

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



Caracterización de los efectos del estrés crónico y el sexo sobre el perfil de RNA circulares en el hipocampo ventral de ratas

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

Juan Pablo Silva Rodríguez

Directora de Tesis: Dra. Jenny Lucy Fiedler Temer

Director de Tesis: Dr. Vinicius Maracaja Coutinho

Santiago-CHILE
Septiembre 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato:

JUAN PABLO SILVA RODRIGUEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Proteínas recombinantes y Biotecnología; y Título de Bioquímica, en el examen público rendido _____ el _____ día

Directora de Tesis:

Dra. Jenny Fiedler _____

Director de Tesis:

Dr. Vinicius Maracaja _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alfonso Paredes _____

Dr. Carlos Santiviago _____

Dr. Alberto Martín _____

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, la Dra. Jenny Fiedler y el Dr. Vinicius Maracaja, quienes me brindaron todo el apoyo y la confianza que necesitaba para concretar esta Tesis, la cual fue un gran desafío tanto intelectual como emocional. Agradecer el estímulo que me dieron para desarrollar mis propias ideas en el marco del proyecto, el tiempo y el espacio necesario para desarrollar la escala de aprendizaje necesaria para aplicar conocimientos de la bioinformática a mi base como Bioquímico, extrayendo lo mejor de ambas disciplinas, lo cual era uno de mis objetivos principales de cara a las tecnologías del futuro en la investigación y mi formación profesional.

También agradecer a las instituciones CONICYT (actualmente ANID) por brindar los recursos necesarios para realizar esta investigación bajo el proyecto Fondecyt Regular n° 1190899, al Centro avanzado para enfermedades crónicas, ACCDiS y a la dirección de postgrado y postítulo de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas por el apoyo en cuanto a las becas de arancel para cursar el programa de Magíster.

A todos mis compañeros y amigos de ambos laboratorios, que atendieron mis inquietudes y me apoyaron en base a sus experiencias y conocimientos durante el desarrollo de esta Tesis, como también a los que pude ayudar. A los más cercanos, Wladimir Corrales, por compartir sus conocimientos y motivación facilitando el desarrollo de este trabajo; a Felipe Aguayo por el apoyo en la parte experimental, que dadas las dificultades del contexto nacional no se incluyeron en esta Tesis. A Felipe Olave, Luciano Román y a los más nuevos con quienes hacemos del laboratorio una experiencia grata y de crecimiento para todos.

Agradecer a todos los amigos que me han apoyado a lo largo de la carrera, con los cuales compartí todos los desafíos y alegrías que implicó el proceso. Sin ustedes, habría sido infinitamente más difícil llegar a esta instancia. Especialmente, agradezco a mis Padres (Irene y Luis) por brindarme la posibilidad de estudiar sin mayores preocupaciones gracias a sus determinaciones, esfuerzo y sus ejemplos en cuanto a los valores de vida. Gracias a mis hermanos (Alexander y Cristóbal) y a mi querida hermana Pilar, por tu compañía y alegría mientras realizaba el escrito. Finalmente, infinitas gracias a mi pareja, Alejandra Molina, sin duda eres y has sido, la mejor compañía y apoyo incondicional que la vida puso a mi lado.

¡Muchas gracias a todos y cada uno de ustedes!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS Y FÓRMULAS.....	6
ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	11
1.INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Depresión: dificultades en el diagnóstico y diferencias dependientes del sexo.....	13
1.2 Conexión entre el estrés y la depresión.....	15
1.3 Modelo animal de depresión inducida por estrés crónico y sus efectos en el hipocampo.....	18
1.4 Efectos genéticos y epigenéticos del estrés sobre el HC con diferencias basadas en el sexo.....	21
1.5 Nuevos enfoques transcriptómicos del estrés sobre el HC.....	23
2 . HIPÓTESIS.....	28
3 . OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo General.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4. METODOLOGÍA.....	28
4.1 Modelo animal de estrés crónico por restricción de movimiento.....	28
4.2 Extracción y cuantificación de RNA de HCv de ratas.....	30
4.3 Cuantificación, preparación de librerías y secuenciación del RNA de hipocampo ventral de ratas por BGI.....	31
4.4 Pipeline computacional para la predicción de circRNAs.....	35
4.5 Análisis de expresión diferencial de circRNAs.....	38
4.6 Análisis de enriquecimiento funcional.....	39
4.7 Análisis de expresión diferencial de miRNA.....	39
4.8 Análisis de expresión de mRNAs.....	40
4.9 Predicción de sitios de unión a miRNAs en circNlgn1.....	40
4.10 Predicción de blancos de miRNAs.....	40
4.11 Construcción de la red circRNA-miRNA-mRNA.....	40
4.12 Cuantificación y análisis estadísticos.....	40

5. RESULTADOS.....	41
5.1 Evaluación de los efectos del estrés crónico en ratas macho y hembra.....	41
5.2 Diversidad de circRNAs en HCv de ratas.....	43
5.3 Identificación de circRNAs expresados diferencialmente por sexo y en respuesta al estrés crónico.....	47
5.4 Los circRNAs diferencialmente expresados son originados a partir de genes que modulan la plasticidad sináptica en estrés crónico.....	61
5.5 Evaluación in silico de los probables efectos de un circRNA diferencialmente expresado por efecto del estrés crónico dependiente del sexo.....	66
6. DISCUSIÓN.....	71
6.1 Efectos diferenciales del estrés sobre el eje dorso-ventral del hipocampo.....	71
6.2 La expresión de mRNAs cambia en HCd e HCv desde el desarrollo postnatal.....	72
6.3 Expresión de RNAs circulares en el cerebro y su posible función.....	73
6.4 Características de los circRNAs expresados en HCv de ratas.....	74
6.5 Asociación entre el origen y función de los circRNAs en HCv.....	76
6.6 circNlgn1 y sus potenciales efectos como esponja de miRNAs en HCv de ratas macho y hembra sometidas a estrés crónico.....	82
7. PROYECCIONES.....	86
8. CONCLUSION.....	88
9. REFERENCIAS.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alteración del mecanismo de retroalimentación negativa del eje HHA.....	17
Figura 2. Modelo de estrés, el hipocampo y la conducta.....	19
Figura 3. Back-splicing como un mecanismo para la biogénesis de circRNAs.....	25
Figura 4. Electroferograma representativo de los RNAs mayores a 200nt.....	32
Figura 5. Electroferograma representativo de los RNAs menores a 200nt.....	32
Figura 6. Esquema que representa las etapas para la preparación de librerías de secuenciación.....	34
Figura 7. Flujo de trabajo a partir de los datos de secuenciación.....	35
Figura 8. Evaluación de los efectos del estrés sobre parámetros fisiológicos.....	42
Figura 9. Reporte de la composición de las bases y calidad de las lecturas.....	44
Figura 10. Diversidad de circRNAs identificados.....	46
Figura 11. Análisis de expresión diferencial para circRNAs identificados con CIRCexplorer3 utilizando DESeq2.....	48
Figura 12. Análisis de expresión diferencial para circRNAs identificados con CIRI2 utilizando DESeq2.....	50
Figura 13. Número circRNAs consenso entre CIRCexplorer3 y CIRI2 diferencialmente expresados al comparar las cuatro condiciones experimentales.....	52
Figura 14. Análisis de expresión diferencial manual para la cuantificación de circRNAs realizada con CIRCexplorer3.....	55
Figura 15. Análisis de expresión diferencial manual para la cuantificación de circRNAs realizada con CIRI2.....	57
Figura 16. Número de circRNAs diferencialmente expresados según el análisis realizado manualmente para los resultados obtenidos tras la identificación y cuantificación con CIRCexplorer3 y CIRI2.....	58
Figura 17. Análisis de enriquecimiento funcional para los genes que dan origen a los circRNAs altamente expresados en condición control y estrés.....	63
Figura 18. Análisis de enriquecimiento funcional para los genes que dan origen a los circRNAs expresados diferencialmente con alta expresión por efecto del estrés en hembras y machos.....	64
Figura 19. Veces de cambio de circNlgn1.....	66

Figura 20. Expresión diferencial de miRNAs por efecto del estrés crónico en ratas macho y hembra.....	67
Figura 21. Red de interacción circNlgn1-miRNA-mRNAs en ratas macho y hembra por efecto del estrés crónico.....	69
Figura 22. Enriquecimiento de las posibles vías afectadas por la red circNlgn1-miRNA-mRNAs en ratas macho estresadas.....	70
Figura 23. Modelo general de los efectos de la expresión diferencial de circRNAs inducidos por el estrés crónico.....	87

