos distribuidos por diversas regiones del cerebro (Fields, 2008). La coordinación del disparo de potenciales de acción es un concepto importante para la neuroplasticidad (Lyons et al., 2010).

Los efectos de la malnutrición perinatal sobre la mielinización ya han sido probados en ratas (Rideau Batista Novais et al., 2016), cobayos (Piorkowska et al., 2014) y humanos (Hazin et al., 2007). Se reportó una disminución de la materia blanca en el cuerpo caloso y en la comisura anterior (Pacagnella et al., 2013). Los resultados del presente trabajo agregan una disminución de la mielinización en el cíngulum. Tres principales mecanismos han sido propuestos para establecer este fenotipo: un arresto en la maduración del linaje oligodendrítico, un incremento en la apoptosis de oligodendrocitos o una disminución en la proliferación de progenitores de oligodendrocitos (Rideau Batista Novais et al., 2016).

El cíngulum es una de las mayores vías de materia blanca del cerebro, conectando regiones asociadas a funciones ejecutivas, toma de decisiones y emociones. Particularmente, esta región es fundamental para la conexión del sistema límbico. Experimentos de neuroimágenes revelaron anomalías en el cíngulum que están asociadas a desórdenes psiquiátricos, por ejemplo, depresión (Heilbronner and Haber, 2014).

Otros estudios demostraron que, ante la restricción del crecimiento *in utero*, se retrasa la mielinización y disminuye el volumen de materia gris (Macé et al., 2011; Padilla et al., 2011). Este último resultado es consistente con lo observado en nuestro modelo de malnutrición perinatal sobre el peso del cerebro y del hipocampo (ver Discusión 4.2.3). Consistentemente con estas observaciones, se ha visto que una de las vías más desreguladas en los oligodendrocitos ante una malnutrición proteica prenatal es la de direccionamiento axonal. La expresión de una de las Semaforinas solubles (Sema3a), que actúa como factor repulsivo en neuronas, se encontró inducido en oligodendrocitos luego de la malnutrición temprana, mientras que Sema3E, que promueve el crecimiento axonal, se encontró reprimida (Bernard et al., 2012; Koncina et al., 2007; Rideau Batista Novais et al., 2016).

Un proceso biológico generalmente asociado a un retraso en la maduración de la materia blanca es la neuroinflamación (Favrais et al., 2011). Se ha mostrado que la restricción proteica materna induce una transiente activación de la microglía luego del nacimiento y los estudios de transcriptómica sugieren que los oligodendrocitos y la microglía regulan positivamente los genes relacionados con vías proinflamatorias (Rideau

Batista Novais et al., 2016). Por esta razón, los procesos inflamatorios del cerebro, mediados por la microglía, puede constituir una línea de investigación interesante que se desprende de los resultados aquí presentados.

#### 4.6.3. *Efecto de la malnutrición perinatal sobre la morfología de oligodendrocitos*

Los resultados discutidos hasta el momento apuntan a que la malnutrición perinatal genera una disminución de la mielinización en el cíngulum, potencialmente basada en una desregulación del proceso de orientación axonal y su interacción con la maduración de oligodendrocitos. Existen evidencias que indican que la regulación del estrés depende de la correcta mielinización de las conexiones axonales entre la PFC y otras regiones subcorticales del sistema límbico (como el hipocampo y la amígdala) (Lyons et al., 2010). En niños, se ha mostrado que la mielinización de la PFC incrementa con la edad (Barnea-Goraly et al., 2005) y con la maduración de las funciones dependientes de esta estructura (Casey et al., 2007).

La mielinización, como los demás procesos de neuroplasticidad, es reversible. Esta característica permite generar una hipótesis acerca de la reversión del fenotipo ansioso en ratones HP a través de la estimulación ambiental. Como ya se mencionó, la hipótesis de inoculación de estrés por EE (ver Discusión 4.4.1) sostiene que repetidas exposiciones a los estímulos inanimados y sociales del EE mejoran la respuesta a estrés, disminuye la ansiedad y aumenta el control cognitivo de las funciones relacionadas con la PFC (Fox et al., 2006; Schrijver et al., 2004). Estos resultados sugieren que el EE podría ejercer su efecto en la reversión a través de la modulación de la neuroplasticidad de la PFC por aumento de la mielinización (Lyons et al., 2010).

En este trabajo, observamos una disminución de la complejidad de los procesos oligodendrocíticos junto con un aumento en la eficiencia de mielinización en ratones HP sometidos al EE comparado con los NP sometidos al EE. Estos resultados constituyen un ejemplo de la complejidad del modelo en estudio. Son vastas las variables a tener en cuenta para definir un fenotipo adulto en cuanto a la morfología de oligodendrocitos expuestos a malnutrición perinatal y su interacción con un ambiente enriquecido. De hecho, en un contexto ambiental que no presenta enriquecimiento, las diferencias morfológicas de los oligodendrocitos entre ratones NP y HP no son evidentes. Sin embargo, sí se observan diferencias a nivel de expresión de miRNAs. En cambio, en un contexto de enriquecimiento ambiental se observan diferencias morfológicas que podrían estar basadas

en cambios producidos por otro patrón de expresión de miRNAs, diferente al que se induce por la malnutrición en el contexto de un ambiente postnatal normal.

La promoción de la mielinización a través de un EE ya ha sido descrita en otros modelos de estrés (Sirevaag and Greenough, 1987; Szeligo and Leblond, 1977). Recientemente, dos estudios señalaron que el ambiente postdestete tiene una influencia en la mielinización de la PFC y que los cambios fenotípicos producidos durante esta etapa pueden perdurar hasta la adultez (Hirase and Shinohara, 2014; Liu et al., 2012; Makinodan et al., 2012). Si bien estos estudios trabajaron con un paradigma de aislamiento social, uno de ellos estudió el efecto de la reinserción social luego de 8 semanas de aislamiento (Liu et al., 2012). Consistente con un modelo en el cual la neuroplasticidad puede moldear la mielinización en los adultos, la reinserción social revirtió los cambios en la mielina y, más aún, restauró la conducta social a valores semejantes a los de los ratones no aislados. Estos resultados sugieren que la experiencia social puede modificar la mielinización de la PFC en adultos. La estimulación social generada por la reinserción podría paralelizarse con el enriquecimiento ambiental realizado en el contexto de nuestro paradigma de malnutrición perinatal, en cuyo caso, podría explicar el aumento en la eficiencia de mielinización por EE.

A la luz de nuestros resultados, puede especularse que la PFC es capaz de modular la mielinización que se está llevando a cabo en ratones jóvenes-adultos, usándola como forma de neuroplasticidad para adaptar el cerebro a los cambios del ambiente. La PFC, justamente, integra estímulos externos y controla comportamientos complejos (Wallace et al., 2009), y los cambios en la mielinización en esta región han sido asociados a desórdenes psiquiátricos, particularmente, trastornos de ansiedad (Regenold et al., 2006). Suena entonces lógico pensar que la reversión de los cambios en el comportamiento ansioso de ratones malnutridos tiene sus causas fisiológicas en este tipo de neuroplasticidad, que es influenciada por el ambiente para modificar los circuitos neuronales a través de la velocidad y fidelidad de la conductancia axonal. Como ya se discutió previamente (ver Discusión 4.5.3), la regulación de la expresión génica por miRNAs podría estar en la base de los cambios morfológicos y fisiológicos observados.

#### **4.7. Conclusiones finales y perspectivas**

A lo largo de este trabajo, evaluamos el efecto de la malnutrición proteica perinatal sobre diferentes aspectos fenotípicos, principalmente, la expresión de miRNAs. Al igual

que había sido reportado previamente, encontramos un aumento de la ansiedad y una disminución de la memoria a largo plazo en ratones malnutridos. Ambos fenotipos conductuales pudieron ser revertidos con la exposición a un ambiente enriquecido luego del destete. Cuando analizamos los miRNAs a nivel global, encontramos que la expresión de algunos de ellos correlacionaba con el fenotipo conductual. La predicción de procesos biológicos involucrados en estas alteraciones de comportamiento por la malnutrición mostró a la orientación axonal como una de las más preponderantes, en base a los genes blanco de los miRNAs desregulados. Teniendo en cuenta estos resultados, estudiamos la mielinización global de ciertas zonas importantes para la correcta comunicación entre regiones del sistema límbico y encontramos un fuerte efecto de la dieta materna. Siendo los oligodendrocitos las células responsables de la mielinización de axones, analizamos si su morfología estaba modificada, encontrando diferencias entre ratones normales y malnutridos solamente cuando eran sometidos a un ambiente enriquecido.

Mientras la falla en la mielinización del cíngulum podría ser una de las causas del fenotipo conductual, el aumento en la eficiencia de mielinización en los ratones malnutridos y luego sometidos a un enriquecimiento ambiental podría ayudar a explicar la reversión del comportamiento. Los miRNAs, potencialmente mediados en parte por BDNF, tendrían un rol importante en el proceso de orientación axonal para la correcta formación de conexiones entre las regiones del sistema límbico y, potencialmente, también para generar los efectos de reversión fenotípica.

Si bien restan por hacer numerosos experimentos para probar, de forma mecánica, las acepciones propuestas, estos resultados pueden servir para generar una hipótesis de trabajo sobre el efecto de los miRNAs en la neuroplasticidad de los ratones malnutridos e intentar así contribuir a explicar las bases moleculares y celulares de la conducta. Pero, más importante, avanzar en el conocimiento de una condición, como lo es la malnutrición perinatal, que afecta la calidad de vida de las personas, particularmente, de los niños en estados de vulnerabilidad, e intentar contribuir al diseño de programas de intervención.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1. Animales

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de la colonia CrIFcen:CF1 (en adelante CF-1) provistos por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) de la Universidad de Buenos Aires (UBA). Los mismos fueron mantenidos a una temperatura aproximada de 25 °C y con un ciclo de 12 h de luz (6:00 a 18:00 h) y 12 h de oscuridad. Tanto la comida como el agua fueron suministradas *ad libitum*. Para los experimentos con la cepa FVB/NJ, se utilizaron las instalaciones del Bioterio del *Boston Children's Hospital*, Boston, Estados Unidos, respetando las mismas condiciones ambientales del Bioterio Central de la FCEyN.

Para realizar los test conductuales, los animales fueron trasladados a una sala con estanterías comunes, con una habitación aledaña especialmente diseñada para efectuar dichas pruebas (sala de comportamiento). Para que los animales se habitúen a la nueva sala, fueron llevados una semana anterior al comienzo de los test comportamentales manteniendo el mismo ciclo de luz-oscuridad.

### 5.2. Ética en el trabajo con animales

Los experimentos fueron protocolizados de acuerdo con las regulaciones locales y las enunciadas por el *National Institute of Health* (NIH) según la *Guide of the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH publicación 80-23/96). Los protocolos experimentales fueron previamente aprobados por la Comisión Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCEyN, UBA según el Protocolo N° 0024. Al final de los experimentos, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical o anestesiados y luego perfundidos.

### 5.3. Dietas y modelo de malnutrición perinatal

Las dietas utilizadas en este trabajo de tesis fueron adquiridas en la empresa *Research Diets Inc.* de acuerdo al reporte realizado por la AIN-93 (Reeves et al., 1993) y su composición está detallada en la **Tabla 4**.

**Tabla 4 | Formulaciones de dietas NP y HP.**

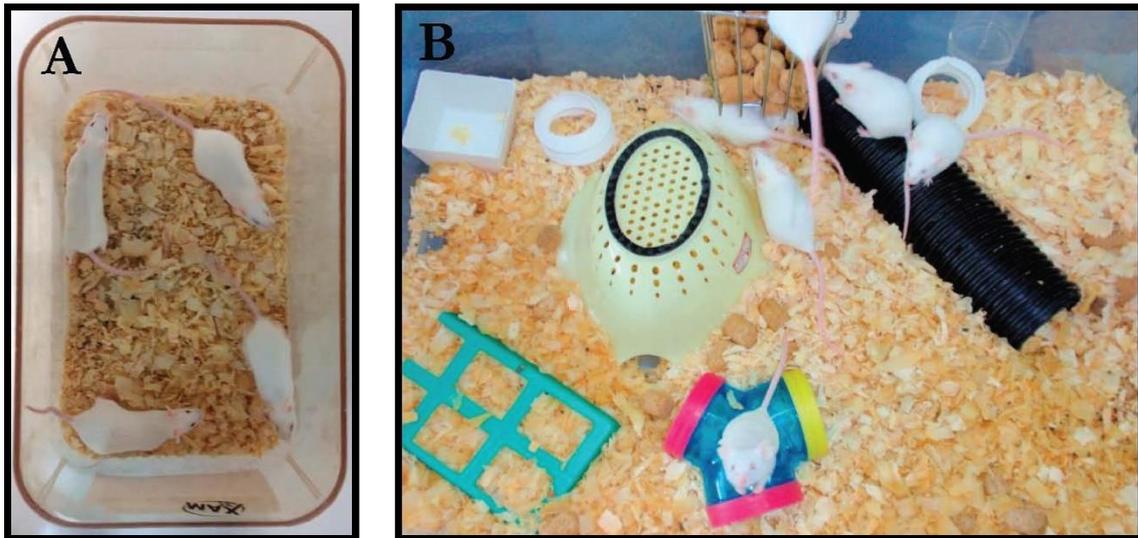
Producto #	D10012G (NP)		D12063002 (HP)	
	g%	kcal%	g%	kcal%
Proteínas	20	20	8	8
Carbohidratos	64	64	76	76
Grasas	7	16	7	16
Total		100		100
kcal/g	4,0		4,0	
<b>Ingredientes</b>	<b>g</b>	<b>kcal</b>	<b>g</b>	<b>kcal</b>
Caseína	200	800	80	320
L-Cistina	3	12	3	12
Almidón de maíz	397,486	1.590	517,486	2.070
Maltodextrina 10	132	528	132	528
Sacarosa	100	400	100	400
Celulosa BW200	50	0	50	0
Aceite de soja	70	630	70	630
t-Butilhidroquinona	0,014	0	0,014	0
Mezcla de minerales S10022G	35	0	0	0
Mezcla de minerales S10022C	0	0	3,5	0
Cloruro de sodio	0	0	2,59	0
Carbonato de calcio	0	0	12,495	0
Fosfato de potasio, 1 H <sub>2</sub> O	0	0	10,7	0
Mezcla de vitaminas V10037	10	40	10	40
Bitartrato de colina	2,5	0	2,5	0
FD&C Colorante amarillo #5	0	0	0,05	0
<b>Total</b>	<b>1.000</b>	<b>4.000</b>	<b>994,335</b>	<b>4.000</b>
P (g)	3,04		3,03	
K (g)	3,60		3,80	

Los ratones parentales (F0) machos y hembras fueron alimentados con dieta control (NP) o hipoproteica (HP) durante los cinco días previos al apareamiento. El mismo se realizó alojando dos hembras nulíparas con un macho por cinco días consecutivos. Luego, el macho fue removido y las hembras alojadas juntas durante 15 días hasta ser separadas y alojadas individualmente con material para el momento del parto. Los parentales fueron alimentados con dieta NP o HP durante el apareamiento, luego del cual las hembras fueron mantenidas con la dieta correspondiente y su peso fue controlado periódicamente. En los primeros días postparto se removieron los individuos excedentes con el fin de balancear el número de crías entre camadas. Las crías (F1) fueron destetadas al día 21 posnatal (P21), momento a partir del cual fueron alimentados con dieta estándar de bioterio. En los experimentos que incluyeron un tratamiento ambiental post-destete, las crías recién destetadas (P21) fueron alojadas en un ambiente normal o en un ambiente enriquecido (ver Materiales y Métodos 5.4).

El protocolo de malnutrición perinatal descrito previamente fue también aplicado a una cepa de ratones FVB/NJ transgénicos, que expresan eGFP bajo los órdenes del promotor del gen específico de oligodendrocitos, *PLP*. Con esta cepa se realizaron las mediciones morfológicas de oligodendrocitos.

#### **5.4. Enriquecimiento ambiental**

El paradigma de enriquecimiento ambiental consistió en someter a los ratones destetados de la F1 a dos tipos de ambientes: un ambiente normal (NE, 3 a 4 ratones por jaula, en una jaula estándar de 30 x 18,5 x 12 cm) o un ambiente enriquecido (EE, 6 a 8 ratones por jaula, en una jaula de mayor volumen, 64 x 45 x 25 cm, y con elementos de enriquecimiento ambiental, como juguetes y tubos) (**Figura 36**). Los ratones de los tratamientos NP y HP fueron asignados al azar a los dos tipos de ambientes post-destete y alojados en sus respectivas jaulas hasta las 8 semanas de edad (día postnatal 56, P56), momento en el cual fueron sacrificados o perfundidos para su posterior análisis.



**Figura 36 | Características de los ambientes postdestete del modelo.**

Ambientes en los que fueron alojados los ratones F1 durante 5 semanas, una vez finalizado el período de lactancia. **A**, Ambiente normal (NE) con 4 animales. **B**, Ambiente enriquecido (EE) con un mayor número de animales y distintos accesorios que promueven una estimulación social y sensorial, respectivamente.

De esta manera, se constituyeron 4 tratamientos que resultan de la combinación de los modelos de malnutrición perinatal y enriquecimiento ambiental: NP-NE, NP-EE, HP-NE y HP-EE.

## 5.5. Evaluación del desarrollo físico

### 5.5.1. Pesos y parámetros morfológicos

Las crías fueron pesadas día por medio a partir de P1. Para el estudio del desarrollo físico los siguientes cambios fueron observados y registrados para cada individuo: aparición de pelo dorsal y ventral, apertura del canal auditivo, y apertura de los ojos. Los parámetros físicos fueron expresados como el día postnatal en el cual se observó la aparición de los mismos.

### 5.5.2. Distancia ano-genital (DAG)

En P1, P7, P13 y P19, los ratones fueron colocados en una posición sentada en una placa acrílica transparente 10 cm por encima de la mesa de trabajo. Una foto fue tomada desde debajo de la placa de acrílico y la distancia ano-genital se midió digitalmente con un

*software* de edición de imágenes. Los píxeles fueron convertidos a distancia tomando una foto de una regla colocada en la placa de acrílico y usándola como escala.

### 5.5.3. *Pesos del cerebro*

Un grupo de ratones NP y HP fue sacrificado al destete y el cerebro fue extraído y pesado en una balanza granataria. Luego se diseccionaron los hipocampos y se pesaron de la misma forma. Los tejidos de esta camada de ratones fueron utilizados luego para otras líneas de investigación llevadas a cabo en nuestro laboratorio.