ÍNDICE DE TABLAS Y FÓRMULAS

Tabla 1. circRNAs diferencialmente expresados identificados en común por CIRCexplorer3 y CIRI2 en el análisis con DESeq2.....	53
Tabla 2. circRNAs diferencialmente expresados mayor expresión identificados en común por CIRCexplorer3 y CIRI2 en el análisis manual.....	60
Fórmula 1. Normalización de cuentas de circRNAs.....	39

ABREVIATURAS

Acb	Núcleo accumbens
ACC	Corteza cingular anterior
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
Alu	Secuencias repetitivas de DNA
AMY	Amígdala
AVP	Vasopresina
BSJ	Back-splice-junction
BST	Núcleo del lecho de la estría terminal
CDR1as	Transcrito antisentido 1 de la proteína asociada a degeneración cerebelar
CIRCexplorer3	Algoritmo para la identificación de circRNAs
circRNAs	RNAs circulares
CIRI2	CircRNAIdentifier2
CORT	Corticosterona
CRF	Factor liberador de corticotropina
DESeq2	Algoritmo para realizar expresión diferencial de transcritos
DG	Giro dentado
DSM IV	Manual de Diagnóstico y Estadística de Enfermedades Mentales IV
ENCODE	Enciclopedia de elementos de DNA
FASTQ	Formato de archivo de texto
FC	Fold Change
GCs	Glucocorticoides
GO	Ontología de Genes
GR	Receptor de glucocorticoides
HCd	Hipocampo dorsal
HC	Hipocampo
HCv	Hipocampo ventral
HHA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
Hyp	Hipotálamo
LM	Núcleo mamilar lateral
lncRNAs	RNAs largos no codificantes
miRNAs	microRNAs
MM	Núcleo mamilar medial
mPFC	Corteza prefrontal medial
MRE	Elementos de respuesta a miRNAs
mRNA	RNA mensajero
MR	Receptor de mineralocorticoides
ncRNAs	RNA no codificantes
NPV	Núcleos paraventriculares

Nt	Nucleótidos
RBP	Proteínas de unión a RNA
RIN	Número de integridad de RNA
RNA	Ácido desoxiribonucleico
RNasas	Enzima que degrada RNA
RNA-Seq	Secuenciación de RNA
RSP	Corteza retroesplénica
sRNAs	RNAs pequeños
tRNAs	RNAs de transferencia
VTA	Área tegmental ventral

RESUMEN

Los **RNAs circulares (circRNAs)** son moléculas de RNA caracterizadas por presentar un enlace covalente entre sus extremos 3' y 5', son particularmente abundantes en neuronas y se les atribuye un rol importante en el desarrollo del cerebro. Se ha descrito que ciertos circRNAs actúan como “esponjas” de miRNAs y su expresión en neuronas puede variar dependiendo de cambios en la actividad neuronal, estadio del desarrollo y sexo del animal, por lo que se posicionan como moléculas con un posible rol protagónico en el establecimiento de la sinapsis y la neuroplasticidad; ambos procesos dinámicos que se ven alterados en trastornos del ánimo, como la ansiedad y la depresión. **La depresión es la principal causa de discapacidad en el mundo**, con mayor prevalencia en mujeres que en hombres, cuya etiología se asocia a alteraciones de la función neuronal en el hipocampo (HC), una región cerebral particularmente sensible a los mediadores del estrés. Los modelos animales de estrés muestran cambios morfológicos y moleculares en ambos polos del HC: hipocampo dorsal (HCd) e hipocampo ventral (HCv), relacionados con la capacidad cognitiva y la respuesta emocional, respectivamente, siendo el HCv la región clave para el génesis de conductas tipo depresivas. Sin embargo, pese a las diferencias en la intensidad y lo variable de los síntomas asociados a la patología depresiva dependiendo del sexo, esto no se ha abordado exhaustivamente en modelos animales de estrés.

Considerando los antecedentes expuestos, se planteó la siguiente hipótesis: ***La expresión de circRNAs relacionados a la plasticidad sináptica es modificada por el estrés crónico en hipocampo ventral de forma diferencial entre ratas macho y hembra.*** Por lo que, el objetivo de esta Tesis fue dilucidar el perfil transcripcional de los circRNAs expresados en HCv de ratas, determinando los cambios de expresión producidos por el estrés crónico, dependiendo del sexo. Además, de señalar cómo estos circRNAs diferencialmente expresados pueden afectar procesos de neuroplasticidad. Para ello se obtuvieron muestras de RNA de HCv de ratas macho y hembra estresadas crónicamente, las que luego fueron secuenciadas por tecnología RNA-seq y se realizó análisis bioinformático. Se identificaron un total de 10.829 circRNAs distintos en HCv de ratas, de los cuales, un 1,2% se expresa diferencialmente dependiendo del sexo. Se evidenció que, respecto a los

machos, una mayor cantidad de circRNAs son modulados en el HCv de ratas hembra por el estrés crónico.

La asociación entre la función del gen de origen y los circRNAs diferencialmente expresados indicó que, en ratas macho por efecto del estrés, los circRNAs están involucrados en la regulación positiva del potencial sináptico excitatorio, regulación de la exocitosis de vesículas sinápticas, formación del complejo receptor GABA y ensamblaje de la sinapsis. Mientras que, en las hembras, participan de la regulación del transporte mediado por vesículas, axonogénesis, morfogénesis y diferenciación neuronal. En este contexto, se evaluó la función de circNlgn1 como esponja de miRNAs en ratas macho y hembra estresadas, siendo uno de los circRNAs diferencialmente expresado por efecto del estrés crónico en ratas macho y no en hembras. Se identificaron 10 potenciales sitios de interacción con miRNAs, para 5 de los 49 miRNAs diferencialmente expresados en machos por efecto del estrés crónico (miR-1188-5p, miR-760-3p, miR-129-5p, miR-485-5p y miR-222-5p). Finalmente, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional con los mRNAs regulados por los miRNAs cuya interacción con circNlgn1 disminuyen su expresión, destacando que circNlgn1 ejercería un efecto favorable en la expresión de transcritos que codifican proteínas que participan en la vía de JNK, regulación de la sinapsis y modificación de histonas. En conjunto, estos resultados señalan que el estrés crónico es capaz de modificar la expresión de ciertos circRNAs dependiendo del sexo del animal, contribuyendo a la regulación de miRNAs diferencialmente expresados en ratas macho y hembra por efecto del estrés crónico y, con esto, participarían en procesos biológicos que pueden afectar la morfología de las neuronas del HCv. Esta Tesis describe por primera vez, la diversidad de circRNAs su posible rol en los mecanismo que afectan la neuroplasticidad frente al estrés crónico, destacando las diferencias que ocurren en el HCv de ratas macho y hembra; al mismo tiempo, permitió la identificación de circRNAs candidatos a biomarcadores y que participan en mecanismos que propician la patología depresiva.

SUMMARY

Characterization of both chronic stress and sex effects on circular RNAs profile in rat ventral hippocampus

circular RNAs (circRNAs) are covalently close sequences of RNA by the 5' and 3' ends. Some of these molecules act as miRNAs sponges and are particularly abundant in neurons especially through the brain development. Changes in the neuronal activity, development stage and the animal sex, can modify the expression of several circRNAs. Then circRNAs could have a major role in the maintenance of the synaptic and neuroplasticity dynamics, altered processes in mood disorders like anxiety and depression. Depression is a neuropsychiatric disorder and the major disability cause worldwide, it has twice incidence in women than man, variable intensity, diversity of symptoms and detrimental sex dependent effects over neuronal and brain levels. Anxiety and depression could be recreated in animal models of chronic stress and allows check molecular changes in several stress sensitive brain areas like hippocampus (HC) influencing mood disorders. There are two subregions recognized in HC, dorsal hippocampus (HCd) where detrimental effects of chronic stress are related to cognitive deficiencies and ventral hippocampus (HCv) related to emotional processing and HHA regulation, also observed in depression. Considering these backgrounds, it has been proposed the following hypothesis: "The expression of synaptic plasticity related circRNAs is modified by chronic stress in the ventral hippocampus in a different way between males and female rats". Then the aim of this thesis was to elucidate the circRNAs transcriptional profile in the rat HCv, determine circRNAs expression change by chronic stress effect and if these are sex dependent effects. At the same time, it intends to show how differentially expressed circRNAs could impact neuroplasticity pathways.

For these it has been obtained RNA samples from male and female rat HCv under chronic stress treatment, and then sequenced by RNAseq technology and then bioinformatics analysis. It achieved the identification of several differentially expressed circRNAs related to synaptic plasticity. It has been identified 10.829 different circRNAs in the rat HCv, where 1,2% is sex dependent differentially expressed, the 1% of the identified circRNAs

was differentially expressed by chronic stress effect in male rats, while in female rats were 1,6% chronic stress sensitive circRNAs. Thus, showing that the neurons from female HCv is more sensible to chronic stress effects producing more circRNAs. Moreover, the genes that produce differentially expressed circRNAs in male rats by chronic stress, have a role in the regulation of excitatory synaptic potential, synaptic vesicles exocytosis, GABA receptor complex and synapsis assembly. While in female rats are genes that have a role in axonogenesis, vesicle mediated transport, morphogenesis and neuronal differentiation. These biological process actives by chronic stress in male and female rats, circRNAs take part, then the function of circNlgn1 as miRNAs sponge was evaluated, being a circRNA that is highly expressed by chronic stress in male but not in female. circNlgn1 contains 10 MRE for 5 of 49 differentially expressed miRNAs in male rats by chronic stress (miR-1188-5p, miR-760-3p, miR-129-5p, miR-485-5p y el miR-222-5p) and 4 MRE for the differentially expressed miRNAs in females. Then a prediction of the interaction between miRNAs and mRNAs was considered recreating in silico the network interaction modulated by circNlgn1 in female and male rats. Finally, an enrichment analysis was performed taking the regulated mRNAs by differentially expressed miRNAs, whose interaction with circNlgn1 makes them reduce their expression. Notably, circNlgn1 is doing an favorable effect over the expression of transcripts that encode proteins, whose function is to regulate the JNK pathway, synapsis and histone modifications. Taking together, these results indicate that chronic stress is able to modify the expression of several circRNAs in a sex dependent manner, contributing to regulate the expression of neuroplasticity related miRNAs in male and female rats, probably affecting the morphology of neurons in the HCv. Thus, this thesis makes an important contribution to the understanding of circRNAs diversity and their roles in regulating neuroplasticity mechanisms in HCv and propitiating depression onset, finding new elements that could be new biomarkers of the pathology or pharmacological targets in the future.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Depresión: dificultades en el diagnóstico y diferencias dependientes del sexo

La depresión es una patología neuropsiquiátrica compleja que deteriora la calidad de vida de los pacientes afectados, su entorno familiar, laboral y social. Se caracteriza por síntomas persistentes, tales como: sentimientos de tristeza, pérdida de interés, anhedonia, sentimientos de culpa, baja autoestima, trastornos del sueño y/o del apetito, sensación de cansancio, falta de concentración, pérdida de memoria y dificultad para tomar decisiones. Actualmente, la depresión es un problema mundial, ya que es la principal causa de discapacidad, afectando a cerca de 300 millones de personas y estableciéndose como una de las principales causas de suicidio según la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2020). En Chile, la Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 del Ministerio de Salud, reportó que la prevalencia de depresión en la población general alcanza un 6,2%. Particularmente, en hombres la depresión llega al 2,1%, y en las mujeres esta cifra se eleva a un 10,1%. En relación con esto, el porcentaje de la población sospechosa de padecer depresión alcanza un 15,8%, siendo casi el doble en las mujeres respecto a los hombres (10% en hombres y 21,7% en mujeres) (MINSAL, 2017). Adicionalmente, en el ámbito económico la depresión es el principal motivo de emisión de licencias médicas, lo que aumenta cada año el gasto público por incapacidad laboral (MINSAL, 2015).

El diagnóstico de esta patología se basa en el criterio detallado en el Manual de Diagnóstico y Estadística de Enfermedades Mentales (DSM-IV, *The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), que elabora la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM IV-TR, 2009). Este criterio evalúa a los pacientes de forma subjetiva-cualitativa, verificando si éstos cumplen con los síntomas característicos que persisten por al menos dos semanas. Esta forma de diagnóstico dificulta indicar posteriormente un tratamiento óptimo para cada persona, debido a que la combinación de diferentes síntomas e intensidad son diversos y altamente heterogéneos entre los pacientes con depresión. En parte, esto se ve reflejado cuando los múltiples tratamientos actuales para esta enfermedad, como el uso de medicamentos, psicoterapias y técnicas de estimulación

cerebral, solo logran que menos de la mitad de los pacientes alcancen una remisión completa con el primer tratamiento (Akil y cols., 2018).

Entre los pacientes diagnosticados con depresión, hombres y mujeres presentan diferencias en la incidencia, manifestación, síntomas y eficacia del tratamiento. Las mujeres tienen dos a tres veces más probabilidades de desarrollar depresión que los hombres (Ferrari y cols., 2013), exhiben síntomas más severos y una alta comorbilidad con ansiedad, mientras que los hombres poseen una mayor comorbilidad con el abuso de sustancias (Martin y cols., 2013). De la misma manera, hombres y mujeres responden de forma diferente frente al tratamiento con fármacos antidepresivos. Por ejemplo, algunos estudios sugieren que las mujeres obtienen un mejor resultado con el tratamiento con inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs) respecto a los hombres (Sramek y cols., 2016). Solo recientemente se ha comenzado a abordar los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a las diferencias basadas en el sexo. A pesar de la gran cantidad de estudios clínicos y preclínicos en materia de depresión, considerando su prevalencia e impacto social, el conocimiento existente es insuficiente para comprender el mecanismo específico de la fisiopatología de la enfermedad (Jentsch y cols., 2015). Aspectos incluso a nivel celular deben comenzar a ser considerados, como por ejemplo la influencia cromosómica (genotipos XX o XY), que puede tener efectos profundos en la actividad de las células de todo el cuerpo, incluyendo neuronas (Arnold y cols., 2012). Es por esto que nuevos estudios son necesarios para comprender la etiología de la depresión, encontrar nuevos biomarcadores específicos para el diagnóstico objetivo-cuantitativo de la enfermedad y establecer un tratamiento óptimo que contemple las diferencias basadas en el sexo.

1.2 Conexión entre el estrés y la depresión

La etiología de la depresión es multifactorial, y aún no se ha establecido un mecanismo que sea capaz de explicar todos los aspectos de la enfermedad. Un estudio en Suecia sobre la depresión mayor, gracias a su registro nacional de gemelos, logró determinar por medio de entrevistas personales a 42.162 participantes y una modificación del criterio DSM IV, que la depresión tiene mayor probabilidad de ser heredada por mujeres que por hombres, con un 42% y un 29%, respectivamente (Kendler y cols., 2006). No obstante, se desconocen los genes que favorecen la aparición de la depresión y se postula que son varios los que contribuyen a la susceptibilidad de este cuadro. Además, la depresión es **influenciada por factores ambientales que se conjugan con el genoma**. Experiencias adversas, tales como el abuso físico, sexual o emocional, son eventos conocidos como **estresores** (Kaufman, J., 2018). El cerebro es central en la adaptación al estrés, percibiendo, integrando y determinando los factores que suponen una amenaza, orquestando las conductas y respuestas fisiológicas para responder ante los eventos estresores. Sin embargo, **la exposición sostenida a este tipo de estímulos es un factor de riesgo desencadenante del trastorno depresivo, fenómeno denominado como estrés crónico** (Gobinath, A. R y cols., 2015).

Uno de los mecanismos principales por el cual el cerebro reacciona ante el estrés es la activación del eje **Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA)**. Las neuronas parvocelulares en los Núcleos Paraventriculares (NPV) del **hipotálamo** secretan el **Factor Liberador de Corticotropina (CRF)** y Vasopresina. Estos neuropéptidos viajan a través del infundíbulo hasta alcanzar la hipófisis, donde estimulan la liberación de la **hormona Adrenocorticotropina (ACTH)** al torrente sanguíneo y ésta, a su vez, actúa sobre la corteza de las glándulas Adrenales induciendo la síntesis y liberación de **Glucocorticoides (GCs)**. Los GCs, (**cortisol** en humanos y **corticosterona (CORT)** en roedores) son hormonas que juegan un rol fundamental en la adaptación del organismo ante el estrés. Estas actúan a través de los **receptores de corticoides** produciendo acciones pleiotrópicas con la finalidad de preparar al organismo para lidiar con el estímulo amenazante, aumentando el metabolismo de la glucosa, lipólisis y proteólisis mientras suprime el crecimiento, la reproducción y el sistema inmune (Buckingham., 2006).