## 5.6. **Evaluación del consumo de la F0**

Para evaluar la cantidad de alimento consumido por las madres NP y HP, la comida fue pesada entre las 10:00 y las 11:00 h durante todos los días de la preñez y la lactancia. La diferencia entre el peso de un día y del anterior se reportó como el consumo de ese día.

## 5.7. **Tests de comportamiento**

Los ratones no fueron manipulados previamente, salvo para los cambios rutinarios de jaulas, a menos que se especifique lo contrario. Antes de cada test los animales fueron habituados, durante 40 - 50 min, a la habitación en la que se realiza la prueba. Para todos los tests se limpiaron los laberintos o arenas utilizados entre animales con etanol 20%. Para el test de reconocimiento de objeto novedoso (RON), que involucró varias sesiones, una a continuación de la otra, las arenas no fueron limpiadas entre sesiones para el mismo animal. Las pruebas fueron realizadas en individuos de 8 semanas de edad. Para cada test se trabajó en el mismo día con ratones de ambos tratamientos nacidos con no más de tres días de diferencia. En caso de realizar una serie de testeos en tándem, los mismos se efectuaron dejando un lapso de por lo menos cuatro días entre cada test. En caso de realizar más de un test en la misma cohorte, se respetó el siguiente orden: caja de luz-oscuridad (CLO), laberinto elevado en cruz (LEC), campo abierto (CA), laberinto en Y con claves espaciales (LY), reconocimiento de objeto novedoso (RON). Además, en un experimento diferente y con una cohorte de ratones independiente se realizó el test de aversión condicionada al gusto (ACG).

### 5.7.1. *Caja de luz-oscuridad (CLO)*

La caja de luz-oscuridad consiste en una arena cuadrada de 45 cm de lado con paredes y fondo oscuros, subdividido en dos rectángulos iguales, uno de los cuales está cubierto formando una cámara (oscuridad) que deja una abertura hacia la otra mitad descubierta (luz). El test se realizó colocando al ratón en la zona descubierta y dejándolo explorar la arena durante 5 min. Se contabilizó el tiempo de permanencia en la zona luminosa. La intensidad de luz se fijó en 100 lux.

La lógica detrás de este test es similar a la de otros tests que evalúan la ansiedad en roedores. En el caso de los ratones, el comportamiento de tipo ansioso se basa en una competencia entre la tendencia exploratoria del animal y la aversión que le generan los espacios abiertos y luminosos. En el caso de que prevalezca dicha aversión, aumentará el tiempo en la zona cubierta, que se interpreta como un estado de ansiedad mayor.

### 5.7.2. *Laberinto elevado en cruz (LEC)*

El aparato consiste en un laberinto de piso oscuro con una plataforma central (5 x 5 cm) que conecta cuatro brazos perpendiculares de 30 cm de longitud. Dos brazos tienen paredes oscuras de poliestireno de 15 cm de altura (brazos cerrados), y los otros dos no tienen paredes, excepto por un pequeño zócalo de 0,5 cm (brazos abiertos). El laberinto se ubica a 50 cm del suelo. La prueba se realizó colocando al ratón en la plataforma central frente a uno de los brazos abiertos y permitiendo que explore el dispositivo durante 5 min. La sesión fue filmada con una cámara de video colocada por encima del laberinto y grabada con el programa ANY-Maze™ *Video Tracking Software* (Stoelting Co.). Utilizando dicho *software*, se registró el tiempo de permanencia del ratón y su distancia recorrida en cada brazo, así como otras actividades de interés: el número de veces que el ratón se paró en dos patas (*rearings*), el número de inmersiones de cabeza y el número de inmersiones de cabeza protegidas (inmersión de cabeza mientras el animal aún estaba en la plataforma central) y el tiempo total que el animal dedicó a acicalarse. Las luces se fijaron en 100 lux.

Como en el caso del test CLO, la lógica de este test es someter a los ratones a una situación en la que tengan que hacer pesar su tendencia natural a la exploración y su aversión a los espacios abiertos y luminosos (brazos abiertos del LEC). Mayor tiempo de permanencia en los brazos cerrados denota mayor nivel de comportamiento de tipo ansioso.

### 5.7.3. *Campo abierto (CA)*

El test del campo abierto consiste en una arena cuadrada de 45 cm de lado con paredes y fondo oscuros. El ratón fue colocado junto a uno de los lados y se les permitió explorar el ambiente durante 20 min. La sesión fue grabada y el movimiento de los ratones fue registrado utilizando el ANY-Maze™. Un observador sentado fuera de la habitación registró, utilizando el *software* mencionado, las siguientes actividades: el número de veces que el ratón se paró en dos patas (*rearings*), y el tiempo total que el animal dedicó a acicalarse. La intensidad lumínica se fijó en 30 lux.

Este test fue utilizado para evaluar la locomoción (y no ansiedad) de los ratones y así descartar posibles diferencias debidas a este efecto en otros tests realizados.

### 5.7.4. *Laberinto en Y con claves espaciales (LY)*

Con el objeto de evaluar la memoria espacial se aplicó una prueba de dos sesiones con claves espaciales en el laberinto en “Y” (Sarnyai et al., 2000). El equipo consiste de una pieza de acrílico transparente con tres brazos de 40 cm de largo, 13 cm de altura, 3 cm de ancho en la base y 10 cm en los bordes superiores, con ambas paredes del brazo inclinadas con el mismo ángulo interno. Los pisos del laberinto están cubiertos con una base de color negro para facilitar el seguimiento de los animales. Si bien el interior de los tres brazos es idéntico, por lo que no hay posibilidad de identificación espacial, la transparencia de sus paredes permite la visualización de claves externas. Las mismas consistieron en diferentes figuras geométricas con o sin patrones de colores, ubicadas en las paredes de la sala. El ratón a testear fue colocado en el extremo de uno de los brazos (brazo de inicio), y se le permitió explorar el laberinto con uno de sus brazos cerrados (brazo novedoso) durante 10 min (sesión de entrenamiento). Se utilizó el mismo brazo de inicio para todos los ratones, pero se alternó la ubicación del brazo que se mantiene abierto (brazo familiar) durante el entrenamiento. Terminada la sesión de entrenamiento y luego de un lapso de 20 min el ratón fue colocado nuevamente en el brazo de inicio del laberinto y se le permitió explorar libremente los tres brazos durante 5 min (sesión de testeo). La luz se mantuvo a 30 lux durante ambas sesiones. Para todos los individuos se registró la elección del primer brazo (novedoso versus familiar), el número de entradas, la distancia recorrida y el tiempo que dedicaron a la exploración de cada brazo con el programa ANY-Maze™. No se encontraron diferencias entre individuos del mismo tratamiento de acuerdo a cuál fue la designación del brazo novedoso y del familiar, por lo que se decidió promediar estos resultados.

#### 5.7.5. Reconocimiento de objeto novedoso (RON)

El test de reconocimiento de objeto novedoso fue llevado a cabo en una arena experimental de paredes negras (21 x 30 x 23 cm). Cada ensayo consistió de tres sesiones. Durante la primera sesión los ratones fueron colocados en el campo experimental durante 5 min (habitación). En la segunda sesión, dos objetos idénticos (objetos familiares) fueron colocados en la arena y se permitió a los ratones explorar durante otros 5 min (entrenamiento). Durante la última sesión, que se realizó a las 24 h de la sesión de entrenamiento, los objetos fueron reemplazados por un objeto idéntico al familiar y otro nuevo, el objeto novedoso (testeo). La duración de esta última sesión fue también de 5 min. Entre sesiones los ratones fueron removidos de la arena y colocados en una jaula idéntica a la de alojamiento por 5 min. Los ensayos fueron grabados y el movimiento de los animales registrado utilizando el programa ANY-Maze™. El tiempo de exploración de cada objeto (medido como el tiempo durante el cual el ratón ubicaba su cabeza apuntando hacia el objeto a corta distancia) durante las fases de entrenamiento y de testeo fue determinado por un observador utilizando las grabaciones del *software*. Se calculó el porcentaje de tiempo durante el cual el ratón explora el objeto novedoso con respecto al tiempo de exploración de ambos objetos durante el testeo. Se alternó el tipo de objeto novedoso y la posición (derecha o izquierda) en la arena entre individuos de forma balanceada para ambos tratamientos. No se encontraron diferencias dentro de cada tratamiento en el tiempo de exploración del objeto novedoso de acuerdo al tipo o la ubicación del mismo, por lo que se promediaron estos resultados. Las luces se mantuvieron a 10 lux durante todo el ensayo, para minimizar la expresión de fenotipos de ansiedad.

#### 5.7.6. Aversión condicionada al gusto (ACG)

Para este test, se utilizaron ratones NP y HP que fueron alojados individualmente y adaptados a un régimen de restricción de agua, retirando la botella de agua para bebida. El protocolo consistió en ofrecerles 5 ml de agua durante 20 minutos a las 9:00 hs y un refuerzo de 5 ml más durante 10 min a las 16:00 hs. La administración controlada de agua se repitió durante 4 días consecutivos. En el quinto día (condicionamiento), se inyectó a los ratones con una solución 0,3 M de LiCl de forma intraperitoneal (10 µl por cada g de peso de ratón). Cinco minutos después de la inyección, se les ofrecieron 5 ml de una solución de sacarina 0,1 % durante 20 minutos a las 9:00 hs y el refuerzo de agua correspondiente a las 16:00 hs. Este condicionamiento consiste en que los ratones asocien el malestar que les

produce la inyección de LiCl con el gusto de la sacarina. Luego, se repitieron 2 días de administración controlada de agua. El octavo día se realizó el testeo ofreciendo 5 ml de sacarina 0,1 % durante 20 minutos a las 9:00 hs y se midió el consumo de la solución de sacarina. La memoria de la asociación del LiCl y la sacarina debería generar que los ratones con mayor memoria consuman menos sacarina y viceversa. Paralelamente, se trabajó con un grupo control de ratones, tanto NP como HP, sometidos al mismo protocolo descripto, exceptuando que la inyección de LiCl fue con una solución fisiológica (utilizada para disolver el LiCl). Este grupo de ratones no asoció la sacarina con un malestar general.

## 5.8. Análisis de la expresión génica

### 5.8.1. Extracción de tejidos

Ratones NP y HP fueron sacrificados por dislocación cervical a P21 para los experimentos referidos al análisis de la maquinaria de biogénesis de miRNAs, y a P56 para los experimentos de enriquecimiento ambiental. Cada ratón fue decapitado y se extrajo el cerebro del cual se separó el hipotálamo, los hipocampos, el bulbo olfatorio y la corteza. Cada una de las muestras fue rápidamente congelada en nitrógeno líquido y conservada a -80 °C hasta su uso para la extracción de RNA.

### 5.8.2. Extracción de RNA

Para las mediciones de expresión génica, se realizó la extracción de RNA de los tejidos diseccionados utilizando el reactivo RNAzol<sup>®</sup> RT (*Molecular Research Center, Inc.*) de acuerdo al protocolo que se describe a continuación. Este protocolo permite la separación de RNA total en 2 fracciones: una correspondiente a los RNAs menores a 200 nt (fracción “miRNA”), y la otra a los mayores de 200 nt (fracción “mRNA”).

La muestra de tejido fue homogenizada con micropipeta agregándole diferentes volúmenes del reactivo RNAzol<sup>®</sup> RT según su tamaño: para el hipotálamo, 60 µl; para los hipocampos, 120 µl; para el bulbo olfatorio, 120 µl; y para la corteza total, 240 µl. Se centrifugó en una centrífuga HERMLE (Z233 MK-2) a 12.000 g a 4 °C durante 15 min. Se transfirió a un nuevo tubo un 80% del volumen original de RNAzol<sup>®</sup> RT, y se agregó agua en un volumen equivalente al 40% del sobrenadante recuperado. Se agitaron vigorosamente los tubos durante 15 s y luego se los incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó nuevamente a 12.000 g a 4 °C durante 15 min para separar las fases

acuosa y fenólica. Se recuperó un volumen equivalente al recuperado luego de la primera centrifugación para evitar contaminación entre fases, y se transfirió a un nuevo tubo. Para la precipitación del RNA, se agregó un volumen de etanol 75% igual al 40% del volumen recuperado en el paso anterior, y se mezcló por inversión unas 10 veces. Sólo en el caso del hipotálamo, se agregaron 10 µg de glucógeno. Se precipitó el RNA durante al menos 1 h en hielo. Luego, se centrifugó a 12.000 g a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante resultado de esta centrifugación se conservó para la posterior purificación de la fracción de miRNA. Al *pellet*, se le realizaron dos lavados sucesivos con 400 µl de etanol 75%, y luego se lo dejó secar durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió el RNA de la fracción de mRNA con 20 µl de agua. Para la precipitación de la fracción de miRNA, al sobrenadante de la precipitación de la fracción de mRNA se le agregó un volumen de isopropanol equivalente al 80% del volumen de sobrenadante recuperado. Se mezcló por inversión unas 10 veces y se incubó en heladera durante 2 h para su precipitación. Luego, se centrifugó a 12.000 g a 4 °C durante 30 min. Con el *pellet* resultado de esta centrifugación se realizaron dos lavados sucesivos con 400 µl de isopropanol 70%, y luego se lo dejó secar durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, se resuspendió la fracción de miRNA con 15 µl de agua.

Para facilitar la resuspensión del RNA se llevaron las muestras a -80 °C por al menos 5 min y luego se calentaron a 65 °C por 5 min. La concentración y pureza del RNA se determinó en 1,5 µl de la suspensión utilizando un Nanodrop 2000 *spectrophotometer* (*Thermoscientific*) la absorbancia a 280 nm y la relación de absorbancias a 280/260 nm y 280/230 nm, respectivamente. El resto de la muestra fue almacenada a -80 °C hasta su utilización.

### 5.8.3. Síntesis de cDNA

#### 5.8.3.1. Retrotranscripción (RT) de mRNA

Para retrotranscribir los mRNAs se utilizó la fracción de mRNA, cuya extracción se describe en Materiales y Métodos 5.8.2. Se utilizó 1 µg de RNA por reacción y se completó con agua hasta llegar a 10 µl de mezcla de agua y RNA. Luego se agregó a cada tubo 3 µl de una mezcla de: dNTPs 10 mM, oligo-dT de 17 nucleótidos de largo 0,5 µg/µl, y agua, en proporciones 1:1:1. El oligo-dT se utiliza como *primer* para la RT de los mRNAs dado que se apareja con sus colas de poli-A. Las muestras fueron calentadas a 65 °C por 5 min en un termociclador *Biorad* (*MyCycler™*). Luego se enfriaron durante 1 min en hielo y se les agregaron 7 µl de una mezcla de: enzima transcriptasa reversa M-MLV (*Promega*), buffer de

reacción 5X (*Promega*), y agua, en proporciones 1:4:2. La reacción de RT se llevó a cabo durante 50 min a 37 °C y fue finalizada calentando a 70 °C durante 15 min en el termociclador. Para cada serie de muestras retrotranscriptas, se agregó un tubo correspondiente a un blanco de retrotranscripción constituido por los mismos componentes que el tubo con el RNA más concentrado, excepto por la enzima transcriptasa reversa, la cual se reemplazó por agua.

#### 5.8.3.2. Retrotranscripción de miRNA

Para retrotranscribir los miRNAs se utilizó la fracción de miRNA, cuya extracción se describe en Materiales y Métodos 5.8.2. Se utilizaron 250 ng de RNA por reacción y se completó con agua hasta llegar a 10 µl de mezcla de agua y RNA. Luego se agregó a cada tubo 3 µl de una mezcla de: dNTPs 10 mM, un oligonucleótido específico de miRNA (*stem-loop oligo*, SLO) 1 µM, y agua, en proporciones 1:1:1. Las muestras fueron calentadas a 65 °C por 5 min en un termociclador *Biorad* (*MyCycler™*). Luego se enfriaron durante 1 min en hielo y se les agregaron 7 µl de una mezcla de: enzima transcriptasa reversa M-MLV (*Promega*), buffer de reacción 5X (*Promega*), y agua, en proporciones 1:4:2. La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo: 16 °C por 30 min, 60 ciclos de 20 °C por 30 s, 42 °C por 30 s y 50 °C por 1 s, y por último se detuvo la reacción a 85 °C por 5 min. A cada serie de muestras retrotranscriptas, se le agregó también un tubo correspondiente a un blanco de retrotranscripción.

La utilización de SLOs para la RT de miRNAs fue previamente descrita (Chen et al., 2005). La secuencia del esqueleto del SLO fue gentilmente provista por el laboratorio de Javier Palatnik (Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario, Rosario, Argentina) y los SLOs específicos para cada miRNA se diseñaron manualmente y se detallan en el **Anexo 2**. En experimentos preliminares de puesta a punto de la técnica, se estableció que no era conveniente agrupar varios SLOs para la síntesis de más de un miRNA por cada reacción de RT debido a que interferían entre sí generando productos inespecíficos. Por tal motivo, cada reacción de RT consistió en no más de 4 SLOs diferentes y un *primer* específico para la retrotranscripción del RNA nuclear pequeño U6 (**Anexo 2**), utilizado como gen de referencia en la reacción de PCR (Materiales y Métodos 5.8.4).

#### 5.8.4. PCR en tiempo real (qPCR)

Las reacciones de qPCR se hicieron por separado para cada par de *primers*. De forma general cada una llevó 2,5 µl de buffer de reacción 10X (*Invitrogen*), 2,5 µl de mezcla de dNTPs 2 mM cada uno, 2 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 10 µl de mezcla de *primers* directo (F) y

reverso (R) 0,5  $\mu$ M cada uno, 0,2  $\mu$ l de enzima Taq polimerasa (*Invitrogen*). La mezcla de reacción fue llevada a un volumen final de 25  $\mu$ l con agua. La reacción de PCR se llevó a cabo en el equipo *Step One Plus* (*Applied Biosystems*) y consistió de los siguientes pasos: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, desnaturalización a 94 °C por 15 s, hibridización a 63 °C por 20 s, síntesis a 72 °C por 25 s (estos últimos 3 pasos se repitieron por 40 ciclos), y curva de fusión (desde 60 °C se aumentó la temperatura de a 0,5 °C hasta 95 °C y se midió la fluorescencia en cada punto).