Posteriormente, los GCs señalizan por un mecanismo de retroalimentación negativa al NPV y la hipófisis para limitar la activación de este eje. Sin embargo, la exposición a un estrés crónico altera la función de este sistema favoreciendo el incremento sostenido de GCs en el torrente sanguíneo y su señalización, propiciando el desarrollo de un amplio rango de trastornos metabólicos, inmunológicos, endocrinos y neuropsiquiátricos como la depresión (Sher y cols., 2013).

La señalización de los GCs a nivel celular ocurre a través de dos tipos de receptores de corticoides: **Receptores de Mineralocorticoides (MR)** y **Receptores de Glucocorticoides (GR)**. Ambos tipos de receptores son abundantes en neuronas y varían en cantidad en las distintas regiones cerebrales. Los MR unen CORT con una afinidad 10 veces mayor que los GR, por lo que los MR están ocupados por los niveles basales de CORT, mientras que los GR solo se saturan con los niveles de CORT alcanzados durante el estrés o el máximo de CORT durante el ciclo circadiano (Reul y cols., 2015; Spencer y cols., 1993). Ambos receptores son conocidos por actuar como factores de transcripción, produciendo efectos lentos y persistentes, a través de cambios en la expresión génica. Sin embargo, también existe una familia de MR y GR unidos a membrana que producen la activación de vías no genómicas de acción rápida, involucrados con un aumento en la actividad glutamatérgica durante el estrés (Popoli y cols., 2012; Wang & Wang, 2009). Estos **efectos genómicos y no genómicos inducidos por la exposición al estrés crónico son capaces de alterar la neuroplasticidad del cerebro**, el cual es un proceso continuo que abarca el conjunto de mecanismos moleculares a nivel neuronal necesarios para la mantención de la correcta comunicación entre circuitos neuronales, lo que permite el remodelado del cerebro y su adaptación en respuesta a un estresor (Pittenger & Duman, 2008) (**Figura 1**).

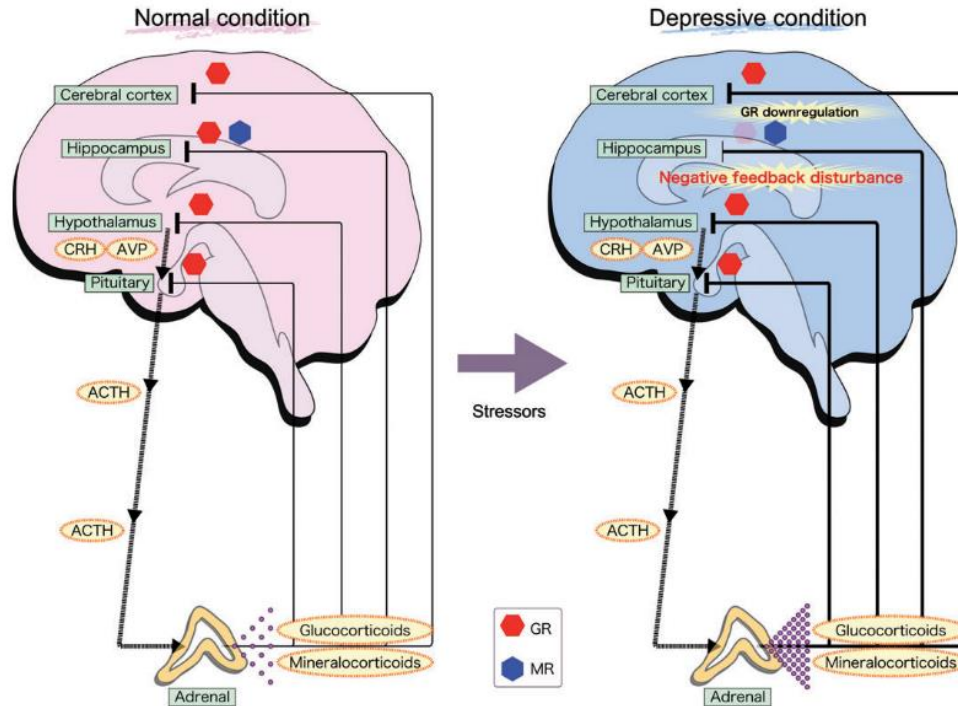


Figura 1. Alteración del mecanismo de retroalimentación negativa del eje HHA. El eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) o Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) mantiene el balance homeostático de la concentración de corticoides en la sangre (glucocorticoides y mineralocorticoides). El hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y vasopresina (AVP). CRH estimula la liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) por la hipófisis. La ACTH estimula las glándulas adrenales para producir corticosteroides. El aumento de los niveles de corticosteroides causada por diferentes estresores retorna a niveles basales mediante un mecanismo de retroalimentación negativa ejercida a través de la activación de GRs y MRs. La correlación estrecha entre el cambio crónico en la concentración de GCs y la expresión de GR fue reportada particularmente en el hipocampo. Es posible que el estrés crónico cause disregulación del eje HHA, resultando en un incremento en los niveles de GCs que contribuye a la fisiopatología de los trastornos depresivos. Además, es posible que la regulación negativa de GR (particularmente en el hipocampo) esté estrechamente relacionada con la disregulación del eje HHA. Modificado de Numakawa y cols., 2012.

1.3 Modelo animal de depresión inducida por estrés crónico y sus efectos en el hipocampo

El modelo de **estrés crónico por restricción de movimiento en ratas** es un modelo animal utilizado para recrear los síntomas y conductas tipo depresivas, permitiendo el estudio del transcurso de los cambios celulares y moleculares subyacentes a la fisiopatología de la depresión (Wang y cols., 2017). Este tipo particular de estrés emula la desregulación del eje HHA que ocurre en humanos induciendo un aumento en los niveles de GCs en los roedores (Dalla y cols., 2005; Gobinath, A. R. y cols., 2015). Dichos efectos, en términos generales son descritos como cambios neuroquímicos, morfológicos y funcionales que propician alteraciones neuropatológicas asociadas con el trastorno depresivo como, por ejemplo, la reducción en el volumen de regiones cerebrales altamente plásticas e importantes como el **hipocampo (HC)** (Bremner y cols., 2000; Pinto y cols., 2015).

El **HC** pertenece al sistema límbico, es una región cerebral heterogénea, puesto que su conectividad a otras regiones del cerebro difiere a lo largo de su eje longitudinal (dorsal a ventral en roedores, posterior a anterior en humanos). Funcionalmente, gracias a estudios de lesión, se pueden distinguir subregiones del HC: el **hipocampo dorsal (HCd)**, crítico para la memoria y el aprendizaje de tipo espacial; y el **hipocampo ventral (HCv)**, que está involucrado con la conducta ansiosa, procesamiento de experiencias emocionales y el control del eje HHA, limitando la liberación de GCs una vez efectuada la respuesta al estrés (McHugh y cols., 2011; Fanselow & Dong, 2010) (**Figura 2**). El HCd y el HCv tienen **distintas sensibilidades a mediadores del estrés como los GCs** (Maggio & Segal, 2012; Volobueva y cols., 2017), puesto que ambas porciones están altamente enriquecidas en receptores de GCs. El HCd tiene mayor cantidad de GR mientras que el HCv posee mayor abundancia del MR (Robertson y cols., 2005).