Tanto los *primers* utilizados para la medición de mRNAs como para la medición de miRNAs, se detallan en el **Anexo 3**. Todos los pares de *primers* fueron puestos a punto en cuanto a la concentración de MgCl<sub>2</sub>, la dilución de cDNA y la temperatura de hibridización. Cada muestra fue analizada por duplicado o triplicado para cada gen. Se utilizó un *pool* de 3 genes de referencia consistentemente expresados entre muestras y se calculó la media geométrica de su expresión como valor de normalización. Los niveles de expresión en todos los casos se calcularon mediante el programa LinReg PCR ([Ruijter et al., 2009](#)).

#### 5.8.5. Electroforesis en gel de agarosa

Para poner a punto la eficiencia de los *primers* utilizados, fue necesario visualizar productos de PCR en geles de agarosa para chequear la presencia de una única banda que tuviera aproximadamente el tamaño esperado para cada producto. Las muestras fueron tratadas con 5  $\mu$ l de buffer de siembra (30% glicerol, 0,1  $\mu$ g/ml de *Orange G*) y sembradas en un gel de agarosa 1,5% en Buffer TBE (tris base 1,08%, ácido bórico 0,55%, EDTA 0,01%) con 1  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular de rango 100 - 12.000 pares de bases (*1 Kb Plus Ladder, ThermoFisher Scientific*). La electroforesis se realizó a 120 V en buffer TBE. El producto de PCR se visualizó y fotografió utilizando el equipo G-Box (*Syngene*).

### 5.9. Secuenciación masiva de RNAs pequeños

Para el experimento de secuenciación masiva de RNAs pequeños (*smallRNA-seq*) se trabajó con el hipotálamo de ratones NP-NE, HP-NE, NP-EE y HP-EE, de 8 semanas de edad (P56). Este estudio fue llevado a cabo en el Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR) en un secuenciador Illumina HiSeq 1500. Para cada tratamiento se usaron 2 réplicas biológicas (ratones de diferentes camadas), totalizando 8 muestras.

### 5.9.1. Obtención de RNAs pequeños para secuenciación

El primer paso para la secuenciación masiva fue obtener un alto grado de purificación de RNA total de hipotálamo. Para esto se utilizó el kit de *mirVana*<sup>™</sup> PARIS<sup>™</sup>, el cual está basado en un método de extracción por columna y permite obtener altos rendimientos de RNA total en una fracción que incluye a los RNAs pequeños. Se realizaron variadas pruebas hasta lograr un *RNA Integrity Number* (RIN) mayor a 8 analizado por medio del sistema Bioanalyzer 2100 Agilent.

### 5.9.2. Preparación de bibliotecas TruSeq

Para la preparación de bibliotecas de RNAs pequeños se usaron entre 4 y 5 µg de RNA total de hipotálamo extraído como se describió anteriormente (Materiales y Métodos 5.9.1). Se utilizó el kit *TruSeq Small RNA Library Prep Kit* (Illumina). El protocolo consistió de los siguientes pasos: ligación de adaptadores 5' y 3', retrotranscripción y amplificación de bibliotecas, y purificación del cDNA basado en gel de poliacrilamida. La ligación del adaptador 3' permite elegir como blanco a aquellos RNAs pequeños o miRNAs producto de la digestión por Dicer u otras enzimas procesadoras de RNA. Además, los adaptadores identifican a cada biblioteca generada con cada muestra con secuencias de 6 nt. La amplificación por PCR con *primers* específicos para los adaptadores aumenta la abundancia relativa de los elementos ligados. Por último, la purificación en gel de poliacrilamida permite separar los fragmentos de 147 pb y 157 pb, que corresponden originalmente a los RNAs pequeños de 22 y 30 nt, respectivamente, incluyendo ambos adaptadores. Estas dos bandas pueden juntarse para la secuenciación.

### 5.9.3. Secuenciación masiva en HiSeq 1500

Las bibliotecas de cDNA de todas las muestras fueron ubicadas en 1 celda (*lane*) de *rapid run* de Illumina, lo cual genera aproximadamente entre 100 y 150 millones de lecturas (*reads*) cuando se secuencian 50 bases desde un extremo del templado (1 x 50 *single reads*). Estos rendimientos son aceptables para secuenciación de RNAs pequeños. La referencia utilizada para la identificación de RNAs pequeños fue la base de datos miRBase v21 para el genoma de *Mus musculus* (mm10).

#### 5.9.4. Análisis bioinformático

Para el análisis de los datos obtenidos de la secuenciación masiva, primero se eliminaron las secuencias adaptadoras. Luego, se mapearon las lecturas a la base de datos de miRBase v21. El siguiente paso consistió en utilizar el método “TMM” (*Trimmed Mean of M values*) (Robinson and Oshlack, 2010) para normalizar el número de lecturas por el tamaño de las muestras. Esta estrategia empírica se basa en igualar la expresión de todos los genes de las muestras asumiendo que la mayoría de ellos no están diferencialmente expresados entre los tratamientos. Luego, se realizó un filtrado de microRNAs con bajo número de lecturas. La determinación del límite bajo el cual se descartan dichos miRNAs consistió en la maximización de la correlación entre el promedio de las réplicas de cada tratamiento para una comparación en particular. Por último, se eliminaron las secuencias correspondientes a isomiRs.

Para decidir qué miRNAs se encontraban diferencialmente expresados, se utilizó el paquete estadístico *NOISeq* (Tarazona et al., 2015), el cual está optimizado para, al menos, 2 réplicas biológicas. Este análisis calcula una distribución de probabilidad en base a la diferencia de expresión entre dos tratamientos y a la cantidad de lecturas para cada miRNA. Los miRNAs que superaron el valor de probabilidad de 0,95 fueron considerados como diferencialmente expresados.

Para la predicción de mRNAs blancos de miRNAs se utilizó la base de datos miRWalk 2.0 (Dweep and Gretz, 2015), que permite el uso simultáneo de varios algoritmos de predicción en una única búsqueda, lo cual es útil debido a las diferencias de especificidad y sensibilidad de cada algoritmo. Para aumentar la credibilidad de la predicción y disminuir el número de falsos positivos, se tomó el resultado predictivo de la intersección entre 9 algoritmos: miRWalk, MicroT4, miRanda, miRMap, miRNAMap, PITA, RNA22, RNAhybrid y TargetScan. Se restringió la búsqueda a los miRNAs que interactuaran con las regiones 3' UTR de los potenciales mRNAs blanco, y cuya secuencia de contacto estuviera limitada a la región “semilla” del miRNA (ver Introducción 1.4.2).

Las listas de genes blanco obtenidas de miRWalk 2.0 fueron utilizadas como input para el *software* ToppGene (Chen et al., 2009), que evalúa el enriquecimiento de vías celulares asociadas a los genes dados y los compara con el enriquecimiento que se esperaría por azar. Además, ToppGene permite analizar el enriquecimiento en los términos de *Gene Ontology* y evaluar cuáles son los dominios más representados divididos en tres categorías: componente celular (*cellular component*, CC), proceso biológico (*biological process*, BP) y

función molecular (*molecular function*, MF). Los resultados son estadísticamente analizados por una prueba de *False Discovery Rate* (FDR).

## 5.10. Análisis de la morfología de oligodendrocitos

Para evaluar la morfología de oligodendrocitos en ratones NP y HP sometidos postnatalmente a diferentes ambientes, se utilizó una cepa de ratones transgénicos que expresan la *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) bajo las órdenes del promotor del gen específico de oligodendrocitos, Plp. El análisis se limitó a los oligodendrocitos maduros de la corteza prefrontal medial (mPFC), y estuvo basado en reportes previos de evaluación morfológica de oligodendrocitos (Makinodan et al., 2012; Murtie et al., 2007).

### 5.10.1. Recolección de tejido

Los ratones fueron anestesiados con 2% tribromoetanol (Avertina) y perfundidos de forma intracardiaca con 4% paraformaldehído (PFA) en 0,1 mM *buffer* fosfato. Después de las perfusiones, el cerebro fue extraído y fijado en 4% PFA durante toda la noche a 4 °C. Luego, el cerebro fue transferido a *buffer* fosfato salino (PBS) y conservado a 4 °C hasta su disección en vibrátomo (Leica VT 1000 5). Las secciones coronales fueron cortadas a 150  $\mu\text{m}$  y montados portaobjetos (Superfrost Plus™) usando el medio de montaje Gel-Mount™. Para evitar la compresión del tejido una vez colocado el cubreobjetos se construyó un soporte con esmalte de uñas sobre el borde del portaobjetos.

### 5.10.2. Toma de imágenes con microscopía confocal

Los oligodendrocitos maduros de la mPFC fueron seleccionados al azar e identificados morfológicamente como tales por la presencia de internodos de mielina. Una vez seleccionados los oligodendrocitos, se utilizó un microscopio confocal de barrido láser (Zeiss LSM 700) para adquirir las *z-stacks* de todo el tejido a cortes ópticos de 0,75  $\mu\text{m}$  con un objetivo de  $\times 63$  (apertura numérica de 1,4).

### 5.10.3. Reconstrucción tridimensional de los oligodendrocitos

Los *z-stacks* obtenidos de la microscopía confocal fueron utilizados para reconstruir entre 4 y 6 oligodendrocitos por muestra con el paquete “*Simple Neurite Tracer*” del *software* de análisis de imágenes *Fiji (ImageJ)*. A partir del soma celular se siguieron todos los

procesos primarios con sus ramificaciones y las ubicaciones espaciales se guardaron independientemente para cada proceso primario. Al final de aproximadamente la mitad de las ramificaciones se registró el internodo de mielina correspondiente al oligodendrocito en análisis. Las ramificaciones que terminaron o no en internodos fueron también contabilizadas y ambas englobadas con el nombre de *típs* o puntas. Los internodos se identificaron por la presencia de nodos de Ranvier y por ser ligeramente más gruesos que los procesos. Se generó un archivo de ubicaciones espaciales para cada internodo. Las células que no se encontraban completas fueron excluidas del análisis si, durante la reconstrucción, un proceso o un internodo se extendía más allá del volumen de las *z-stacks* en cualquier eje (x, y, z).

Se analizaron los siguientes parámetros: cantidad de internodos por célula, longitud promedio de los internodos, suma de la longitud de internodos, internodos sobre puntas, puntas por célula, longitud total de los procesos, longitud promedio de los procesos, ramificaciones por célula, y máximo orden de ramificación. El análisis de los parámetros evaluados se realizó con el *software* “*L-Measure*” basado en el lenguaje de programación *Java*.

## 5.11. Tinciones histológicas

### 5.11.1. Tinción Klüver-Barrera – Luxol Fast Blue

Para teñir la mielina en cortes de cerebro de ratón a la altura del Bregma 0,38 al 0,5, se utilizó la técnica de Klüver-Barrera en base a un protocolo modificado de estudios previos (Aldana Marcos et al., 1996; Piorkowska et al., 2014). Se utilizaron secciones de 50  $\mu\text{m}$  de espesor cortadas en vibrátomo y montadas en portaobjetos con doble baño de gelatina. Los cortes se secaron a 37 °C por durante toda la noche. Luego, se hidrataron con alcohol 100% y 96%, sucesivamente. Se mantuvieron en solución Luxol *Fast Blue* durante toda la noche a 60 °C. Luego de dejarlos llegar a temperatura ambiente se los pasó a una solución de alcohol 96% y se los sumergió rápidamente en una solución saturada de carbonato de litio, para comenzar la diferenciación. Se pasaron a agua destilada hasta que terminó la diferenciación, observando a la lupa que la sustancia blanca permanecía azul y la sustancia gris se decoloraba. De ser necesario, se repitió varias veces este procedimiento. Se terminó la diferenciación en etanol 70%, en el cual se elimina la tinción inespecífica, aumentando de esta forma el contraste. Posteriormente, los cortes se deshidrataron por pasajes sucesivos en alcoholes de graduación creciente (etanol 96% y 100%), diferenciando

la coloración en alcohol 96%. Se aclaró en xilol y se montaron con bálsamo de Canadá sintético. La observación y toma de fotos de los cortes se realizó en un microscopio óptico común acoplado a una cámara fotográfica. La solución de Luxol *Fast Blue* se preparó pesando 1 g de solvente y disolviéndolo en 100 ml de etanol 96% y 0,5 ml de ácido acético al 10%. Luego, se filtró en papel Watman.

## 5.12. Análisis estadístico

Los test estadísticos utilizados en esta tesis están descritos en las leyendas de las figuras. Cuando se compararon 2 grupos, se testeó normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks y homocedasticidad utilizando la prueba de Levene. Cuando los datos cumplieron con ambos principios se realizó un test *t*-Student. En caso de no cumplir con los criterios de homocedasticidad se realizó la corrección de Welch. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney en caso de que la distribución no fuera normal. Para parámetros analizados durante una serie de días o sesiones en el mismo individuo se utilizó un diseño de ANOVA de dos factores con medidas repetidas, con un test *a posteriori* de Tukey para comparar entre tratamientos a diferentes días. En caso de resultar significativa la interacción entre los dos factores, no se informó la significancia de los efectos principales y se procedió a informar el resultado de los contrastes directamente. Para la evaluación del desarrollo físico, peso y reflejo de enderezamiento de la F1, se realizó un promedio de las observaciones de todos los individuos de la camada para cada variable, siendo N el número de camadas analizadas. En los test realizados luego del destete, N fue el número de individuos estudiados. No se utilizaron más de 3 individuos de la misma camada para los mismos.

Para la medición de genes y parámetros de conducta, se testeó normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks y homocedasticidad utilizando la prueba de Levene. Cuando los datos cumplieron con ambos principios se realizó un ANOVA de dos factores que incluyera a la dieta materna (NP o HP) y al ambiente postdestete (NE o EE), con un test *a posteriori* de Tukey para comparar los tratamientos particulares.

Para el análisis de los parámetros de distancia y área en los cortes teñidos con Luxol, se utilizaron entre 3 y 6 ratones por tratamiento. Para el análisis de la morfología de oligodendroctios se utilizaron entre 4 y 5 células de cada animal, y se usaron entre 3 y 4 animales de distintas camadas por tratamiento. Tanto para las tinciones de Luxol como

para la morfología de oligodendrocitos, el análisis estadístico fue el mismo que para los experimentos de expresión génica y conducta.

Los datos fueron testeados con el método de Grub con el fin de detectar la presencia de *outliers*. Los datos que fueron considerados *outliers* ( $\alpha = 0,05$ ) fueron removidos del set antes de realizar el análisis estadístico.

## 6. Bibliografía

Ahima, R.S., and Harlan, R.E. (1990). Charting of Type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* *39*, 579–604.

Akana, S.F., Dallman, M.F., Bradbury, M.J., Scribner, K.A., Strack, A.M., and Walker, C.D. (1992). Feedback and facilitation in the adrenocortical system: unmasking facilitation by partial inhibition of the glucocorticoid response to prior stress. *Endocrinology* *131*, 57–68.

Akana, S.F., Chu, A., Soriano, L., and Dallman, M.F. (2001). Corticosterone exerts site-specific and state-dependent effects in prefrontal cortex and amygdala on regulation of adrenocorticotrophic hormone, insulin and fat depots. *J. Neuroendocrinol.* *13*, 625–637.

Alamy, M., and Bengelloun, W.A. (2012). *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Malnutrition and brain development: An analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. *36*, 1463–1480.

Aldana Marcos, H.J., Ferrari, C.C., Benitez, I., and Affanni, J.M. (1996). Standardization of fixation, processing and staining methods for the central nervous system of vertebrates. *Biocell* *20*, 265–272.

Alikhani-koopaei, R., Fouladkou, F., Frey, F.J., Frey, B.M., and Alikhani-koopaei, Rasoul Fouladkou, F. (2004). Epigenetic regulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression. October *114*, 1146–1157.

Allen, C.D., Rivier, C.L., and Lee, S.Y. (2011). Adolescent alcohol exposure alters the central brain circuits known to regulate the stress response. *Neuroscience* *182*, 162–168.

Altman, J., Das, G.D., and Sudarshan, K. (1970). The Influence of Nutrition on Neural and Behavioral Development. I. Critical Review of Some Data on the Growth of the Body and the Brain Following Dietary Deprivation During Gestation and Lactation. *Dev. Psychobiol.* *3*, 281–301.

Andrews, M.H., and Matthews, S.G. (2004). Programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: serotonergic involvement. *Stress* *7*, 15–27.

Antoni, F.A. (1986). Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr. Rev.* *7*, 351–378.

Arriza, J.L., Simerly, R.B., Swanson, L.W., and Evans, R.M. (1988). The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron* *1*, 887–900.

Ashraf, S.I., McLoon, A.L., Sclarsic, S.M., and Kunes, S. (2006). Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell* *124*, 191–205.

Attig, L., Gabory, a, and Junien, C. (2010). Nutritional developmental epigenomics: immediate and long-lasting effects. *Proc. Nutr. Soc.* *69*, 221–231.

Auger, C.J., Coss, D., Auger, A.P., and Forbes-Lorman, R.M. (2011). Epigenetic control of vasopressin expression is maintained by steroid hormones in the adult male rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4242–4247.

Babapoor, S., Fleming, E., Wu, R., and Dadras, S.S. (2014). A novel mir-451a isomir, associated with amelanotypic phenotype, acts as a tumor suppressor in melanoma by retarding cell migration and invasion. *PLoS One* *9*, e120.

- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Belloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other microprocessor-independent, dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* *22*, 2773–2785.
- Balbus, J.M., Barouki, R., Birnbaum, L.S., Etzel, R.A., Gluckman, P.D.S., Grandjean, P., Hancock, C., Hanson, M.A., Heindel, J.J., Hoffman, K., et al. (2013). Early-life prevention of non-communicable diseases. *Lancet (London, England)* *381*, 3–4.
- Bale, T.L., and Epperson, C.N. (2015). Sex differences and stress across the lifespan. *18*, 35–42.
- Bale, T.L., Baram, T.Z., Brown, A.S., Goldstein, J.M., Insel, T.R., McCarthy, M.M., Nemeroff, C.B., Reyes, T.M., Simerly, R.B., Susser, E.S., et al. (2010). Early Life Programming and Neurodevelopmental Disorders. *Biol. Psychiatry* *68*, 314–319.
- Banerjee, S., Neveu, P., and Kosik, K.S. (2009). A Coordinated Local Translational Control Point at the Synapse Involving Relief from Silencing and MOV10 Degradation. *Neuron* *64*, 871–884.
- Bangalore, L. (2007). *Brain development* (New York: Chelsea House Publishers).
- Barañano, D.E., and Snyder, S.H. (2001). Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 10996–11002.
- Barbazanges, A., Piazza, P. V, Le Moal, M., and Maccari, S. (1996). Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J. Neurosci.* *16*, 3943–3949.
- Barker, D.J.P. (1998). *Mothers, Babies and Health in Later Life* (Churchill Livingstone).
- Barker, G.R.I., and Warburton, E.C. (2011). When Is the Hippocampus Involved in Recognition Memory? *J. Neurosci.* *31*, 10721–10731.
- Barnea-Goraly, N., Menon, V., Eckert, M., Tamm, L., Bammner, R., Karchemskiy, A., Dant, C.C., and Reiss, A.L. (2005). White matter development during childhood and adolescence: A cross-sectional diffusion tensor imaging study. *Cereb. Cortex* *15*, 1848–1854.
- Barnes, R.H., Cunnold, S.R., Zimmermann, R.R., Simmons, H., MacLeod, R.B., and Krook, L. (1966). Influence of nutritional deprivations in early life on learning behavior of rats as measured by performance in a water maze. *J. Nutr.* *89*, 399–410.
- Baroncelli, L., Braschi, C., Spolidoro, M., Begenisic, T., Sale, a, and Maffei, L. (2010). Nurturing brain plasticity: impact of environmental enrichment. *Cell Death Differ.* *17*, 1092–1103.
- Barrett, E.S., and Swan, S.H. (2015). Stress and androgen activity during fetal development. *Endocrinology* *156*, 3435–3441.
- Barrett, K.C., Ashley, R., Strait, D.L., and Kraus, N. (2013). Art and science: how musical training shapes the brain. *Front. Psychol.* *4*, 1–13.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* *136*, 215–233.
- Bateson, P. (2015). Why are individuals so different from each other? *Heredity (Edinb.)* *115*, 285–292.
- Bateson, P., Gluckman, P., and Hanson, M. (2014). The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. *J. Physiol.* *592*, 2357–2368.
- Battistini, C., and Tamagnone, L. (2016). Transmembrane semaphorins, forward and reverse signaling: Have a look both ways. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 1609–1622.

- Van Battum, E.Y., Brignani, S., and Pasterkamp, R.J. (2015). Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol.* *14*, 532–546.
- Belluscio, L.M., Berardino, B.G., Ferroni, N.M., Ceruti, J.M., and Cánepa, E.T. (2014). Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. *Physiol. Behav.* *129*, 237–254.
- Ben-Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Caillard, O., and Gaiarsa, J.L. (1997). GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated “ménage à trois.” *Trends Neurosci.* *20*, 523–529.
- Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., Yaniv, I., and Pick, C.G. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 1341–1347.
- Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian Mirtron Genes. *Mol. Cell* *28*, 328–336.
- Bernard, F., Moreau-Fauvarque, C., Heitz-Marchaland, C., Zagar, Y., Dumas, L., Fouquet, S., Lee, X., Shao, Z., Mi, S., and Chédotal, A. (2012). Role of transmembrane semaphorin Sema6A in oligodendrocyte differentiation and myelination. *Glia* *60*, 1590–1604.
- Bernardo, J. (1996). Maternal Effects in Animal Ecology 1. *Amer. Zool.* *36*, 83–105.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363–366.
- Bhatnagar, S., Huber, R., Nowak, N., and Trotter, P. (2002). Lesions of the posterior paraventricular thalamus block habituation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to repeated restraint. *J. Neuroendocrinol.* *14*, 403–410.
- Bicker, S., Lackinger, M., Weiß, K., and Schratz, G. (2014). MicroRNA-132, -134, and -138: a microRNA troika rules in neuronal dendrites. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 3987–4005.
- Bingham, B., and Viau, V. (2008). Neonatal gonadectomy and adult testosterone replacement suggest an involvement of limbic arginine vasopressin and androgen receptors in the organization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* *149*, 3581–3591.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* *10*, 185–191.
- Bonatto, F., Polydoro, M., Andrades, M.E., da Frota Júnior, M.L.C., Dal-Pizzol, F., Rotta, L.N., Souza, D.O., Perry, M.L., and Moreira, J.C.F. (2005). Effect of protein malnutrition on redox state of the hippocampus of rat. *Brain Res.* *1042*, 17–22.
- Bredy, T.W., Lin, Q., Wei, W., Baker-Andresen, D., and Mattick, J.S. (2011). MicroRNA regulation of neural plasticity and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* *96*, 89–94.
- Burton, P.J., and Waddell, B.J. (1999). Dual function of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in placenta: modulating placental glucocorticoid passage and local steroid action. *Biol. Reprod.* *60*, 234–240.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* *10*, 1957–1966.
- Callahan, H.S., Pigliucci, M., and Schlichting, C.D. (1997). Developmental phenotypic plasticity: where ecology and evolution meet molecular biology. *Bioessays* *19*, 519–525.

- Campbell, L.F., and Bedi, K.S. (1989). The effects of undernutrition during early life on spatial learning. *Physiol. Behav.* *45*, 883–890.
- Campos, C., Sundaram, A.Y., Valente, L.M., Conceição, L.E., Engrola, S., and Fernandes, J.M. (2014). Thermal plasticity of the miRNA transcriptome during Senegalese sole development. *BMC Genomics* *15*, 525.
- Cao, L., Liu, X., Lin, E.-J.D., Wang, C., Choi, E.Y., Riban, V., Lin, B., and Durning, M.J. (2010). Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell* *142*, 52–64.
- Caputo, V., Sinibaldi, L., Fiorentino, A., Parisi, C., Catalanotto, C., Pasini, A., Cogoni, C., and Pizzuti, A. (2011). Brain derived neurotrophic factor (BDNF) expression is regulated by microRNAs miR-26a and miR-26b allele-specific binding. *PLoS One* *6*.
- Caronia-Brown, G., Anderegg, A., and Awatramani, R. (2016). Expression and functional analysis of the Wnt/beta-catenin induced mir-135a-2 locus in embryonic forebrain development. *Neural Dev.* *11*, 9.
- Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* *136*, 642–655.
- Casey, B.J., Epstein, J.N., Buhle, J., Liston, C., Davidson, M.C., Tonev, S.T., Spicer, J., Niogi, S., Millner, A.J., Reiss, A., et al. (2007). Frontostriatal connectivity and its role in cognitive control in parent-child dyads with ADHD. *Am. J. Psychiatry* *164*, 1729–1736.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T.E., Taylor, A., Craig, I.W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., et al. (2003). A Polymorphism in the 5-HTT Gene Influence of Life Stress on Depression: Moderation. *Science* *301*, 386–389.
- Castro, C.A., Tracy, M., and Rudy, J.W. (1989). Early-life undernutrition impairs the development of the learning and short-term memory processes mediating performance in a conditional-spatial discrimination task. *Behav. Brain Res.* *32*, 255–264.
- Champagne, F.A. (2008). Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Front. Neuroendocrinol.* *29*, 386–397.
- Champagne, F.A., Weaver, I.C.G., Diorio, J., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M.J. (2006). Maternal care associated with methylation of the estrogen receptor- $\beta$ 1b promoter and estrogen receptor- $\beta$  expression in the medial preoptic area of female offspring. *Endocrinology* *147*, 2909–2915.
- Chen, C., Ridzon, D. a., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., et al. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* *33*, 1–9.
- Chen, J., Bardes, E.E., Aronow, B.J., and Jegga, A.G. (2009). ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. *Nucleic Acids Res.* *37*, 305–311.
- Cheng, X., Ku, C.-H., and Siow, R.C.M. (2013). Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* *64*, 4–11.
- Chertoff, M. (2014). Protein Malnutrition and Brain Development. *Brain Disord Ther* *4*.
- Chi, S.W., Zang, J.B., Mele, A., and Darnell, R.B. (2009). Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA–mRNA interaction maps. *Nat.* *460*, 479–486.
- Chiang, H.R., Schoenfeld, L.W., Ruby, J.G., Auyeung, V.C., Spies, N., Baek, D., Johnston,

W.K., Russ, C., Luo, S., Babiarz, J.E., et al. (2010). Mammalian microRNAs: Experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev.* *24*, 992–1009.

Chorpita, B.F., and Barlow, D.H. (1998). The development of anxiety: the role of control in the early environment. *Psychol. Bull.* *124*, 3–21.

Chu, Y.-Y., Ko, C.-Y., Wang, W.-J., Wang, S.-M., Gean, P.-W., Kuo, Y.-M., and Wang, J.-M. (2015). Astrocytic CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\delta$  Regulates Neuronal Viability and Spatial Learning Ability via miR-135a. *Mol. Neurobiol.* 00–00.

Clancy, B., Finlay, B.L., Darlington, R.B., and Anand, K.J.S. (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* *28*, 931–937.

Coarfa, C., Fiskus, W., Eedunuri, V.K., Rajapakshe, K., Foley, C., Chew, S.A., Shah, S.S., Geng, C., Shou, J., Mohamed, J.S., et al. (2015). Comprehensive proteomic profiling identifies the androgen receptor axis and other signaling pathways as targets of microRNAs suppressed in metastatic prostate cancer. *Oncogene* 1–12.

Codocedo, J.F., and Inestrosa, N.C. (2016). Environmental control of microRNAs in the nervous system: Implications in plasticity and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *60*, 121–138.

Cooke, B.M., and Woolley, C.S. (2005). Gonadal hormone modulation of dendrites in the mammalian CNS. *J. Neurobiol.* *64*, 34–46.

Coupé, B., Amarger, V., Grit, I., Benani, A., and Parnet, P. (2010). Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* *151*, 702–713.

Crick, F.H.C. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* *227*, 561–563.

Cullinan, W.E., Herman, J.P., and Watson, S.J. (1993). Ventral subicular interactions with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* *332*, 1–20.

Dahlöf, L.-G., Hård, E., and Larsson, K. (1978). Influence of maternal stress on the development of the fetal genital system. *Physiol. Behav.* *20*, 193–195.

Dallman, M.F., Pecoraro, N., Akana, S.F., la Fleur, S.E., Gomez, F., Houshyar, H., Bell, M.E., Bhatnagar, S., Laugero, K.D., and Manalo, S. (2003). Chronic stress and obesity: A new view of “comfort food.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 11696–11701.

Dallman, M.F., and Yates, F.E. (1969). Dynamic Asymmetries in the Corticosteroid Feedback Path and Distribution Metabolism???Binding Elements of the Adrenocortical System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *156*, 696–721.

Danka Mohammed, C.P., Rhee, H., Phee, B.K., Kim, K., Kim, H.J., Lee, H., Park, J.H., Jung, J.H., Kim, J.Y., Kim, H.C., et al. (2016). miR-204 downregulates EphB2 in aging mouse hippocampal neurons. *Aging Cell* *15*, 380–388.

Daskalakis, N.P., Bagot, R.C., Parker, K.J., Vinkers, C.H., and de Kloet, E.R. (2013). The three-hit concept of vulnerability and resilience: Toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology* *38*, 1858–1873.

Davidson, R.J., and McEwen, B.S. (2012). Social influences on neuroplasticity: stress and interventions to promote well-being. *Nat. Neurosci.* *15*, 689–695.

Desaulniers, A.T., Lamberson, W.R., and Safranski, T.J. (2016). Prenatal heat stress reduces male anogenital distance at birth and adult testis size, which are rescued by concurrent maternal *Artemisia absinthium* consumption. *57*, 84–91.

- Diamond, M.C., Ingham, C.A., Johnson, R.E., Bennett, E.L., and Rosenzweig, M.R. (1976). Effects of environment on morphology of rat cerebral cortex and hippocampus. *J Neurobiol* 7, 75–85.
- Díaz-Cintra, S., García-Ruiz, M., Corkidi, G., and Cintra, L. (1994). Effects of prenatal malnutrition and postnatal nutritional rehabilitation on CA3 hippocampal pyramidal cells in rats of four ages. *Brain Res.* 662, 117–126.
- Dore, S., Takahashi, M., Ferris, C.D., Zakhary, R., Hester, L.D., Guastella, D., and Snyder, S.H. (1999). Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2445–2450.
- Duan, P., Sun, S., Li, B., Huang, C., Xu, Y., Han, X., Xing, Y., and Yan, W. (2014). miR-29a modulates neuronal differentiation through targeting REST in mesenchymal stem cells. *PLoS One* 9, 1–8.
- Dweep, H., and Gretz, N. (2015). miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* 12, 697–697.
- Earl Gray, L., Wilson, V.S., Stoker, T., Lambright, C., Furr, J., Noriega, N., Howdeshell, K., Ankley, G.T., Guillette, L., Lyons, G., et al. (2006). Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. In *International Journal of Andrology*, pp. 96–104.
- Ebert, M.S., and Sharp, P.A. (2012). Roles for MicroRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* 149, 505–524.
- Eisenberg, M.L., Hsieh, M.H., Walters, R.C., Krasnow, R., and Lipshultz, L.I. (2011). The Relationship between Anogenital Distance, Fatherhood, and Fertility in Adult Men. *PLoS One* 6, e18973.
- Fagiolini, M., Jensen, C.L., and Champagne, F.A. (2009). Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 207–212.
- FAO, IFAD, and WFP. (2015). The State of Food Insecurity in the World: Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress.
- Farah, M.J., Shera, D.M., Savage, J.H., Betancourt, L., Giannetta, J.M., Brodsky, N.L., Malmud, E.K., and Hurt, H. (2006). Childhood poverty: specific associations with neurocognitive development. *Brain Res.* 1110, 166–174.
- Favrais, G., Van De Looij, Y., Fleiss, B., Ramanantsoa, N., Bonnin, P., Stoltenburg-Didingier, G., Lacaud, A., Saliba, E., Dammann, O., Gallego, J., et al. (2011). Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann. Neurol.* 70, 550–565.
- Feldman, S., Conforti, N., and Weidenfeld, J. (1995). Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 19, 235–240.
- Feng, J., Fouse, S., and Fan, G. (2007). Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. *Pediatr. Res.* 61, 58–63.
- Fernandez-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Nunez, J.F., Goma, M., Driscoll, P., and Tobena, A. (1992). Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically-selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neurosci. Lett.* 137, 185–188.
- Ferroni, N.M. (2014). Evaluación de la persistencia de deficiencias cognitivas, socio-emotivas y neuromusculares observadas en ratones sometidos a malnutrición proteica durante la etapa perinatal. Universidad de Buenos Aires.

Fields, R.D. (2008). White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci.* *31*, 361–370.

Figueiredo, H.F., Bodie, B.L., Tauchi, M., Dolgas, C.M., and Herman, J.P. (2003). Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* *144*, 5249–5258.

Figueiredo, Í.L., Frota, P.B., da Cunha, D.G., da Silva Raposo, R., Canuto, K.M., de Andrade, G.M., Sousa, N., Moore, S.R., Anstead, G.M., Alvarez-Leite, J.I., et al. (2016). Prolonged maternal separation induces undernutrition and systemic inflammation with disrupted hippocampal development in mice. *Nutrition* *32*, 1019–1027.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* *9*, 102–114.

Finnerty, J.R., Wang, W.X., Hébert, S.S., Wilfred, B.R., Mao, G., and Nelson, P.T. (2010). The miR-15/107 group of MicroRNA genes: Evolutionary biology, cellular functions, and roles in human diseases. *J. Mol. Biol.* *402*, 491–509.

Fiore, R., Khudayberdiev, S., Christensen, M., Siegel, G., Flavell, S.W., Kim, T.-K., Greenberg, M.E., Schratt, G., Bagni, C., Greenough, W., et al. (2009). Mef2-mediated transcription of the miR379–410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *EMBO J.* *28*, 697–710.

Fiorenza, A., and Barco, A. (2016). Role of Dicer and the miRNA system in neuronal plasticity and brain function. *Neurobiol. Learn. Mem.* *135*, 3–12.

Forsman, a (2014). Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species. *Heredity (Edinb.)* *115*, 1–9.

Foster, P.M.D. (2006). Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int. J. Androl.* *29*, 140-147-185.

Fox, C., Merali, Z., and Harrison, C. (2006). Therapeutic and protective effect of environmental enrichment against psychogenic and neurogenic stress. *Behav. Brain Res.* *175*, 1–8.

Francis, D.D., Diorio, J., Plotsky, P.M., and Meaney, M.J. (2002). Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J. Neurosci.* *22*, 7840–7843.

Franklin, T.B., Saab, B.J., and Mansuy, I.M. (2012). Neural Mechanisms of Stress Resilience and Vulnerability. *Neuron* *75*, 747–761.

Freud, S., and Bunker, H.A. (1936). *The Problem of Anxiety* (Psychoanalytic Quarterly Press : W. W. Norton).

Freud, S., and Strachey, J. (1949). *An Outline of Psychoanalysis* (W. W. Norton).

Friedman, R.C., Farh, K.K.H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.

Fukuda, S., and Taga, T. (2005). Cell fate determination regulated by a transcriptional signal network in the developing mouse brain. *Anat. Sci. Int. / Japanese Assoc. Anat.* *80*, 12–18.

Gage, F.H. (2012). Mammalian Neural Stem Cells. *Science (80-. )*. *287*, 1433–1438.

Gale, C.R., Jiang, B., Robinson, S.M., Godfrey, K.M., Law, C.M., and Martyn, C.N. (2006). Maternal diet during pregnancy and carotid intima-media thickness in children. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 1877–1882.

Galler, J.R., Ramsey, F.C., Forde, V., Salt, P., and Archer, E. (1987). Long-term effects of early kwashiorkor compared with marasmus. II. Intellectual performance. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *6*, 847–854.

Gao, F.-B. (2010). Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal development. *Neural Dev.* *5*, 25.

Gao, J., Wang, W.-Y., Mao, Y.-W., Gräff, J., Guan, J.-S., Pan, L., Mak, G., Kim, D., Su, S.C., and Tsai, L.-H. (2010). A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* *466*, 1105–1109.

Gerardin, D.C.C., Pereira, O.C.M., Kempinas, W.G., Florio, J.C., Moreira, E.G., and Bernardi, M.M. (2005). Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. *Physiol. Behav.* *84*, 97–104.

Geuze, E., Vermetten, E., and Bremner, J.D. (2005). MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* *10*, 160–184.

Gianatiempo, O. (2016). Impacto multigeneracional de la malnutrición proteica en ratones. Universidad de Buenos Aires.

Gilbertson, M.W., Shenton, M.E., Ciszewski, A., Kasai, K., Lasko, N.B., Orr, S.P., and Pitman, R.K. (2002). Smaller hippocampal volume predicts pathologic vulnerability to psychological trauma. *Nat. Neurosci.* *5*, 1242–1247.

Giusti, S.A., Vogl, A.M., Brockmann, M.M., Vercelli, C.A., Rein, M.L., Trümbach, D., Wurst, W., Cazalla, D., Stein, V., Deussing, J.M., et al. (2014). MicroRNA-9 controls dendritic development by targeting REST. 1–22.

Globus, A., Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., and Diamond, M.C. (1973). Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *J. Comp. Physiol. Psychol.* *82*, 175–181.

Glover, V., and Hill, J. (2012). Sex differences in the programming effects of prenatal stress on psychopathology and stress responses: An evolutionary perspective. *Physiol. Behav.* *106*, 736–740.

Gluckman, P.D., Lillycrop, K. a, Vickers, M.H., Pleasants, A.B., Phillips, E.S., Beedle, A.S., Burdge, G.C., and Hanson, M. a (2007). Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 12796–12800.

Gluckman, P.D., Hanson, M.A., Bateson, P., Beedle, A.S., Law, C.M., Bhutta, Z.A., Anokhin, K. V., Bougnères, P., Chandak, G.R., Dasgupta, P., et al. (2009). Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. *Lancet* *373*, 1654–1657.

Godfrey, K.M., Sheppard, A., Gluckman, P.D., Lillycrop, K.A., Burdge, G.C., McLean, C., Rodford, J., Slater-Jefferies, J.L., Garratt, E., Crozier, S.R., et al. (2011). Epigenetic gene promoter methylation at birth is associated with child's later adiposity. *Diabetes* *60*, 1528–1534.

Gomez, J.L., and Luine, V.N. (2014). Female rats exposed to stress and alcohol show impaired memory and increased depressive-like behaviors. *Physiol. Behav.* *123*, 47–54.

Gould, S.J., and Eldredge, N. (1972). Punctuated equilibria: an alternative to phyletic gradualism.

Gould, S.J., and Lewontin, R.C. (1979). The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* *205*, 581–598.

Greenough, T., Science, N., and Grant, F. (1973). Pattern of Dendritic Reared Branching in Complex in Occipital Cortex Environments of Rats. *504*, 491–504.

Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235–240.

Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F., and Kay, M.A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* *441*, 537–541.

Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* *106*, 23–34.

de Groot, R.H.M., Stein, A.D., Jolles, J., van Boxtel, M.P.J., Blauw, G.J., van de Bor, M., and Lumey, L.H. (2011). Prenatal famine exposure and cognition at age 59 years. *Int. J. Epidemiol.* *40*, 327–337.

Gu, Q.-H., Yu, D., Hu, Z., Liu, X., Yang, Y., Luo, Y., Zhu, J., and Li, Z. (2015). miR-26a and miR-384-5p are required for LTP maintenance and spine enlargement. *Nat. Commun.* *6*, 6789.

Gu, S., Jin, L., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, F., Valdmanis, P.N., and Kay, M.A. (2012). The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. *Cell* *151*, 900–911.

Guidotti, a, Auta, J., Davis, J.M., Dong, E., Gavin, D.P., Grayson, D.R., Sharma, R.P., Smith, R.C., Tueting, P., and Zhubi, a (2014). Toward the identification of peripheral epigenetic biomarkers of schizophrenia. *J. Neurogenet.* *28*, 41–52.

Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 509–524.

Hales, C.N., and Barker, D.J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* *35*, 595–601.

Hales, C.N., and Barker, D.J. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull.* *60*, 5–20.

Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., and Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a Link Between Genetic and Biochemical Analyses of RNAi. *Science* (80-. ). *293*, 1146–1150.

Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., and Kim, V.N. (2006). Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* *125*, 887–901.

Hawasli, A.H., Benavides, D.R., Nguyen, C., Kansy, J.W., Hayashi, K., Chambon, P., Greengard, P., Powell, C.M., Cooper, D.C., and Bibb, J.A. (2007). Cyclin-dependent kinase 5 governs learning and synaptic plasticity via control of NMDAR degradation. *Nat. Neurosci.* *10*, 880–886.

Hazin, A.N., Bezerra Alves, J.G., and Falbo, A.R. (2007). the Myelination Process in Severely Malnourished Children: Mri Findings. *Int. J. Neurosci.* *117*, 1209–1214.

Heckman, J.J., Pinto, R., and Savelyev, P. a. (2012). Understanding the mechanisms through which an influential early Childhood program boosted Adult outcomes. *Zhurnal Eksp. I Teor. Fiz.* *103*, 46.

- Heijmans, B.T., Tobi, E.W., Stein, A.D., Putter, H., Blauw, G.J., Susser, E.S., Slagboom, P.E., and Lumey, L.H. (2008). Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 17046–17049.
- Heilbronner, S.R., and Haber, S.N. (2014). Frontal Cortical and Subcortical Projections Provide a Basis for Segmenting the Cingulum Bundle: Implications for Neuroimaging and Psychiatric Disorders. *J. Neurosci.* *34*, 10041–10054.
- Heim, C., and Nemeroff, C.B. (2009). Neurobiology of posttraumatic stress disorder. *CNS Spectr.* *14*, 13–24.
- Heindel, J.J., and Vandenberg, L.N. (2015). Developmental origins of health and disease: a paradigm for understanding disease cause and prevention. *Curr. Opin. Pediatr.* *27*, 248–253.
- Hendershott, T.R., Cronin, M.E., Langella, S., McGuinness, P.S., and Basu, A.C. (2016). Effects of environmental enrichment on anxiety-like behavior, sociability, sensory gating, and spatial learning in male and female C57BL/6J mice. *Behav. Brain Res.* *314*, 215–225.
- Henderson, N.D. (1970). Brain weight increases resulting from environmental enrichment: a directional dominance in mice. *Science* *169*, 776–778.
- Herman, J.P. (1993). Regulation of adrenocorticosteroid receptor mRNA expression in the central nervous system. *Cell. Mol. Neurobiol.* *13*, 349–372.
- Herman, J.P., and Cullinan, W.E. (1997). Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo- pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* *20*, 78–84.
- Herman, J.P., Prewitt, C.M., and Cullinan, W.E. (1996). Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit. Rev. Neurobiol.* *10*, 371–394.
- Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, N.K., and Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary- adrenocortical axis. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* *29*, 1201–1213.
- Hirase, H., and Shinohara, Y. (2014). Transformation of cortical and hippocampal neural circuit by environmental enrichment. *Neuroscience* *280*, 282–298.
- Hoet, J.J., and Hanson, M.A. (1999). Intrauterine nutrition: Its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J. Physiol.* *514*, 617–627.
- Hu, H.Y., Yan, Z., Xu, Y., Hu, H., Menzel, C., Zhou, Y.H., Chen, W., and Khaitovich, P. (2009). Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* *10*, 413.
- Huber, R.C., Kolb, A.F., Lillico, S.G., Carlisle, A., Sandøe, P., Sørensen, D.B., Remuge, L., Whitelaw, C.B.A., and Olsson, I.A.. (2013). Behaviour of postnatally growth-impaired mice during malnutrition and after partial weight recovery. *Nutr. Neurosci.* *16*, 125–134.
- Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 99–110.
- Ickes, B.R., Pham, T.M., Sanders, L.A., Albeck, D.S., Mohammed, A.H., and Granholm, A.-C. (2000). Long-Term Environmental Enrichment Leads to Regional Increases in Neurotrophin Levels in Rat Brain. *Exp. Neurol.* *164*, 45–52.
- Ignacio, C., Mooney, S.M., and Middleton, F.A. (2014). Effects of Acute Prenatal Exposure to Ethanol on microRNA Expression are Ameliorated by Social Enrichment. *Front. Pediatr.* *2*, 103.
- Irvine, G.I., Logan, B., Eckert, M., and Abraham, W.C. (2006). Enriched environment

exposure regulates excitability, synaptic transmission, and LTP in the dentate gyrus of freely moving rats. *Hippocampus* *16*, 149–160.

Ismail, F.Y., Fatemi, A., and Johnston, M. V (2017). Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* *21*, 23–48.

Iyer, A.N., Bellon, A., and Baudet, M.-L. (2014). microRNAs in axon guidance. *Front. Cell. Neurosci.* *8*, 1–14.

Jiang, Y., Langley, B., Lubin, F.D., Renthal, W., Wood, M.A., Yasui, D.H., Kumar, A., Nestler, E.J., Akbarian, S., and Beckel-Mitchener, A.C. (2008). Epigenetics in the nervous system. *J. Neurosci.* *28*, 11753–11759.

Johnson, S.B., Riis, J.L., and Noble, K.G. (2016). State of the Art Review: Poverty and the Developing Brain. *Pediatrics* *137*, 1–17.

Johnston, M. V. (2004). Clinical disorders of brain plasticity. *Brain Dev.* *26*, 73–80.

Johnston, M. V., Ishida, A., Ishida, W.N., Matsushita, H.B., Nishimura, A., and Tsuji, M. (2009). Plasticity and injury in the developing brain. *Brain Dev.* *31*, 1–10.

Jones, a P., and Friedman, M.I. (1982). Obesity and adipocyte abnormalities in offspring of rats undernourished during pregnancy. *Science* *215*, 1518–1519.

Jordan, T.C., Cane, S.E., and Howells, K.F. (1981). Deficits in spatial memory performance induced by early undernutrition. *Dev. Psychobiol.* *14*, 317–325.

Kaalund, S.S., Venø, M.T., Bak, M., Møller, R.S., Laursen, H., Madsen, F., Broholm, H., Quistorff, B., Uldall, P., Tommerup, N., et al. (2014). Aberrant expression of miR-218 and miR-204 in human mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis - Convergence on axonal guidance. *Epilepsia* *55*, 2017–2027.

Kagias, K., Nehammer, C., and Pocock, R. (2012). Neuronal responses to physiological stress. *Front. Genet.* *3*, 1–17.

Kant, G.J., Eggleston, T., Landman-Roberts, L., Kenion, C.C., Driver, G.C., and Meyerhoff, J.L. (1985). Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *22*, 631–634.

Kar, B.R., Rao, S.L., and Chandramouli, B. a (2008). Cognitive development in children with chronic protein energy malnutrition. *Behav. Brain Funct.* *4*, 31.

Van de Kar, L.D., Piechowski, R.A., Rittenhouse, P.A., and Gray, T.S. (1991). Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology* *54*, 89–95.

Kastrup, O., Leonhardt, G., Kurthen, M., and Hufnagel, A. (2000). Cortical motor reorganization following early brain damage and hemispherectomy demonstrated by transcranial magnetic stimulation. *Clin. Neurophysiol.* *111*, 1346–1352.

Kato, T., and Iwamoto, K. (2014). Comprehensive DNA methylation and hydroxymethylation analysis in the human brain and its implication in mental disorders. *Neuropharmacology* *80*, 133–139.

Kawamata, T., and Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends Biochem. Sci.* *35*, 368–376.

Keller-Wood, M.E., and Dallman, M.F. (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* *5*, 1–24.

Kempermann, G., Kuhn, H.G., and Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in

adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493–495.

Kendler, K.S., Karkowski, L.M., and Prescott, C.A. (1999). Causal Relationship Between Stressful Life Events and the Onset of Major Depression. *Psychiatry Interpers. Biol. Process.* 156, 837–841.

Kentner, A.C. (2015). Neuroprotection and recovery from early-life adversity: considerations for environmental enrichment. *Neural Regen. Res.* 10, 1545–1547.

KhorshidAhmad, T., Acosta, C., Cortes, C., Lakowski, T.M., Gangadaran, S., and Namaka, M. (2016). Transcriptional Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) by Methyl CpG Binding Protein 2 (MeCP2): a Novel Mechanism for Re-Myelination and/or Myelin Repair Involved in the Treatment of Multiple Sclerosis (MS). *Mol. Neurobiol.* 53, 1092–1107.

Kim, D.H., Saetrom, P., Snøve, O., and Rossi, J.J. (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16230–16235.

Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 126–139.

Klein, D., Mok, K., Chen, J.K., and Watkins, K.E. (2014). Age of language learning shapes brain structure: A cortical thickness study of bilingual and monolingual individuals. *Brain Lang.* 131, 20–24.

Klein, M.E., Liroy, D.T., Ma, L., Impey, S., Mandel, G., and Goodman, R.H. (2007). Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat Neurosci* 10, 1513–1514.

De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., and Joels, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr. Rev.* 19, 269–301.

Ko, C., Chu, Y., Narumiya, S., Chi, J., and Wang, J. (2014). CCAAT-enhancer-binding protein delta-miR135a-thrombospondin 1 axis mediates PGE2-induced angiogenesis in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.*

Koncina, E., Roth, L., Gonthier, B., and Bagnard, D. (2007). Role of semaphorins during axon growth and guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* 621, 50–64.

Konno, M., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Matsui, H., Dewi, D.L., Ozaki, M., Noguchi, Y., Mimori, K., Gotoh, N., et al. (2015). Embryonic MicroRNA-369 controls metabolic splicing factors and urges cellular reprogramming. *PLoS One* 10, 1–16.

Korosi, a., Naninck, E.F.G., Oomen, C. a., Schouten, M., Krugers, H., Fitzsimons, C., and Lucassen, P.J. (2012). Early-life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior. *Behav. Brain Res.* 227, 400–409.

Kovacheva, V.P., Mellott, T.J., Davison, J.M., Wagner, N., Lopez-Coviella, I., Schnitzler, A.C., and Blusztajn, J.K. (2007). Gestational choline deficiency causes global and Igf2 gene DNA hypermethylation by up-regulation of Dnmt1 expression. *J. Biol. Chem.* 282, 31777–31788.

KRECH, D., ROSENZWEIG, M.R., and BENNETT, E.L. (1960). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 53, 509–519.

Kriaucionis, S., and Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324, 929–930.

Krieger, D.T. (1982). *Cushing's syndrome* (Springer-Verlag).

Kumar, D., Bansal, G., Narang, A., Basak, T., Abbas, T., and Dash, D. (2016). Integrating

transcriptome and proteome profiling: Strategies and applications. *Proteomics* 16, 2533–2544.

Kundakovic, M., and Champagne, F. a (2014). Early-Life Experience, Epigenetics, and the Developing Brain. *Neuropsychopharmacology* 1–13.

Kundakovic, M., Gudsnuk, K., Herbstman, J.B., Tang, D., Perera, F.P., and Champagne, F.A. (2015). DNA methylation of BDNF as a biomarker of early-life adversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 6807–6813.

Kushner, S.A. (2005). Modulation of Presynaptic Plasticity and Learning by the H-ras/Extracellular Signal-Regulated Kinase/Synapsin I Signaling Pathway. *J. Neurosci.* 25, 9721–9734.

Lai, K.O., and Ip, N.Y. (2009). Synapse development and plasticity: roles of ephrin/Eph receptor signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 19, 275–283.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921.

Langley-Evans, S.C. (2015). Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *J. Hum. Nutr. Diet.* 28 *Suppl* 1, 1–14.

Larsson, F., Winblad, B., and Mohammed, A.H. (2002). Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. Impoverished housed rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 193–207.

Laus, M.F., Vales, L.D.M.F., Costa, T.M.B., and Almeida, S.S. (2011). Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 590–612.

Laviola, G., Hannan, A.J., Macrì, S., Solinas, M., and Jaber, M. (2008). Effects of enriched environment on animal models of neurodegenerative diseases and psychiatric disorders. *Neurobiol. Dis.* 31, 159–168.

LeDoux, J.E. (1992). Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2, 191–197.

Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21, 4663–4670.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415–419.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J* 23, 4051–4060.

Leggio, M.G., Mandolesi, L., Federico, F., Spirito, F., Ricci, B., Gelfo, F., and Petrosini, L. (2005). Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav. Brain Res.* 163, 78–90.

Lehrer, J. (2009). Small, furry ... and smart. *461*, 862–864.

Lenroot, R.K., and Giedd, J.N. (2006). Brain development in children and adolescents: Insights from anatomical magnetic resonance imaging. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 718–729.

Lesage, J., Sebaai, N., Leonhardt, M., Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Deloof, S., and Vieau, D. (2006). Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-

adrenal (HPA) axis. *Stress* 9, 183–198.

Leung, A.K.L., and Sharp, P.A. (2010). MicroRNA Functions in Stress Responses. *Mol. Cell* 40, 205–215.

Levay, E.A., Paolini, A.G., Govic, A., Hazi, A., Penman, J., and Kent, S. (2008). Anxiety-like behaviour in adult rats perinatally exposed to maternal calorie restriction. *Behav. Brain Res.* 191, 164–172.

Levine, S. (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30, 939–946.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.

Li, D., Mou, W., Luo, Z., Li, L., Limwachiranon, J., Mao, L., and Ying, T. (2016). Developmental and stress regulation on expression of a novel miRNA, Fan-miR73, and its target ABI5 in strawberry. *Sci. Rep.* 6, 28385.

Li, P., Legault, J., and Litcofsky, K.A. (2014). Neuroplasticity as a function of second language learning: anatomical changes in the human brain. *Cortex* 58, 301–324.

Lillicrop, K. a, Slater-Jefferies, J.L., Hanson, M. a, Godfrey, K.M., Jackson, A. a, and Burdge, G.C. (2007). Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and. *Br. J. Nutr.* 97, 1064–1073.

Lillicrop, K. a, Phillips, E.S., Torrens, C., Hanson, M. a, Jackson, A. a, and Burdge, G.C. (2008). Feeding pregnant rats a protein-restricted diet persistently alters the methylation of specific cytosines in the hepatic PPAR alpha promoter of the offspring. *Br. J. Nutr.* 100, 278–282.

Lim, R., Laplante, D.P., Kobzik, L., Brunet, A., and King, S. (2014). Prenatal Maternal Stress Predicts Childhood Asthma in Girls : Project Ice Storm. 2014.

Lin, S.H., Song, W., Cressatti, M., Zukor, H., Wang, E., and Schipper, H.M. (2015). Heme oxygenase-1 modulates microRNA expression in cultured astroglia: Implications for chronic brain disorders. *Glia* 63, 1270–1284.

Liu, D., and Meaney, M.J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* (80-.). 277, 1659+.

Liu, C.-G., Wang, J.-L., Li, L., Xue, L.-X., Zhang, Y.-Q., and Wang, P.-C. (2014). MicroRNA-135a and -200b, potential Biomarkers for Alzheimers disease, regulate beta secretase and amyloid precursor protein. *Brain Res.* 1583, 55–64.

Liu, J., Dietz, K., DeLoyht, J.M., Pedre, X., Kelkar, D., Kaur, J., Vialou, V., Lobo, M.K., Dietz, D.M., Nestler, E.J., et al. (2012). Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat. Neurosci.* 15, 1621–1623.

Liu, Y., Liao, S., Quan, H., Lin, Y., Li, J., and Yang, Q. (2016). Involvement of microRNA-135a-5p in the Protective Effects of Hydrogen Sulfide Against Parkinson's Disease. *Cell. Physiol. Biochem.* 40, 18–26.

Llorens, F., Bañez-coronel, M., Pantano, L., Antonio, J., Ferrer, I., Estivill, X., and Martí, E. (2013). A highly expressed miR-101 isomiR is a functional silencing small RNA.

Locke, J.M., Da Silva Xavier, G., Dawe, H.R., Rutter, G.A., and Harries, L.W. (2014). Increased expression of miR-187 in human islets from individuals with type 2 diabetes is associated

with reduced glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetologia* 57, 122–128.

Lores-Arnaiz, S., Bustamante, J., Arismendi, M., Vilas, S., Paglia, N., Basso, N., Capani, F., Coirini, H., López Costa, J.J., and Lores Arnaiz, M.R. (2006). Extensive enriched environments protect old rats from the aging dependent impairment of spatial cognition, synaptic plasticity and nitric oxide production. *Behav. Brain Res.* 169, 294–302.

Lugli, G., Larson, J., Martone, M.E., Jones, Y., and Smalheiser, N.R. (2005). Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner. *J. Neurochem.* 94, 896–905.

Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98.

Lv, J., Xin, Y., Zhou, W., and Qiu, Z. (2013). The epigenetic switches for neural development and psychiatric disorders. *J. Genet. Genomics* 40, 339–346.

Lyons, D.M., Parker, K.J., and Schatzberg, A.F. (2010). Animal models of early life stress: Implications for understanding resilience. *Dev. Psychobiol.* 52, 616–624.

Lyons, P.J., Storey, K.B., and Morin, P.J. (2015). Expression of miRNAs in response to freezing and anoxia stresses in the freeze tolerant fly *Eurosta solidaginis*. *Cryobiology* 71, 97–102.

Ma, H., Wu, Y., Choi, J.-G., and Wu, H. (2013). Lower and upper stem-single-stranded RNA junctions together determine the Drosha cleavage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 20687–20692.

Macé, E., Montaldo, G., Cohen, I., Baulac, M., Fink, M., and Tanter, M. (2011). Functional ultrasound imaging of the brain. *Nat Methods* 8, 662–664.

Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., and Doudna, J. a (2009). Processing by Dicer Structural Basis for Double-Stranded RNA Processing by Dicer. *Science* (80-. ). 195, 195–199.

Macrì, S., and Würbel, H. (2006). Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of the maternal mediation hypothesis. *Horm. Behav.* 50, 667–680.

Mairesse, J., Lesage, J., Breton, C., Bréant, B., Hahn, T., Darnaudéry, M., Dickson, S.L., Seckl, J., Blondeau, B., Vieau, D., et al. (2007). Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1526–E1533.

Makinodan, M., Rosen, K.M., Ito, S., and Corfas, G. (2012). A critical period for social experience-dependent oligodendrocyte maturation and myelination. *Science* 337, 1357–1360.

Malleret, G., Haditsch, U., Genoux, D., Jones, M.W., Bliss, T. V, Vanhose, A.M., Weitlauf, C., Kandel, E.R., Winder, D.G., and Mansuy, I.M. (2001). Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104, 675–686.

Mannironi, C., Camon, J., De Vito, F., Biundo, A., De Stefano, M.E., Persiconi, I., Bozzoni, I., Fragapane, P., Mele, A., and Presutti, C. (2013). Acute Stress Alters Amygdala microRNA miR-135a and miR-124 Expression: Inferences for Corticosteroid Dependent Stress Response. *PLoS One* 8, 1–11.

Maras, P.M., and Baram, T.Z. (2012). Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. *Trends Neurosci.* 35, 315–324.

Marti, and Armario (1997). Influence of Regularity of Exposure to Chronic Stress on the Pattern of Habituation of Pituitary-Adrenal Hormones, Prolactin and Glucose. *Stress* 1, 179–189.

- Martin, S.J., Grimwood, P.D., and Morris, R.G.M. (2000). Synaptic plasticity and memory: An Evaluation of the Hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 649–711.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607–620.
- Matthews, S.G., and Phillips, D.I.W. (2010). Minireview: Transgenerational inheritance of the stress response: A new frontier in stress research. *Endocrinology* 151, 7–13.
- Mayr, E. (2004). 80 Years of Watching the Evolutionary Scenery. *Science* (80-. ). 305, 46–47.
- McCarthy, M.M., Auger, A.P., Bale, T.L., De Vries, G.J., Dunn, G.A., Forger, N.G., Murray, E.K., Nugent, B.M., Schwarz, J.M., and Wilson, M.E. (2009). The epigenetics of sex differences in the brain. *J. Neurosci.* 29, 12815–12823.
- McEwen, B.S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 33–44.
- McEwen, B.S., Coirini, H., Westlind-Danielsson, A., Frankfurt, M., Gould, E., Schumacher, M., and Woolley, C. (1991). Steroid hormones as mediators of neural plasticity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39, 223–232.
- McEwen, B.S., Eiland, L., Hunter, R.G., and Miller, M.M. (2012). Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology* 62, 3–12.
- McEwen, B.S., Bowles, N.P., Gray, J.D., Hill, M.N., Hunter, R.G., Karatsoreos, I.N., and Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nat. Neurosci.* 18, 1353–1363.
- McKay, L.I., and Cidlowski, J. a (1998). Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol. Endocrinol.* 12, 45–56.
- McNeill, E., and Van Vactor, D. (2012). MicroRNAs Shape the Neuronal Landscape. *Neuron* 75, 363–379.
- Meaney, M.J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1161–1192.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* 15, 185–197.
- Mendell, J.T., and Olson, E.N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell* 148, 1172–1187.
- Mendelsohn, A.L., Valdez, P.T., Flynn, V., Foley, G.M., Berkule, S.B., Tomopoulos, S., Fierman, A.H., Tineo, W., and Dreyer, B.P. (2007). Use of videotaped interactions during pediatric well-child care: impact at 33 months on parenting and on child development. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 28, 206–212.
- Mendelsohn, A.L., Huberman, H.S., Berkule, S.B., Brockmeyer, C.A., Morrow, L.M., and Dreyer, B.P. (2011). Primary Care Strategies for Promoting Parent-Child Interactions and School Readiness in At-Risk Families. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 165, 33–41.
- Mendiola, J., Stahlhut, R.W., Jørgensen, N., Liu, F., and Swan, S.H. (2011). Shorter anogenital distance predicts poorer semen quality in young men in rochester, New York. *Environ. Health Perspect.* 119, 958–963.

- Meredith, R.M. (2015). Sensitive and critical periods during neurotypical and aberrant neurodevelopment: A framework for neurodevelopmental disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *50*, 180–188.
- Michel, G.F., and Tyler, A.N. (2005). Critical period: A history of the transition from questions of when, to what, to how. *Dev. Psychobiol.* *46*, 156–162.
- Mitra, R., and Sapolsky, R.M. (2009). Effects of enrichment predominate over those of chronic stress on fear-related behavior in male rats. *Stress* *12*, 305–312.
- Mitra, R., and Sapolsky, R.M. (2012). Short-term enrichment makes male rats more attractive, more defensive and alters hypothalamic neurons. *PLoS One* *7*.
- Moncek, F., Duncko, R., Johansson, B.B., and Jezova, D. (2004). Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocr.* *16*, 423–431.
- Mong, J.A., and McCarthy, M.M. (1999). Steroid-induced developmental plasticity in hypothalamic astrocytes: implications for synaptic patterning. *J. Neurobiol.* *40*, 602–619.
- Montano, M.M., Wang, M.H., and vom Saal, F.S. (1993). Sex differences in plasma corticosterone in mouse fetuses are mediated by differential placental transport from the mother and eliminated by maternal adrenalectomy or stress. *J. Reprod. Fertil.* *99*, 283–290.
- Morgan, C.P., and Bale, T.L. (2011). Early prenatal stress epigenetically programs dysmasculinization in second-generation offspring via the paternal lineage. *J. Neurosci.* *31*, 11748–11755.
- Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R., Bronzino, J., Tonkiss, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., and Galler, J.R. (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *17*, 91–128.
- Morgane, P.J., Mokler, D.J., and Galler, J.R. (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *26*, 471–483.
- Morin, R.D., O'Connor, M.D., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A.L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M., et al. (2008). Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res* *18*, 610–621.
- Morris, M.J., Mahgoub, M., Na, E.S., Pranav, H., and Monteggia, L.M. (2013). Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning. *J. Neurosci.* *33*, 6401–6411.
- Mountcastle, V.B. (1980). *Medical Physiology* (C. V. Mosby Company).
- Moura, A.P., Parmeggiani, B., Grings, M., Alvorcem, L.D.M., Boldrini, R.M., Bumbel, A.P., Motta, M.M., Seminotti, B., Wajner, M., and Leipnitz, G. (2015). Intracerebral Glycine Administration Impairs Energy and Redox Homeostasis and Induces Glial Reactivity in Cerebral Cortex of Newborn Rats. *Mol. Neurobiol.*
- Mousseau, T., and Fox, C. (1998). The adaptive significance of maternal effects. *Trends Ecol. Evol.* *13*, 403–407.
- Munck, A., Guyre, P.M., and Holbrook, N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relations to pharmacological actions. *Endocr Rev* *5*, 25–44.
- Muqbil, I., Bao, B., Abou-Samra, A.B., Mohammad, R.M., and Azmi, A.S. (2013). Nuclear export mediated regulation of microRNAs: potential target for drug intervention. *Curr. Drug Targets* *14*, 1094–1100.

- Murgatroyd, C., and Spengler, D. (2012). Genetic variation in the epigenetic machinery and mental health. *Curr. Psychiatry Rep.* *14*, 138–149.
- Murtie, J.C., Macklin, W.B., and Corfas, G. (2007). Morphometric analysis of oligodendrocytes in the adult mouse frontal cortex. *J. Neurosci. Res.* *85*, 2080–2086.
- Nederhof, E., and Schmidt, M. V. (2012). Mismatch or cumulative stress: Toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiol. Behav.* *106*, 701–706.
- Nettle, D., and Bateson, M. (2015). Adaptive developmental plasticity: what is it, how can we recognize it and when can it evolve? *Proc R Soc B* *282*, 20151005-.
- Neville, H., Stevens, C., Pakulak, E., and Bell, T.A. (2013). Commentary: Neurocognitive consequences of socioeconomic disparities. *Dev. Sci.* *16*, 708–712.
- Newman, S.A., and Müller, G.B. (2000). Epigenetic mechanisms of character origination. *J. Exp. Zool.* *288*, 304–317.
- Nithianantharajah, J., and Hannan, A.J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 697–709.
- Numakawa, T., Richards, M., Adachi, N., Kishi, S., Kunugi, H., and Hashido, K. (2011). MicroRNA function and neurotrophin BDNF. *Neurochem. Int.* *59*, 551–558.
- Nyaradi, A., Li, J., Hickling, S., Foster, J., and Oddy, W.H. (2013). The role of nutrition in children’s neurocognitive development, from pregnancy through childhood. *Front. Hum. Neurosci.* *7*, 97.
- O’Regan, D., Welberg, L.L.A.M., Holmes, M.C., and Seckl, J.R. (2001). Glucocorticoid programming of pituitary-adrenal function: Mechanisms and physiological consequences. *Semin. Neonatol.* *6*, 319–329.
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., and Tsukihara, T. (2009). A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* *326*, 1275–1279.
- Olde Loohuis, N.F.M., Kos, A., Martens, G.J.M., Van Bokhoven, H., Nadif Kasri, N., and Aschrafi, A. (2012). MicroRNA networks direct neuronal development and plasticity. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 89–102.
- De Oliveira, L.M., and Almeida, S. de S. (1985). Effects of malnutrition and environment on the acquisition and extinction of avoidance behavior in rats. *Physiol. Behav.* *34*, 141–145.
- Orr, H.A. (2005). The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 119–127.
- Ostrander, M.M., Richtand, N.M., and Herman, J.P. (2003). Stress and amphetamine induce Fos expression in medial prefrontal cortex neurons containing glucocorticoid receptors. *Brain Res.* *990*, 209–214.
- Pacagnella, P.A., Parpinelli, P.M., and Lachat, J.J. (2013). The morphological and developmental changes of the anterior commissure of male Wistar rats submitted to protein malnutrition in the postnatal period. *Nutr Neurosci* *16*, 61–68.
- Padilla, N., Falcón, C., Sanz-Cortés, M., Figueras, F., Bargallo, N., Crispi, F., Eixarch, E., Arranz, A., Botet, F., and Gratacós, E. (2011). Differential effects of intrauterine growth restriction on brain structure and development in preterm infants: A magnetic resonance imaging study. *Brain Res.* *1382*, 98–108.

- Palkovits, M., Baffi, J.S., and Pacak, K. (1999). The role of ascending neuronal pathways in stress-induced release of noradrenaline in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats. *J. Neuroendocrinol.* *11*, 529–539.
- Pallarés, M.E., Adrover, E., Baier, C.J., Bourguignon, N.S., Monteleone, M.C., Brocco, M.A., González-Calvar, S.I., and Antonelli, M.C. (2013). Prenatal maternal restraint stress exposure alters the reproductive hormone profile and testis development of the rat male offspring. *Stress* *16*, 429–440.
- Pang, T.Y.C., and Hannan, A.J. (2013). Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology* *64*, 515–528.
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *14*, 383–400.
- Papale, L.A., Madrid, A., Li, S., and Alisch, R.S. (2017). Early-life stress links 5-hydroxymethylcytosine to anxiety-related behaviors. *Epigenetics* *2294*, 00–00.
- Park, E.C., Kim, G., Jung, J., Wang, K., Lee, S., Jeon, S.-S., Lee, Z.W., Kim, S. Il, Kim, S., Oh, Y.-T., et al. (2013). Differential expression of MicroRNAs in patients with glioblastoma after concomitant chemoradiotherapy. *OMICS* *17*, 259–268.
- Park, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D.K., Chang, H., Jee, D., Patel, D.J., and Kim, V.N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* *475*, 201–205.
- Pasterkamp, R.J., and Giger, R.J. (2009). Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* *19*, 263–274.
- Pereira-da-Silva, M.S., Cabral-Filho, J.E., and de-Oliveira, L.M. (2009). Effect of early malnutrition and environmental stimulation in the performance of rats in the elevated plus maze. *Behav. Brain Res.* *205*, 286–289.
- Pérez-García, G., Guzmán-Quevedo, O., Da Silva Aragão, R., and Bolaños-Jiménez, F. (2016). Early malnutrition results in long-lasting impairments in pattern-separation for overlapping novel object and novel location memories and reduced hippocampal neurogenesis. *Sci. Rep.* *6*, 21275.
- Peter, C.J., Fischer, L.K., Kundakovic, M., Garg, P., Jakovcevski, M., Dincer, A., Amaral, A.C., Ginns, E.I., Galdzicka, M., Bryce, C.P., et al. (2016). DNA Methylation Signatures of Early Childhood Malnutrition Associated With Impairments in Attention and Cognition. *Biol. Psychiatry* *80*, 765–774.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grässer, F. a, van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., et al. (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* *2*, 269–276.
- Pham, T.M., Ickes, B., Albeck, D., Soderstrom, S., Granholm, A.C., and Mohammed, A.H. (1999). Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience* *94*, 279–286.
- Piccinelli, M., and Wilkinson, G. (2000). Gender differences in depression. Critical review. *Br. J. Psychiatry* *177*, 486–492.
- Piersma, T., and Drent, J. (2003). Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends Ecol. Evol.* *18*, 228–233.
- Pigliucci, M. (2001). *Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture* (JHU Press).

- Piorkowska, K., Thompson, J., Nygard, K., Matuszewski, B., Hammond, R., and Richardson, B. (2014). Synaptic development and neuronal myelination are altered with growth restriction in fetal guinea pigs. *Dev. Neurosci.* *36*, 465–476.
- Plongthongkum, N., Diep, D.H., and Zhang, K. (2014). Advances in the profiling of DNA modifications: cytosine methylation and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 647–661.
- Powell, S.B., Sejnowski, T.J., and Behrens, M.M. (2012). Behavioral and neurochemical consequences of cortical oxidative stress on parvalbumin-interneuron maturation in rodent models of schizophrenia. *Neuropharmacology* *62*, 1322–1331.
- van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F.H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 191–198.
- Prins, S.A., Przybycien-Szymanska, M.M., Rao, Y.S., and Pak, T.R. (2014). Long-term effects of peripubertal binge EtOH exposure on hippocampal microRNA expression in the rat. *PLoS One* *9*.
- Przybycien-Szymanska, M.M., Mott, N.N., and Pak, T.R. (2011). Alcohol dysregulates corticotropin-releasing-hormone (crh) promoter activity by interfering with the negative glucocorticoid response element (ngre). *PLoS One* *6*, 1–9.
- Rago, L., Beattie, R., Taylor, V., and Winter, J. (2014). MiR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. *EMBO J.* *33*, 906–920.
- Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E., Kyin, M., and Tsien, J.Z. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat. Neurosci.* *3*, 238–244.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* *123*, 1939–1951.
- Regenold, W.T., D’Agostino, C.A., Ramesh, N., Hasnain, M., Roys, S., and Gullapalli, R.P. (2006). Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of white matter in bipolar disorder: a pilot study. *Bipolar Disord* *8*, 188–195.
- Resnick, O., Miller, M., Forbes, W., Hall, R., Kemper, T., Bronzino, J., and Morgane, P.J. (1979). Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *3*, 233–246.
- Reul, J.M.H.M., and De Kloet, E.R. (1985). 2 Receptor Systems for Corticosterone in Rat-Brain - Microdistribution and Differential Occupation. *Endocrinology* *117*, 2505–2511.
- Reyes-Castro, L.A., Rodriguez, J.S., Rodríguez-González, G.L., Chavira, R., Bautista, C.J., McDonald, T.J., Nathanielsz, P.W., and Zambrano, E. (2012). Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats. *Behav. Brain Res.* *227*, 324–329.
- Reynolds, C.M., Li, M., Gray, C., and Vickers, M.H. (2013). Pre-Weaning Growth Hormone Treatment Ameliorates Bone Marrow Macrophage Inflammation in Adult Male Rat Offspring following Maternal Undernutrition. *PLoS One* *8*.
- Rice, D., and Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* *108*, 511–533.
- Rideau Batista Novais, A., Pham, H., Van de Looij, Y., Bernal, M., Mairesse, J., Zana-Taieb, E., Colella, M., Jarreau, P.H., Pansiot, J., Dumont, F., et al. (2016). Transcriptomic regulations in oligodendroglial and microglial cells related to brain damage following fetal growth

restriction. *Glia* 64, 2306–2320.

Riffo-Campos, Á.L., Riquelme, I., and Brebi-Mieville, P. (2016). Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1987.

Robinson, M.D., and Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 11, R25.

Rodriguez, N., Mayer, N., and Gauna, H.F. (2007). Effects of prenatal stress on male offspring sexual maturity. *Biocell* 31, 67–74.

Roland, B.L., and Sawchenko, P.E. (1993). Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 332, 123–143.

Rosenzweig, M.R., and Bennett, E.L. (1969). Effects of differential environments on brain weights and enzyme activities in gerbils, rats, and mice. *Dev. Psychobiol.* 2, 87–95.

Rosenzweig, M.R., and Bennett, E.L. (1972). Cerebral changes in rats exposed individually to an enriched environment. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 80, 304–313.

Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., Hebert, M., and Morimoto, H. (1978). Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain Res.* 153, 563–576.

Roth, T.L., Lubin, F.D., Funk, A.J., and Sweatt, J.D. (2009). Lasting Epigenetic Influence of Early-Life Adversity on the BDNF Gene. *Biol. Psychiatry* 65, 760–769.

Rottiers, V., and Näär, A.M. (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 239–250.

Rubin, L.P. (2015). Maternal and Pediatric Health and Disease: Integrating Biopsychosocial Models and Epigenetics. *Pediatr. Res.* 79, 127–135.

Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., and Moorman, A.F.M. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37, e45.

vom Saal, F.S. (1989). The production of and sensitivity to cues that delay puberty and prolong subsequent oestrous cycles in female mice are influenced by prior intrauterine position. *J. Reprod. Fertil.* 457–471.

Vom Saal, F.S. (1989). Sexual differentiation in litter-bearing mammals: influence of sex of adjacent fetuses in utero. *J. Anim. Sci.* 67, 1824–1840.

Saastamoinen, M., van der Sterren, D., Vastenhout, N., Zwaan, B.J., and Brakefield, P.M. (2010). Predictive adaptive responses: Condition-dependent impact of adult nutrition and flight in the tropical butterfly *Bicyclus anynana*. *Am. Nat.* 176, 686–698.

Saba, R., Medina, S.J., and Booth, S.A. (2014). A Functional SNP Catalog of Overlapping miRNA-Binding Sites in Genes Implicated in Prion Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Hum. Mutat.* 35, 1233–1248.

Sabirzhanov, B., Stoica, B.A., Zhao, Z., Loane, D.J., Wu, J., Dorsey, S.G., and Faden, A.I. (2016). miR-711 upregulation induces neuronal cell death after traumatic brain injury. *PLoS One* 11, e65468.

Sale, A., Berardi, N., and Maffei, L. (2009). Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci.* 32, 233–239.

Sánchez Alvarado, A., and Yamanaka, S. (2014). Rethinking differentiation: Stem cells, regeneration, and plasticity. *Cell* 157, 110–119.

- Sangiao-Alvarellos, S., Pena-Bello, L., Manfredi-Lozano, M., Tena-Sempere, M., and Cordero, F. (2014). Perturbation of hypothalamic microRNA expression patterns in male rats following metabolic distress: Impact of obesity and conditions of negative energy balance. *Endocrinology* *en20131770*.
- Santillán, M.E., Vincenti, L.M., Martini, A.C., Fiol de Cuneo, M., Ruiz, R.D., Mangeaud, A., and Stutz, G. (2010). Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different 6:3 ratios in mice. *Nutrition* *26*, 423–431.
- Santos, D.N., Assis, A.M.O., Bastos, A.C.S., Santos, L.M., Santos, C.A.S., Strina, A., Prado, M.S., Almeida-Filho, N.M., Rodrigues, L.C., and Barreto, M.L. (2008). Determinants of cognitive function in childhood: a cohort study in a middle income context. *BMC Public Health* *8*, 202.
- Sapolsky, R.M., Krey, L.C., and McEwen, B.S. (1986). The Neuroendocrinology of Stress and Aging: The Glucocorticoid Cascade Hypothesis. *Endocr. Rev.* *7*, 284–301.
- Sarkar, P., Bergman, K., Fisk, N.M., O'Connor, T.G., and Glover, V. (2007). Amniotic fluid testosterone: Relationship with cortisol and gestational age. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. *67*, 743–747.
- Sarnyai, Z., Sibille, E.L., Pavlides, C., Fenster, R.J., McEwen, B.S., and Toth, M. (2000). Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 14731–14736.
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J., and Shimizu, K. (2011). MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* *278*, 1598–1609.
- Savioz, A., Leuba, G., Vallet, P.G., and Walzer, C. (2009). Contribution of neural networks to Alzheimer disease's progression. *Brain Res. Bull.* *80*, 309–314.
- Schäffer, L., Müller-Vizentini, D., Burkhardt, T., Rauh, M., Ehlert, U., and Beinder, E. (2009). Blunted stress response in small for gestational age neonates. *Pediatr. Res.* *65*, 231–235.
- Schlichting, C.D. (2003). Origins of differentiation via phenotypic plasticity. *Evol. Dev.* *5*, 98–105.
- Schouten, M., Aschrafi, A., Bielefeld, P., Doxakis, E., and Fitzsimons, C.P. (2013). MicroRNAs and the regulation of neuronal plasticity under stress conditions. *Neuroscience* *241*, 188–205.
- Schratt, G. (2009). microRNAs at the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 842–849.
- Schratt, G.M., Tuebing, F., Nigh, E. a, Kane, C.G., Sabatini, M.E., Kiebler, M., and Greenberg, M.E. (2006). A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* *439*, 283–289.
- Schrijver, N.C. a, Pallier, P.N., Brown, V.J., and Würbel, H. (2004). Double dissociation of social and environmental stimulation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behav. Brain Res.* *152*, 307–314.
- Scrimshaw, N.S., Gordon, J.E., and others (1968). Malnutrition, learning, and behavior. *Malnutrition, Learn. Behav.*
- Seale, J. V., Wood, S.A., Atkinson, H.C., Lightman, S.L., and Harbuz, M.S. (2005). Organizational role for testosterone and estrogen on adult hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the male rat. *Endocrinology* *146*, 1973–1982.
- Secher, T., Novitskaia, V., Berezin, V., Bock, E., Glenthøj, B., and Klementiev, B. (2006). A neural cell adhesion molecule-derived fibroblast growth factor receptor agonist, the FGL-

peptide, promotes early postnatal sensorimotor development and enhances social memory retention. *Neuroscience* *141*, 1289–1299.

Segovia, G., Arco, A. Del, and Mora, F. (2009). Environmental enrichment, prefrontal cortex, stress, and aging of the brain. *J. Neural Transm.* *116*, 1007–1016.

Sempere, L.F., Cole, C.N., McPeck, M.A., and Peterson, K.J. (2006). The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* *306*, 575–588.

Shaltiel, G., Hanan, M., Wolf, Y., Barbash, S., Kovalev, E., Shoham, S., and Soreq, H. (2013). Hippocampal microRNA-132 mediates stress-inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target. *Brain Struct. Funct.* *218*, 59–72.

Shi, Y., Zhao, X., Hsieh, J., Wichterle, H., Impey, S., Banerjee, S., Neveu, P., and Kosik, K.S. (2010). MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. *J. Neurosci.* *30*, 14931–14936.

Shimada, M., Yamano, T., Nakamura, T., Morikawa, Y., and Kusunoki, T. (1977). Effect of maternal malnutrition on matrix cell proliferation in the cerebrum of mouse embryo: an autoradiographic study. *Pediatr. Res.* *11*, 728–732.

Shobha Vasudevan, Yingchun Tong, J.A.S. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* *318*, 1931–1934.

Simerly, R.B. (2005). Wired on hormones: Endocrine regulation of hypothalamic development. *Curr. Opin. Neurobiol.* *15*, 81–85.

Sirevaag, A.M., and Greenough, W.T. (1987). Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites, and capillaries. *Brain Res.* *424*, 320–332.

Sloboda, D.M., Hart, R., Doherty, D. a, Pennell, C.E., and Hickey, M. (2007). Age at menarche: Influences of prenatal and postnatal growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *92*, 46–50.

Smart, J.L. (1993). “Malnutrition, learning and behavior”: 25 years on from the MIT symposium. *Proc. Nutr. Soc.* *52*, 189–199.

Snell-Rood, E.C. (2013). An overview of the evolutionary causes and consequences of behavioural plasticity. *Anim. Behav.* *85*, 1004–1011.

Söber, S., Laan, M., and Annilo, T. (2010). MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *391*, 727–732.

Somel, M., Liu, X., Tang, L., Yan, Z., Hu, H., Guo, S., Jiang, X., Zhang, X., Xu, G., Xie, G., et al. (2011). MicroRNA-driven developmental remodeling in the brain distinguishes humans from other primates. *PLoS Biol.* *9*.

De Souza, M.A., Szawka, R.E., Centenaro, L.A., Diehl, L.A., and Lucion, A.B. (2012). Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiol. Behav.* *105*, 850–855.

Squire, L.R. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* *99*, 195–231.

Stein, Z., Susser, M., Saenger, G., and Marolla, F. (1972). Nutrition and mental performance. *Science* *178*, 708–713.

Stern, J.M., Weinberg, J., and Hennessy, M.B. (2010). From Freud to a modern

understanding of behavioral, physiological, and brain development. *Dev. Psychobiol.* *52*, 609–615.

Strathdee, G., and Brown, R. (2004). Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev. Mol. Med.* *4*, 1–17.

Strum, J.C., Johnson, J.H., Ward, J., Xie, H., Feild, J., Hester, A., Alford, A., and Waters, K.M. (2009). MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. *Mol. Endocrinol.* *23*, 1876–1884.

Su, M., Hong, J., Zhao, Y., Liu, S., and Xue, X. (2015). MeCP2 controls hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression via homeostatic interactions with microRNA-132 in rats with depression. *Mol. Med. Rep.* *12*, 5399–5406.

Sullivan, R.M., and Holman, P.J. (2010). Transitions in sensitive period attachment learning in infancy: The role of corticosterone. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *34*, 835–844.

Sun, W., Julie Li, Y.-S., Huang, H.-D., Shyy, J.Y.-J., and Chien, S. (2010). microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* *12*, 1–27.

Swanson, L.W., and Sawchenko, P.E. (1983). Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.* *6*, 269–324.

Szeligo, F., and Leblond, C.P. (1977). Response of the three main types of glial cells of cortex and corpus callosum in rats handled during suckling or exposed to enriched, control and impoverished environments following weaning. *J. Comp. Neurol.* *172*, 247–263.

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., et al. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* (80-.). *324*, 930–935.

Tang, Y.P., Shimizu, E., Dube, G.R., Rampon, C., Kerchner, G. a, Zhuo, M., Liu, G., and Tsien, J.Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* *401*, 63–69.

Tarazona, S., Furi??-Tar??, P., Turr??, D., Di Pietro, A., Nueda, M.J., Ferrer, A., and Conesa, A. (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res.* *43*.

Taylor, S.E. (2010). Mechanisms linking early life stress to adult health outcomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 8507–8512.

Tessier-Lavigne, M., and Goodman, C.S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* *274*, 1123–1133.

Tobi, E.W., Lumey, L.H., Talens, R.P., Kremer, D., Putter, H., Stein, A.D., Slagboom, P.E., and Heijmans, B.T. (2009). DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 4046–4053.

Tonkiss, J., and Galler, J.R. (1990). Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. *Behav. Brain Res.* *40*, 95–107.

Tonkiss, J., Shultz, P., and Galler, J.R. (1994). An analysis of spatial navigation in prenatally protein malnourished rats. *Physiol. Behav.* *55*, 217–224.

Turner, A.M., and Greenough, W.T. (1985). Differential Rearing Effects On Rat Visual Cortex Synapses. *Brain Res.* *329*, 215–226.

Tyler, C.R., Labrecque, M.T., Solomon, E.R., Guo, X., and Allan, A.M. (2016). Prenatal arsenic exposure alters REST/NRSF and microRNA regulators of embryonic neural stem cell fate

in a sex-dependent manner. *Neurotoxicol. Teratol.*

Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., Funato, H., Hobara, T., Otsuki, K., Yamagata, H., McEwen, B.S., and Watanabe, Y. (2010). Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J. Neurosci.* *30*, 15007–15018.

Vermeulen, A., Behlen, L., Reynolds, A., Wolfson, A., Marshall, W.S., Karpilow, J.O.N., and Khvorova, A. (2005). The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *1*, 674–682.

Vickers, M.H., Breier, B.H., Cutfield, W.S., Hofman, P.L., Gluckman, P.D., Amiel, S., Caprio, S., Sherwin, R., Plewe, G., Haymond, M., et al. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *279*, E83-7.

Vickers, M.H., Gluckman, P.D., Coveny, A.H., Hofman, P.L., Cutfield, W.S., Gertler, A., Breier, B.H., and Harris, M. (2005). Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* *146*, 4211–4216.

Voskarides, K. (2017). Plasticity vs Mutation. The role of microRNAs in human adaptation. *Mech. Ageing Dev.* 12–15.

Vreugdenhil, E., Verissimo, C.S.L., Mariman, R., Kamphorst, J.T., Barbosa, J.S., Zweers, T., Champagne, D.L., Schouten, T., Meijer, O.C., De Ron Kloet, E., et al. (2009). MicroRNA 18 and 124a down-regulate the glucocorticoid receptor: Implications for glucocorticoid responsiveness in the brain. *Endocrinology* *150*, 2220–2228.

Waddington, C.H. (2012). The epigenotype. 1942. *Int. J. Epidemiol.* *41*, 10–13.

Wainwright, P.E., Jalali, E., Mutsaers, L.M., Bell, R., and Cvitkovic, S. (1999). An imbalance of dietary essential fatty acids retards behavioral development in mice. *Physiol. Behav.* *66*, 833–839.

Walker, S.P., Chang, S.M., Powell, C.A., and Grantham-McGregor, S.M. (2005). Effects of early childhood psychosocial stimulation and nutritional supplementation on cognition and education in growth-stunted Jamaican children: Prospective cohort study. *Lancet* *366*, 1804–1807.

Wallace, D.L., Han, M.-H., Graham, D.L., Green, T. a, Vialou, V., Iniguez, S.D., Cao, J.-L., Kirk, A., Chakravarty, S., Kumar, A., et al. (2009). CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. *Nat. Neurosci.* *12*, 200–209.

Wan, X., Pu, H., Huang, W., Yang, S., Zhang, Y., Kong, Z., Yang, Z., Zhao, P., Li, A., Li, T., et al. (2016). Androgen-induced miR-135a acts as a tumor suppressor through downregulating RBAK and MMP11, and mediates resistance to androgen deprivation therapy. *Oncotarget* *7*.

Wanet, A., Tacheny, A., Arnould, T., and Renard, P. (2012). MiR-212/132 expression and functions: Within and beyond the neuronal compartment. *Nucleic Acids Res.* *40*, 4742–4753.

Ward, I.L., and Weisz, J. (1980). Maternal Stress Alters Plasma Testosterone in Fetal Males. *Science* (80-. ). *207*, 328–329.

Wayman, G. a, Davare, M., Ando, H., Fortin, D., Varlamova, O., Cheng, H.-Y.M., Marks, D., Obrietan, K., Soderling, T.R., Goodman, R.H., et al. (2008). An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 9093–9098.

Weaver, I.C.G., Cervoni, N., Champagne, F. a, D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M.J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* *7*, 847–854.

- Weinstock, M. (2007). Gender differences in the effects of prenatal stress on brain development and behaviour. *Neurochem Res* *32*, 1730–1740.
- Weinstock, M. (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *32*, 1073–1086.
- Weinstock, M. (2011). Sex-dependent changes induced by prenatal stress in cortical and hippocampal morphology and behaviour in rats: an update. *Stress* *14*, 604–613.
- Welberg, L.A.M., Seckl, J.R., and Holmes, M.C. (2001). Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: Possible implications for behaviour. *Neuroscience* *104*, 71–79.
- Wells, J.C.K. (2011). The thrifty phenotype: An adaptation in growth or metabolism? *Am. J. Hum. Biol.* *23*, 65–75.
- Welzl, H., D'Adamo, P., and Lipp, H.P. (2001). Conditioned taste aversion as a learning and memory paradigm. *Behav Brain Res* *125*, 205–213.
- West-Eberhard, M.J. (2003). *Developmental Plasticity and Evolution* (Oxford University Press).
- West-Eberhard, M.J. (2005). Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102 Suppl*, 6543–6549.
- Whitman, D.W., and Agrawal, A.A. (2009). What is phenotypic plasticity and why is it important? *Phenotypic Plast. Insects* 1–63.
- Whitnall, M.H. (1993). Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog. Neurobiol.* *40*, 573–629.
- Wiesel, T.N., and Hubel, D.H. (1963). Responses in Striate Deprived of Vision Cortex of One Eye1. *J. Neurophysiol.* *26*, 1003–1017.
- Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.-D., Yartseva, V., Sestan, N., and Steitz, J.A. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell* *155*, 1568–1580.
- Yamamoto, N., Tamada, A., and Murakami, F. (2002). Wiring of the brain by a range of guidance cues. *Prog. Neurobiol.* *68*, 393–407.
- Yan, Y., Shi, Y., Wang, C., Guo, P., Wang, J., Zhang, C.-Y., and Zhang, C. (2015). Influence of a high-altitude hypoxic environment on human plasma microRNA profiles. *Sci. Rep.* *5*, 15156.
- Yang, J.-S., and Lai, E.C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol. Cell* *43*, 892–903.
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J., and Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: Mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* *62*, 1205–1215.
- Ye Xiong, Asim Mahmood, M.C. (2009). Emerging Treatments for Traumatic Brain Injury. *Curr. Mol. Med.* *14*, 67–84.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. 3011–3016.
- Yi, R., Doehle, B.P., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2005). Overexpression of

exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA* 11, 220–226.

Yin, F., Qin, C., Gao, J., Liu, M., Luo, X., Zhang, W., Liu, H., Liao, X., Shen, Y., Mao, L., et al. (2015). Genome-wide identification and analysis of drought-responsive genes and microRNAs in tobacco. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 5714–5740.

Young, J.B. (2002). Programming of sympathoadrenal function. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 381–385.

Young, D., Lawlor, P.A., Leone, P., Dragunow, M., and During, M.J. (1999). Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat. Med.* 5, 448–453.

Yu, J.-Y., Chung, K.-H., Deo, M., Thompson, R.C., and Turner, D.L. (2008). MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Exp. Cell Res.* 314, 2618–2633.

Yuva-Aydemir, Y., Simkin, A., Gascon, E., and Gao, F.-B. (2011). MicroRNA-9. *RNA Biol.* 8, 557–564.

Zamenhof, S., Hall, S.M., Grauel, L., Van Marthens, E., and Donahue, M.J. (1974). Deprivation of amino acids and prenatal brain development in rats. *J. Nutr.* 104, 1002–1007.

Zeisel, S.H. (2009). Importance of methyl donors during reproduction 1-4. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 673–677.

Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* 32, 4776–4785.

Zhang, Y., Huang, B., Wang, H.-Y., Chang, A., and Zheng, X.F.S. (2017). Emerging Role of MicroRNAs in mTOR Signaling. *Cell. Mol. Life Sci.*

Zipursky, A., and Jansson, T. (2001). Reviews of Placental Amino Acid Transport and Metabolism Amino Acid Transporters in the Human Placenta. *Pediatr. Res.* 49.

Zurawek, D., Kusmider, M., Faron-Gorecka, A., Gruca, P., Pabian, P., Solich, J., Kolasa, M., Papp, M., and Dziedzicka-Wasylewska, M. (2016). Reciprocal MicroRNA Expression in Mesocortical Circuit and Its Interplay with Serotonin Transporter Define Resilient Rats in the Chronic Mild Stress. *Mol. Neurobiol.* 1–11.



## 7. Anexos

### Anexo 1: Potenciales genes blanco de los miRNAs desregulados por la malnutrición proteica perinatal a P56 (refiere a Resultados 3.4.6.1)

Gen	RefSeq ID	Gen	RefSeq ID	Gen	RefSeq ID	Gen	RefSeq ID
Ap3b1	NM_009680	Pianp	NM_175696	Hipk3	NM_010434	Spred1	NM_035524
Ap3d1	NM_007460	Usp37	NM_176972	Rbl1	NM_011249	Eri3	NM_080469
Rhoc	NM_007484	Vwc2l	NM_177164	Rgl1	NM_016846	Zfp704	NM_133218
Axin2	NM_015732	Ppm1c	NM_177167	Rlim	NM_011276	Fchs2	NM_199012
Cbx4	NM_007625	Acot11	NM_025590	Sp1	NM_013672	Mcu	NM_001033259
Dnm1	NM_010065	Dgkk	NM_177914	Sptbn1	NM_009260	Fnip1	NM_173753
Epha7	NM_010141	Jhdm1d	NM_001033430	Tiam1	NM_009384	Snx13	NM_001014973
Fasn	NM_007988	Prmt8	NM_201371	Yes1	NM_009535	Tmem55b	NM_001033271
Agfg1	NM_010472	A830080D01Rik	NM_001033472	Esrra	NM_007953	Acat3	NM_153151
Kpnb1	NM_008379	Atp6v0c	NM_009729	Nbea	NM_030595	Lamc1	NM_010683
Itpri	NM_010585	Ifit81	NM_009879	Cops7a	NM_012003	Aph1a	NM_146104
Man2a1	NM_008549	Ddx5	NM_007840	Trim36	NM_178872	Clstn3	NM_153508
Mcm7	NM_008568	Eif4a2	NM_001123038	Tbk1	NM_019786	Fbxl19	NM_172748
Nfi	NM_010897	Elf1	NM_007920	Rqcd1	NM_021383	Gpm6a	NM_153581
Ppp1ca	NM_031868	Eps8	NM_007945	Scube1	NM_022723	Fam171b	NM_175514
Rab10	NM_016676	Fbn1	NM_007993	Mto1	NM_026658	Pak7	NM_172858
Rad23b	NM_009011	Fgf10	NM_008002	Prdm16	NM_027504	Slitr4	NM_178740
Rbl2	NM_011250	Gdf5	NM_008109	Jdp2	NM_030887	Hook3	NM_207659
Six4	NM_011382	Gnb1	NM_008142	Rbm5	NM_148930	D5Erd579c	NM_001081232
Slc20a2	NM_011394	Hmgb1	NM_010439	Vps4a	NM_126165	Lrch1	NM_001033439
Stc1	NM_009285	Elavl1	NM_010485	Pank3	NM_145962	Zfp827	NM_178267
Tarbp2	NM_009319	Kif1b	NM_207682	8030462N17Rik	NM_178670	Zfp362	NM_001001806
Tle4	NM_011600	Klf9	NM_010638	Kmt2a	NM_001081049	Fmr1	NM_008031
Tln1	NM_011602	Nfe2l1	NM_008686	Kdm1b	NM_172262	H3f3b	NM_008211
Tnks	NM_175091	Tnfrsf11b	NM_008764	Zranb3	NM_027678	Id4	NM_031166
Tpp2	NM_009418	P4ha1	NM_011030	Uba6	NM_172712	Pten	NM_008960
Trpc3	NM_019510	Pfn2	NM_019410	Mat2a	NM_145569	Ddx3y	NM_012008
Ctr9	NM_009431	Pnn	NM_008891	Gpr158	NM_001004761	Ctsp	NM_016748
Ubc2a	NM_019668	Qk	NM_021881	Vps54	NM_139061	Zfand6	NM_022985
Zfpm2	NM_011766	Rb1	NM_009029	Mtmr12	NM_172958	Tbctd15	NM_025706
Adam23	NM_011780	Scn1a	NM_018733	Phf17	NM_172303	Prpf38b	NM_025845
Hip1r	NM_145070	Sema6a	NM_018744	Penxl2	NM_175561	Anln	NM_028390
Pik3cg	NM_020272	Shh	NM_009170	Rab9b	NM_176971	Seh1l	NM_001039088
Lats2	NM_015771	Syn2	NM_013681	Ipo8	NM_001081113	Cpne4	NM_028719
Suz12	NM_199196	Tia1	NM_011585	Zmiz1	NM_183208	Osbp	NM_001033174
Zfp410	NM_144833	Tshr	NM_011648	Txlng	NM_178935	Arid1a	NM_001080819
Rgs7bp	NM_029879	Dazap2	NM_011873	Epha4	NM_007936	Smarca1	NM_053123
Copg2	NM_017478	Angptl2	NM_011923	Htr2c	NM_008312	Fbxw11	NM_134015
Nup210	NM_018815	Mapk1	NM_011949	Ascl1	NM_008553	Prkaa1	NM_001013367
Pdgfr	NM_019971	Sema4g	NM_011976	Slc2a1	NM_011400	Wwp1	NM_177327
Snx12	NM_001110310	Serp1	NM_030685	Fnbp4	NM_018828	Prkaa2	NM_178143
Gtpbp2	NM_019581	D1Erd622e	NM_133825	Dnajb11	NM_026400	Dek	NM_025900
Fam60a	NM_019643	Ywhab	NM_018753	Ing3	NM_023626	Rarb	NM_011243
Rybp	NM_019743	Foxo3	NM_019740	Cluh	NM_001081158	Zbtb41	NM_172643
Socs5	NM_019654	Gpr180	NM_021434	Arrdc3	NM_001042591	BC005624	NM_144885
Rps6ka4	NM_019924	Hibadh	NM_145567	Slc25a36	NM_138756	Dock4	NM_172803
Carm1	NM_021531	Snupn	NM_178374	Zfp341	NM_199304	Kcnc2	NM_001025581
Pmpca1	NM_022995	Snw1	NM_025507	Flnb	NM_134080	Cpsf7	NM_172302
Sostdc1	NM_025312	Sltm	NM_025690	Abea1	NM_013454	Rc3h2	NM_001100591
Slc30a7	NM_023214	Rbm22	NM_025776	Acads	NM_007383	Ankrd34a	NM_001024851
Spes2	NM_025668	Cdc37l1	NM_025950	Adecy6	NM_007405	Piezo2	NM_001039485
Actr2	NM_146243	Trak1	NM_175114	Zfp361l	NM_007564	Galnt3	NM_015736
Phkg2	NM_026888	Ttc14	NM_025978	Cdh2	NM_007664	Gsk3b	NM_019827
Sec62	NM_027016	Necap1	NM_026267	Chl1	NM_007697	Gpr85	NM_145066
Ttl	NM_027192	Paip2	NM_026420	Clock	NM_007715	Herpud2	NM_020586
Ankib1	NM_001003909	Fbxo28	NM_175127	Cox5a	NM_007747	Mbtps2	NM_172307
Phyhipl	NM_178621	Upf3b	NM_026573	Enc1	NM_007930	Asic1	NM_009597
Chd6	NM_173368	Tln2	NM_001081242	Gnaq	NM_008139	Xiap	NM_009688
Ppp6r2	NM_026813	Foxn3	NM_183186	Grm1	NM_001114333	Birc6	NM_007566
Pmt3	NM_133740	Kctd6	NM_027782	Trip12	NM_133975	Ercc2	NM_007949
Rap2c	NM_172413	Plekhd2	NM_175175	Hoxa11	NM_010450	Lgr5	NM_010195
Tram1	NM_028173	2410018M08Rik	NM_183088	Hoxb6	NM_008269	Id2	NM_010496
Armc1	NM_028840	Hspa12b	NM_028306	Hoxc8	NM_010466	Lepr	NM_001122899
Ranbp10	NM_145824	Crtac1	NM_145123	Itm2a	NM_008409	Lpl	NM_008509
Sgms2	NM_028943	Setd5	NM_028385	Kifap3	NM_010629	Prka	NM_011101
Metap1	NM_175224	Trmt11	NM_028604	Myo10	NM_019472	Stmn2	NM_025285
Atg2b	NM_029654	Ppp1r21	NM_028658	Ntrk2	NM_001025074	Eif1	NM_011508
Celf3	NM_172434	Tjap1	NM_028751	Plxna2	NM_008882	Zfand3	NM_148926
Cttnbp2nl	NM_030249	Sppl3	NM_029012	Prkara	NM_021880	Vezf1	NM_016686
Ndel1	NM_023668	Vmp1	NM_029478	Scn5a	NM_021544	Ulk2	NM_013881
Aff4	NM_033565	Mgea5	NM_023799	Sema3e	NM_011348	Nampt	NM_021524
Dgcr8	NM_033324	Mynn	NM_030557	Six1	NM_009189	Rras2	NM_025846
Tm9sf4	NM_133847	Nckip5d	NM_030729	Srf	NM_020493	Dusp6	NM_026268

Gen	RefSeq ID	Gen	RefSeq ID	Gen	RefSeq ID	Gen	RefSeq ID
Wdr47	NM_181400	Rad54l2	NM_030730	Ezr	NM_009510	Slc38a2	NM_175121
Kcnc4	NM_145922	Ifit122	NM_031177	Ywhag	NM_018871	Wdr20b	NM_027614
Dcun1d4	NM_178896	Sf3b1	NM_031179	Ikzf2	NM_011770	Dhx35	NM_145742
Pls3	NM_145629	Sirt1	NM_019812	Coro1c	NM_011779	Hnrnp1	NM_028871
Csnk1g2	NM_134002	Abtb2	NM_178890	Mta2	NM_011842	Cep152	NM_001081091
Blmh	NM_178645	Tmem168	NM_028990	Nr5a2	NM_030676	Tiparp	NM_178892
Unc5a	NM_153131	Galnt7	NM_144731	Dpfl	NM_013874	Psip1	NM_133948
Pt4kb	NM_175356	Scn2a1	NM_001099298	Rragc	NM_017475	Dnm3	NM_001038619
Bai1	NM_174991	Nek8	NM_080849	Mkn1	NM_018810	Btaf1	NM_001080706
Grm3	NM_181850	Glcc1	NM_133236	Wdr46	NM_020603	Lcorl	NM_178142
Sema3d	NM_028882	Papd7	NM_198600	Eef1e1	NM_025380	Git1	NM_001004144
Erc1	NM_053204	D15Erttd621c	NM_145959	Tab3	NM_025729	Dgkb	NM_178681
Elac1	NM_053255	Casd1	NM_145398	Cpne8	NM_025815	Etf1	NM_144866
Ash1	NM_138679	Tet2	NM_001040400	Setd8	NM_030241	C030046E11Rik	NM_001081319
Mtss1	NM_144800	Nav1	NM_173437	Rab14	NM_026697	Slc39a10	NM_172653
Hlf	NM_172563	Rprd1a	NM_144861	Nexn	NM_199465	9330182L06Rik	NM_172706
Ubc2o	NM_173755	Gxylt2	NM_198612	Gpr22	NM_175191	Tubgcp5	NM_146190
Fermt2	NM_146054	Stk38l	NM_172734	Rps6ka5	NM_153587	Phax	NM_019996
Taf5	NM_177342	Dcun1d3	NM_173408	Abeeb6	NM_023732	Nvl	NM_026171
Eif5b	NM_198303	Atxn7	NM_139227	Slc35f5	NM_028787	Tmem106b	NM_027992
Ppip5k2	NM_173760	Mllt6	NM_139311	Rnd3	NM_028810	Sacm11	NM_030692
Zer1	NM_178694	Klhl8	NM_178741	Rptor	NM_028898		
Agps	NM_172666	Chsy1	NM_001081163	Pik3cb	NM_029094		
4930402H124Rik	NM_029432	Pld5	NM_176916	Rprd2	NM_001081293		
Csrp2bp	NM_181417	Caena2d4	NM_001033382	Amot1	NM_001081395		
Ythdf1	NM_173761	Phf8	NM_001113354	Kdm4c	NM_144787		
Rsb1	NM_172684	Frs2	NM_177798	Tanc2	NM_181071		
D3Bwg0562c	NM_177664	Api5	NM_007466	Ypel2	NM_001005341		
Sel1l3	NM_172710	Aqp4	NM_009700	Rictor	NM_030168		
Gen1l1	NM_172719	Caena1c	NM_009782	Senp3	NM_030702		
Slc6a1	NM_178703	Col5a1	NM_015734	Lamtor2	NM_031248		
Ccdc67	NM_181816	Hapln1	NM_013500	Mcoln1	NM_053177		
Msantd2	NM_146222	Eef2k	NM_007908	Loxl2	NM_033325		
Btd7	NM_172806	Efnb2	NM_010111	Sf3b4	NM_153053		
Erc2	NM_177814	Elk3	NM_013508	Celsr3	NM_080437		
Egflam	NM_178748	Smarcad1	NM_007958	Rimklb	NM_027664		
Tmtc2	NM_177368	Gja1	NM_010288	Sobp	NM_175407		

## Anexo 2 | Secuencias para retrotranscripción (refiere a Materiales y Métodos 5.8.3)

Secuencias de <i>primers</i> usadas para la retrotranscripción	
Gen	Secuencia del oligonucleótido <i>stem-loop</i> (SLO) o <i>primer</i> (5' to 3')
mmu-miR-9-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTCATA <b>C</b>
mmu-miR-26a-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACAGCCTA <b>A</b>
mmu-miR-103-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTCATAG <b>G</b>
mmu-miR-124-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGGCATT <b>T</b>
mmu-miR-132-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCGACCA <b>A</b>
mmu-miR-135a-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTCACAT <b>T</b>
mmu-miR-187-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCCGGCT <b>T</b>
mmu-miR-204-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACAGGCAT <b>T</b>
mmu-miR-300-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGAAGAG <b>G</b>
mmu-miR-411-5p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCGTACG <b>G</b>
mmu-miR-369-3p	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACAAAGAT <b>T</b>
U6	AACGCTTCACGAATTTGCGT
Oligonucleótido dT	TTTTTTTTTTTTTTTT

### Anexo 3 | Secuencias para RT-qPCR (refiere a Materiales y Métodos 5.8.4)

Secuencias de <i>primers</i> usadas para la RT-qPCR		
Gen	Secuencia de <i>primers forward</i> (5' to 3')	Secuencia de <i>primers reverse</i> (5' to 3')
Drosha	AGGCCCGCAGATCACCGTCT	GCGGGCTCAGGAGCAACTGG
Dgcr8	GGCTGCAGAGCGGGAGGAGA	CACCAGGCTGGGCAGATGCT
Xpo5	TTCCTGACTTCCGGCTTAGA	CCTCGAGCATTTCCTGAGAC
Xpo1	AGGAAGCTGCCGCACAGAGT	AGACCTGCAGTATGTGAAGTGTCTGT
Dicer1	CTCGTCAACTCTGCAAACCA	CAAGGCGACATAGCAAGTCA
Ago2	TCTGAGCATGAAAGCCACAC	TCTGCCAATCTCTCGGACTT
Bdnf	GCCTTCATGCAACCGAAGTA	TGAGTCTCCAGGACAGCAAA
Hspcb	CCAAAAAGCACCTGGAGATCA	TGTCGGCCTCAGCCTTCT
Gapdh	GGCATTGCTCTCAATGACAA	GGCCTCTCTTGCTCAGTGTC
18S	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT
Pgk1	TGGGCAAGGATGTTCTGTTC	TGCAGTCCCAAAAGCATCAT
Hprt1	CAGGCCAGACTTTGTTGGAT	TTGCGCTCATCTTAGGCTTT
mmu-miR-9-5p	GGCGGTCTTTGGTTATCTAGCT	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
mmu-miR-26a-5p	GGCGGTTCAAGTAATCCAGGA	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
mmu-miR-103-3p	GGCGGAGCAGCATTGTACAGG	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
mmu-miR-124-3p	GGCGGTAAGGCACGCGGTG	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
mmu-miR-132-3p	GGCGGTAACAGTCTACAGCCA	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
mmu-miR-135a-5p	GCGGCGGTATGGCTTTTTATTC	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
mmu-miR-187-3p	GGCGGTCGTGCTTTGTGTTGC	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
mmu-miR-204-5p	CGGCGGTTCCCTTTGTCATC	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
mmu-miR-300-3p	GGCGGTATGCAAGGGCAAG	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
mmu-miR-411-5p	GCGGCGGTAGTAGACCGTATAG	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
mmu-miR-369-3p	GGCGGCGGAATAATACATGGTTG	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT
U6	CTCGCTTCGGCAGCACACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT