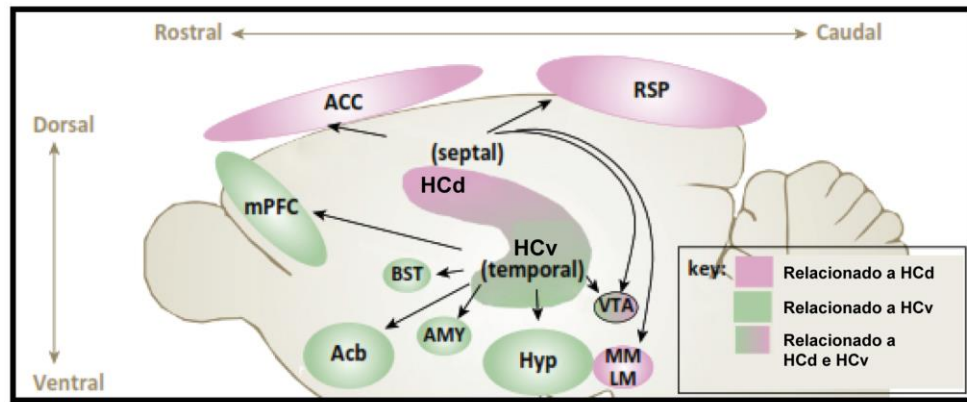
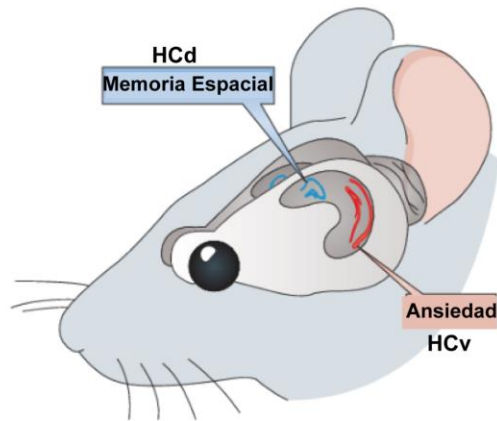


Figura 2. Modelo de estrés, el hipocampo y la conducta. Representación de la extensión del hipocampo de roedores a lo largo del eje rostrocaudal y dorsoventral, comenzando en el núcleo septal formando el polo septal (rosado) y terminando en el lóbulo temporal para formar un polo temporal. A lo largo del eje dorsoventral, el HC de roedores exhibe distintas conexiones anatómicas. Las estructuras que se comunican con el HCd, en rosado, tienen un rol en el aprendizaje espacial, memoria, exploración y navegación, así como también el procesamiento visual espacial. Por otro lado, las estructuras conectadas al hipocampo ventral en verde son reguladores importantes de la liberación de hormonas del estrés (cortisol), procesamiento de recompensa, ansiedad, motivación y funciones ejecutoras. Lesiones selectivas del hipocampo dorsal o ventral confirmaron un rol preferencial del HCd en la memoria espacial y para el HCv la regulación de la ansiedad innata y la liberación de cortisol inducida por estrés. ACC, corteza cingular anterior; Acb, núcleo accumbens; AMY, amígdala; BST, núcleo del lecho de la estría terminal, HC, hipocampo; Hyp, hipotálamo; mPFC, corteza prefrontal medial (corteza infralímbica y prelímbica); LM, núcleo mamilar lateral; MM, núcleo mamilar medial; RSP, corteza retrosplenial; VTA, área tegmental ventral. Modificado de Bannerman y cols., 2014 y Leary & Cryan, 2014.

Los estudios anatómicos en animales se han centrado principalmente en analizar cambios neuroplásticos que ocurren en subregiones específicas del HCd: giro dentado (DG), CA3 y CA1, subdivididos a su vez en capas de células piramidales, *stratum oriens*, y el neuropilo que contiene las dendritas apicales, el cual incluye el *stratum lucidum*, *radiatum* y molecular. Estudios en animales machos expuestos a estrés crónico han indicado que los GCs afectan el número de células, atrofia dendrítica, número de sinapsis y volumen total (Tata & Anderson, 2010). De esta forma, se han reportado diferencias en la plasticidad del HC por efecto del estrés crónico, dependiendo del sexo del animal. Es así que, por ejemplo, el estrés crónico afecta la neurogénesis en DG; produce una reducción en el número de células en proliferación y aumentan las células troncales quiescentes en machos, mientras que no se observan efectos en ratas hembra (Hillierer y cols., 2013; Westenbroek y cols., 2004). A nivel morfológico, la exposición a estrés agudo produce **pérdida de espinas dendríticas** en CA1 de ratas hembra y, por el contrario, produce un aumento de espinas en ratas macho (Shors y cols., 2001). Por otro lado, el estrés crónico **reduce los puntos de ramificación y largo dendrítico** en dendritas apicales de neuronas piramidales de CA3 en el HC de ratas macho. En hembras, aunque no se produce atrofia de las dendritas, existe disminución en el número de puntos de ramificación de las dendritas basales (Galea y cols., 1997). El estrés crónico impredecible (otro modelo de estrés), produce alteraciones opuestas en el volumen de los polos hipocampales. Es así que este tipo de estrés crónico reduce el volumen del HCd, probablemente debido a una disminución en el largo de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de CA3; en cambio, el volumen del HCv aumenta bajo este estímulo (Pinto y cols., 2015). Para determinar si los efectos de los GCs sobre el volumen del HC están mediados por los GCs, se han utilizado abordajes como la administración crónica de CORT. Esta hormona reduce la densidad de neuronas inmaduras en el HCd e HCv de ratas macho, y en ratas hembra se observa un efecto similar pero solo en HCv (Brummelte & Galea, 2010). Aunque otras investigaciones sugieren que las hembras son menos susceptibles que los machos a los efectos dañinos del estrés crónico, se debe considerar que los efectos dependen mucho de la naturaleza, duración del estresor y el trasfondo del ambiente hormonal de las hembras, es decir, que los niveles de hormonas ováricas contribuyen a disminuir los efectos dañinos del estrés (Shors y cols., 2001).

1.4 Efectos genéticos y epigenéticos del estrés sobre el HC con diferencias basadas en el sexo

A nivel molecular, la neuroplasticidad involucra la interacción, coordinación y regulación de numerosas proteínas específicas (enzimas, receptores, proteínas estructurales, entre otras) que mantienen los procesos metabólicos necesarios para la comunicación neuronal en los eventos de sinapsis. Para comprender los mecanismos transcripcionales que subyacen a la síntesis de dichas proteínas en el contexto de la depresión, Bagot y cols., 2016 utilizaron técnicas de secuenciación masiva de RNA (RNA-seq) sobre el modelo de estrés crónico inducido por dominancia social en ratones, para evaluar perfiles transcripcionales de cuatro áreas relacionadas con la depresión y la sensibilidad al estrés: el Núcleo Accumbens, Corteza Prefrontal, Amígdala y el HCv. En esta última región, mediante análisis de redes de co-expresión de genes ponderados (WGCNA), se encontraron módulos de genes con una alta correlación de expresión y, por lo tanto, probablemente corregulados, asociados con la susceptibilidad y resiliencia al estrés. En este trabajo lograron identificar genes que previamente no estaban implicados en depresión, que al sobreexpresarlos en HCv aumentan la susceptibilidad al estrés y las conductas ansiosas (Bagot y cols., 2016). Este estudio sostiene que el **HCv es una región cerebral importante para la génesis de conductas ansiosas o tipo depresivas inducidas por el estrés**. Si bien el estudio se realizó en ratón, éste establece las bases para comparar estructuras que forman un circuito en el que los cambios transcripcionales son coordinados en áreas con mayor conexión, como podría ocurrir con el HCd e HCv.

Las diferencias intrínsecas entre HCd e HCv, y sus respuestas diferentes al estrés ya mencionadas están siendo recientemente evaluados a nivel proteómico, transcripcional y epigenético. Floriou-Servou y cols., 2018 muestra que en ratones macho sometidos a estrés por restricción de movimiento, los mRNAs y proteínas que están enriquecidos en el HCd están involucrados en la señalización de calcio y la función glutamatérgica, mientras que **la expresión de genes regulados por estresores en HCv son el doble en número que en HCd** y están involucrados en potenciar vías metabólicas. Además, a través de redes de interacción proteína-proteína generadas computacionalmente, encontraron un **mayor número de redes de interacción en el HCv** e identificaron un grupo de genes que se

expresa con un alto nivel de correlación respecto al gen que codifica la histona demetilasa (*Kdm6b*) en tres modelos diferentes de estrés agudo. KDM6B (Lisina Demetilasa 6B, enzima específica para la marca H3K27me3 represora de la transcripción de genes) disminuye la metilación de su blanco enzimático solo en HCv y, al realizar *knockdown* de *Kdm6b*, se sostiene la marca represora en el HCv produciendo una conducta de hiperactividad/hiperreactividad al miedo (Floriou-Servou y cols., 2018), evidenciando la **especial sensibilidad al estrés del HCv por sobre el HCd** mediante un mecanismo de modificación de histonas que va a controlar la expresión de genes frente a eventos estresores.

En muestras humanas post-mortem, se han realizado análisis de redes de co-expresión de genes para poder entender las bases moleculares de las diferencias basadas en el sexo que subyacen a la depresión. Labonté y cols., 2017 identificaron 150 clústeres de genes específicos para cada sexo, a partir de datos de sujetos con depresión. Los análisis muestran dos genes centrales presentes en estos clústeres en la corteza prefrontal: DUSP6, una proteína fosfatasa asociada a MAP quinasa, que en el conjunto de mujeres estaba regulado a la baja, pero no en hombres; y el factor de transcripción EMX1 que en hombres estaba regulado al alza, pero no en mujeres. Ambos genes no habían sido asociados con la depresión previamente. Finalmente, demostraron con un modelo de ratón *knockout* que estos genes son necesarios y suficientes para causar conductas tipo depresivas inducidas por estrés en forma específica para cada sexo (Labonté y cols., 2017). Este tipo de estudios proveen información valiosa para encontrar blancos moleculares que subyacen a la susceptibilidad específica de cada sexo a la depresión y, más aún, develan un programa de expresión de genes con diferentes actores en hombres y mujeres pero que regula la expresión de un mismo fenotipo, es decir, la depresión.

Es por esto que es conveniente y necesario un abordaje de este tipo para el análisis de los cambios transcripcionales que ocurren en el HC, específicamente en el HCv, permitiendo identificar la expresión intrínseca de grupos de genes en machos y hembras, haciendo especial énfasis en los grupos de genes cuyos cambios en la expresión producto del estrés crónico sean capaces de modificar vías que dan cuenta de los fenómenos

neuroplásticos que ocurren en esta subregión del HC. Particularmente relevante son aquellos procesos relacionados con el procesamiento del impacto emocional de las experiencias y el control de los estados afectivos generales. Los análisis transcriptómicos permiten, además, identificar distintos tipos de transcritos que pueden mediar cambios anatómico-funcionales, pudiendo constituirse como posibles biomarcadores, ya sea de una predisposición o desarrollo de una patología neuropsiquiátrica y, en el contexto de este trabajo en particular, el trastorno depresivo.

1.5 Nuevos enfoques transcriptómicos del estrés sobre el HC

Los estudios con técnicas de microarreglos y los avances recientes en la secuenciación masiva de RNAs, en conjunto con los análisis bioinformáticos *in silico*, han aportado enormemente en la detección e identificación de mecanismos moleculares propios del metabolismo de los RNA que se activan en respuesta al estrés. Las iniciativas transcriptómicas para estudiar el genoma humano de manera exhaustiva, como el proyecto ENCODE (del inglés, *Encyclopedia of DNA Elements*), han revelado que más del 75% de nuestro genoma es transcrito en algún tipo de RNA y solo entre el 1-2% del RNA producido corresponde a RNAs que codifican proteínas. El resto corresponde a una gran proporción de RNAs no codificantes (ncRNAs), entre los cuales se distinguen RNAs asociados a la traducción, RNAs ribosomales (rRNAs) y RNAs de transferencia (tRNAs). Los RNAs pequeños (sRNAs) clasificados por un tamaño menor a 200 nt, incluye a los microRNAs (miRNAs), importantes en el mecanismo de degradación de mRNAs; y por otro lado encontramos RNAs mayores a 200 nt, conocidos como RNAs largos no codificantes (lncRNAs), los cuales tienen diversas funciones como la regulación de la transcripción, modificaciones postranscripcionales y remodelamiento de la cromatina, entre otras (Dunham y cols., 2012; Palazzo & Lee, 2015).

Se ha evidenciado que el estrés crónico gatilla cambios en la expresión de miRNAs en el HCd de ratas macho a través de técnicas de microarreglos, estudios *in silico* y confirmación por RT-qPCR. Entre los miRNAs que demuestran ser sensibles al estrés se encuentran los miRNAs del clúster mir 379-410 y el mir 17-92 (Jin y cols., 2016). Por ejemplo, el miR-92a y el miR-485 incrementan su expresión por estrés crónico,

influyendo vías de señalización relacionadas al crecimiento del axón y AMPc (Muñoz-Llanos *y cols.*, 2018). Adicionalmente, el efecto combinado de estos dos miRNAs podría influenciar factores de transcripción y enzimas modificadoras de histonas, entre otros (Muñoz-Llanos *y cols.*, 2018). Estos cambios en la expresión de miRNAs involucran toda una maquinaria que debe ser coordinada para aumentar los niveles de algunos miRNAs y disminuir otros, permitiendo lograr una respuesta adaptativa al estrés a través del control de los niveles de expresión de proteínas claves para la comunicación neuronal. En este contexto, es necesario contemplar un nivel poco explorado para la regulación de los miRNAs, como **RNAs circulares o circRNAs**.

Los circRNAs son transcritos que se caracterizan por poseer un enlace covalente entre los extremos 5' y 3'. Debido a la ausencia del extremo 3' libre, los circRNAs son resistentes a las exonucleasas, extendiendo su vida media por sobre los RNAs lineales (Jeck & Sharpless, 2014). El principal mecanismo propuesto para la biogénesis de circRNAs es a partir de un pre-mRNA en un proceso de corte y empalme no canónico mediado por el espliceosoma llamado back-splicing, que es potenciado por la presencia de secuencias Alu (Zhang *y cols.*, 2014) (**Figura 3**). Se ha descrito que un 83% de los circRNAs se originan a partir de genes que codifican proteínas (Guo *y cols.*, 2014). En cuanto a la composición de su secuencia, la mayoría de los circRNAs abarcan menos de 5 exones, pueden incluir intrones y en tamaño pueden variar con un rango promedio estimado de 500nt (Guo *y cols.*, 2014). Algunos circRNAs que contienen secuencias exónicas poseen un ORF, por lo que se propone que podrían ser traducidos. En general, los circRNAs son evolutivamente conservados a través de las especies, incluyendo roedores y humanos, por lo que se propone que poseen una función conservada e importante para el desarrollo de los organismos (Rybak-Wolf *y cols.*, 2015). De hecho, un eje de regulación circRNA-miRNA-mRNA anormal está involucrado en la patogénesis de enfermedades del sistema nervioso central, como el Parkinson y el Alzheimer (Chen *y cols.*, 2016).

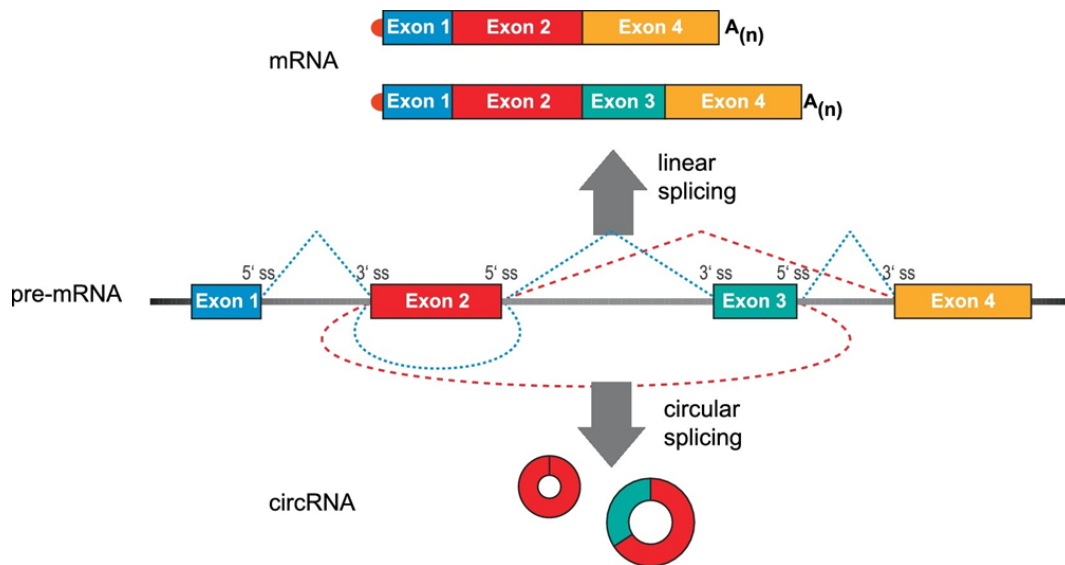


Figura 3. Back-splicing como un mecanismo para la biogénesis de circRNAs. Representación esquemática para la biogénesis de mRNAs y circRNAs. Se representa el mecanismo de corte y empalme canónico, los intrones son removidos y los exones se empalman, generando un mRNA maduro a partir del pre-mRNA o se pueden formar otras variantes de splicing por eventos de corte y empalme alternativos. Los circRNAs son generados por un mecanismo de corte y empalme alternativo, conocido como back-splicing en el cual un sitio dador 5' (5'ss) se empalma a un sitio aceptor 3' (3'ss) río arriba en lugar de un 3'ss río abajo. Se pueden generar variantes de corte y empalme resultando circRNAs que contienen solo un exón o múltiples exones. Los exones corresponden a las cajas coloreadas y los intrones a líneas sólidas. La estructura de 5' cap se muestran como puntos rojos en los mRNAs y las colas 3' Poli-A como A(n). El corte y empalme constitutivo (azul) y el alternativo (rojo) se representan con líneas punteadas. Extraído de Pfafenrot & Preußer, 2019.

Respecto a las funciones descritas para los circRNAs, se destaca su potencial para el secuestro de miRNAs. Un mecanismo ampliamente estudiado es el de CDR1as o CiRS-7 (RNA circular contra miRNA-7), que actúa como “esponja” con cerca de 70 sitios de unión putativos para el miRNA-7 (miR-7), disminuyendo su disponibilidad para actuar sobre los mRNAs blanco (Hansen y cols., 2013). Un aumento en los niveles de miR-7, por disminución de CiRS-7, se presenta en patologías psiquiátricas afectando la densidad de espinas dendríticas vía el eje miR-7/SHANK3 (Choi y cols., 2015; y cols., 2016). Los

circRNAs, además, pueden mediar la degradación, almacenaje, destinación y localización de los miRNAs. Por ejemplo, si el circRNA es totalmente complementario al miRNA, éste puede inducir su degradación mediado por Argonauta (AGO), proteína efectora del complejo silenciador inducido por RNA (RISC). Por otro lado, si el sitio de unión es parcial (menor a 12 nt), ninguno es cortado por AGO, permitiendo que los circRNAs puedan actuar como señuelos para miRNAs y para proteínas de unión a RNA (RBPs), regulando, de esta forma, la interacción de estas proteínas con sus blancos. Además, pueden unirse a varias RBPs actuando como una plataforma para el ensamblaje de grandes complejos proteicos (Jeck & Sharpless, 2014). También pueden participar en la regulación de la transcripción en neuronas, por ejemplo, circRNAs que retienen intrones (conocidos como ElciRNAs) quedan retenidos en el núcleo permitiendo el reclutamiento de la RNA polimerasa II a la región promotora de un gen estimulando su transcripción (van Rossum y cols, 2016).

Los circRNAs son producidos en tejidos específicos. Interesantemente, **el cerebro en particular ha sido destacado como uno de los órganos con expresión más abundante en circRNAs**, donde se propone que juegan un rol crucial durante el desarrollo neuronal (Rybak-Wolf y cols., 2015; You y cols., 2015). Además, en un estudio basado en conjuntos de datos de RNA-seq públicos de ratas macho y hembra, se evaluaron los niveles de circRNAs en 8 órganos durante cuatro etapas del desarrollo, demostrando la existencia de circRNAs que se expresan de forma dinámica espaciotemporal, órgano-tejido y sexualmente específica (Mahmoudi & Cairns, 2019). Los análisis por ontología de genes muestran que los **circRNAs altamente expresados en el cerebro** serían grupos de circRNAs funcionales relacionados con el **proceso de sinapsis y son abundantes tanto en sinaptosomas de hipocampo de rata** (You y cols., 2015), como también en sinaptoneurosomas de ratón. Estos últimos, corresponden a una fracción enriquecida de vesículas que contienen terminales presinápticas ancladas a vesículas con terminales postsinápticas (Rybak-Wolf y cols., 2015). Entre estos circRNAs se identificó, mediante hibridación *in situ* de alta resolución, circRNAs que están especialmente enriquecidos en la sinapsis, como circ_Homer1_a, el cual además aumenta sus niveles en presencia de bicuculina, un antagonista del receptor GABA_A, que aumenta la actividad neuronal,

demostrando que los niveles de circRNAs en el compartimiento sináptico pueden ser regulados por la actividad sináptica (You y cols., 2015). Esto indica que los **circRNAs podrían tener una participación en los procesos de plasticidad neuronal** que implican la formación o detrimento de nuevas conexiones entre neuronas. Sin embargo, **los circRNAs presentes en estas estructuras no han sido estudiados en los procesos de neuroplasticidad que ocurren en las subregiones del HC en respuesta al estrés crónico.** Se sugiere que los circRNAs pueden estar involucrados en un amplio rango de respuestas neuronales al estrés y su expresión o función aberrante puede contribuir al desarrollo, progresión y la severidad de enfermedades neurológicas como la depresión (Shao & Chen, 2016). Recientemente se identificó un circRNA expresado diferencialmente en monocitos de sangre periférica de pacientes con depresión mayor, conocido como hsa_circRNA_103636, el cual es regulado a la baja comparado con pacientes sanos. Este tipo de estudios evidencian el potencial de los circRNAs como biomarcadores para el diagnóstico de la depresión mayor (Jiang & Li, 2016). La habilidad característica de los circRNAs para actuar como esponjas para múltiples blancos incluyendo miRNAs, proteínas y posiblemente otros lncRNAs, hacen de estas moléculas un objetivo de estudio interesante con el potencial para modular múltiples vías de señalización. La identificación de circRNAs que cambian su expresión en HCv, por efecto del estrés crónico permitirá elucidar qué miRNAs podrían estar viendo alterada su función y, a su vez, qué transcritos codificantes y vías asociadas a procesos celulares están siendo afectadas por estos cambios. Además, tienen el potencial de ser utilizados como biomarcadores del proceso de neuroplasticidad debido a su larga vida media, permitiendo la identificación de diferencias notorias entre las vías que son activadas en HCv de machos y hembras en respuesta al estrés crónico.

2. HIPÓTESIS

La expresión de circRNAs relacionados a la plasticidad sináptica es modificada por el estrés crónico en hipocampo ventral de forma diferencial entre ratas macho y hembra.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar si la exposición a estrés crónico por restricción de movimiento produce un sesgo respecto al sexo en la expresión de circRNAs asociados a plasticidad sináptica en hipocampo ventral de ratas.

3.2 Objetivos Específicos

- 1- Determinar si la expresión de los circRNAs en hipocampo ventral es diferente entre ratas macho y hembra no estresadas.
- 2- Determinar si la exposición al estrés crónico cambia el perfil de expresión de circRNAs en hipocampo ventral de ratas y si ésta, además, presenta un sesgo asociado al sexo.
- 3- Identificar las vías involucradas en la plasticidad sináptica representadas por aquellos genes que producen circRNAs en condiciones de estrés.
- 4- Identificar circRNAs expresados diferencialmente, involucrados en la plasticidad sináptica con diferencias en la dirección del cambio entre machos y hembras por efecto del estrés crónico.

4. METODOLOGÍA

4.1 Modelo animal de estrés crónico por restricción de movimiento

Los animales utilizados en este trabajo fueron solicitados en el marco del proyecto Fondecyt Regular n° 1190899. Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho y hembras adultas vírgenes con ciclo estral normal (8-10 semanas de edad), criadas en cuatro grupos por caja, en una habitación con temperatura y humedad controlada con un ciclo de luz/oscuridad estándar. Además, se les permitió comida y agua a libre disposición. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los protocolos establecidos por el comité de ética local para la experimentación con animales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y aprobados por el comité institucional

Certificado n°: 19239 - CYQ - UCH. Estos protocolos consideraron, la guía para el uso y el cuidado de animales de laboratorio del NIH (National Research Council, 2011). Las ratas se manipularon una vez al día por al menos 3 semanas antes de iniciar los procedimientos experimentales, de forma que los animales se adaptaran al manipulador. El manejo consistió en pesar las ratas y, en el caso de las hembras, además se tomó una muestra de frotis vaginal entre las 8:00 y 9:00 h para determinar la fase del ciclo estral. Para el estudio se seleccionaron los animales que mostraron una ganancia de peso normal y las hembras que exhibieron un ciclo estral regular de 4-5 días.

Se realizó un seguimiento del consumo de alimento por cada caja, obteniendo un promedio por animal. Se contabilizó el número de deposiciones por animal durante el procedimiento de estrés, se sumó la cantidad de heces durante las sesiones de estrés, mientras que para los animales control se obtuvo un promedio por animal para las heces contabilizadas luego de 2,5 horas de haber sido los animales introducidos en una caja de mantención y con viruta limpia (determinado cada 3 días). Estos fueron pesados todos los días, tomando como referencia el primer día de inicio de las sesiones de estrés, de forma de determinar el porcentaje de ganancia de peso de los animales.

Para investigar los efectos del estrés crónico, ratas macho y hembras se sometieron a estrés crónico por restricción de movimiento (2,5 horas diarias por 14 días) utilizando cilindros de acrílico. Los animales fueron sacrificados por decapitación 24 horas después de la última sesión de estrés para la posterior obtención del hipocampo, separados en las porciones dorsal (HCd) y ventral (HCv). Para el grupo de ratas hembra, la extracción del hipocampo se llevó a cabo durante la etapa estro del ciclo estral, donde los niveles de estrógeno son menores. El tejido se extrajo rápidamente sobre una placa enfriada a 4°C y sumergido en 900 µL de solución **RNAlater™** (Qiagen, California, USA) y mantenidos a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, el tejido sin líquido se almacenó a -80°C hasta la etapa de extracción de RNA. Se seleccionó un grupo de 10 ratas hembra y 10 ratas macho. Del grupo de ratas hembra previamente se descartaron las que no tuvieran un ciclo estral regular de 4-5 días antes de las sesiones de estrés y se seleccionaron las muestras con una mayor cantidad de RNA obtenido del proceso de extracción.

4.2 Extracción y cuantificación de RNA de HCv de ratas

Se realizó un homogeneizado de tejido en 1400 μ L de solución comercial QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, California, USA), con UltraTurrax a máxima velocidad. Luego, se dejó por 5 min a temperatura ambiente y el volumen se separó en dos tubos que fueron tratados simultáneamente como se describe a continuación. Se agregaron 140 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente 15 min, se dejó 2-3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 15 min a 12.000 x g a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo, se agregó un volumen de etanol al 70% y se mezcló vigorosamente por Vortex. Con micropipeta se tomó la muestra incluyendo cualquier precipitado formado, se agregó a una columna **RNeasy Mini spin** (Qiagen, California, USA) en un tubo colector de 2 mL y se centrifugó a más de 8000 x g por 15 s a temperatura ambiente. En la columna quedaron retenidos los RNAs mayores a 200 nt y el eluido de la columna (el cual contenía los miRNAs) se colocó en un nuevo tubo de 2 mL. En seguida, se añadieron 450 μ L de etanol 100% (0,65 volúmenes) y se mezcló vigorosamente con Vortex. Se transfirió 700 μ L de la muestra en una columna **RNeasy MinElute** (Qiagen, California, USA) en un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó 15s a 8000 x g a temperatura ambiente y el eluido se descartó. Se agregaron 500 μ L de buffer RPE a la columna RNeasy MiniElute, se centrifugó 15s a 8.000 x g para secar la columna y luego se centrifugó con la tapa abierta por 5 min a más de 8.000 x g. Finalmente, se puso un nuevo tubo colector de 1.5mL y se agregó a la columna 10 μ L de agua libre de RNAsas. Se centrifugó 1 min a más de 8000 x g para eluir la fracción enriquecida en miRNAs. Se repitió este último paso dos veces y se obtuvo para cada hipocampo dos tubos con un volumen de 30 μ L de RNA eluido.

Para los RNAs menores a 200nt se agregó 700 μ L de buffer RWT en la columna RNeasy Mini spin. Se centrifugó 15s a más de 8.000 x g para lavar la columna y se descartó el eluido. Se agregó 500 μ L de buffer RPE a la columna, se centrifugó 15s a 18.000 x g y se descartó el eluido. Este lavado se realizó dos veces y en la última vez se descartó el colectado, y se centrifugó 1 min a máxima velocidad con la tapa abierta. Se puso la columna en un nuevo tubo de 1.5mL, se toman 15 uL de agua libre de RNAsas y se centrifugó 1 min a más de 8.000 x g para eluir el RNA total (RNAs mayores a 200 nt). Se repitió este paso, logrando para cada hipocampo dos tubos con un volumen total de muestra de 30 μ L.

Se realizó la cuantificación por Nanodrop™ (NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific) y por Qubit™ mediante el Kit de ensayo BR de RNA Qubit Quant-iT™ de los RNAs mayores a 200 nt y RNAs menores a 200 nt. Se seleccionaron las muestras con mayor concentración para ser enviadas a secuenciar, las cuales fueron numeradas del 1 al 20 para los RNAs mayores a 200 nt y 21 al 40 para los RNAs menores a 200 nt. De las muestras cuantificadas por Qubit, éstas corresponden en promedio a un 67,3% de lo cuantificado por Nanodrop™. Además, el método de purificación de RNAs por columna fue óptimo, ya que las muestras no estaban contaminadas con DNA. Luego de todas estas etapas, fueron enviadas a secuenciar en la empresa BGI.

4.3 Cuantificación, preparación de librerías y secuenciación del RNA de hipocampo ventral de ratas por BGI

La empresa BGI volvió a cuantificar las muestras, utilizando el instrumento Agilent 2100 Bionalyzer (Agilent RNA 6000 Nano Kit), se determinó la concentración de RNA total, su integridad RIN (*RNA integrity number*) y el tamaño de los fragmentos. La **Figura 4** presenta el trazado de un electroferograma para la obtención del RIN, a partir de la electroforesis capilar en gel realizada por el BioAnalyzer. Los dos picos principales corresponden a los rRNAs 28S y 18S. El RIN de estas muestras fue siempre mayor a 8.6, lo que indica una integridad óptima ($RIN > 8.0$) para realizar la preparación de librerías y posterior secuenciación. La **Figura 5** presenta un electroferograma representativo de las muestras de RNA menores a 200 nt, para las cuales se obtuvo una concentración óptima y un RIN promedio de 2.6, por lo cual estaban calificadas para la preparación de librerías y posterior secuenciación.

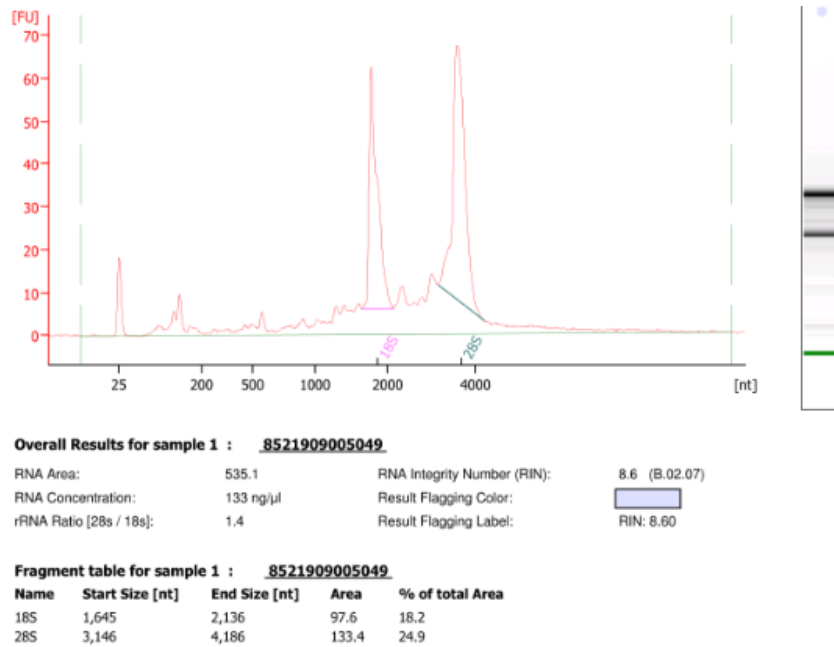


Figura 4. Electroferograma representativo de los RNAs mayores a 200nt. Se muestran en unidades fluorescentes contra cantidad de nucleótidos de los fragmentos de RNA presentes en la muestra, se destacan los dos picos principales correspondientes a rRNA 28S y 18S, coincidentes con la imagen del gel de la electroforesis capilar, la integración de las áreas, obtención de la concentración de la muestra y la integridad con el valor RIN de 8.6.

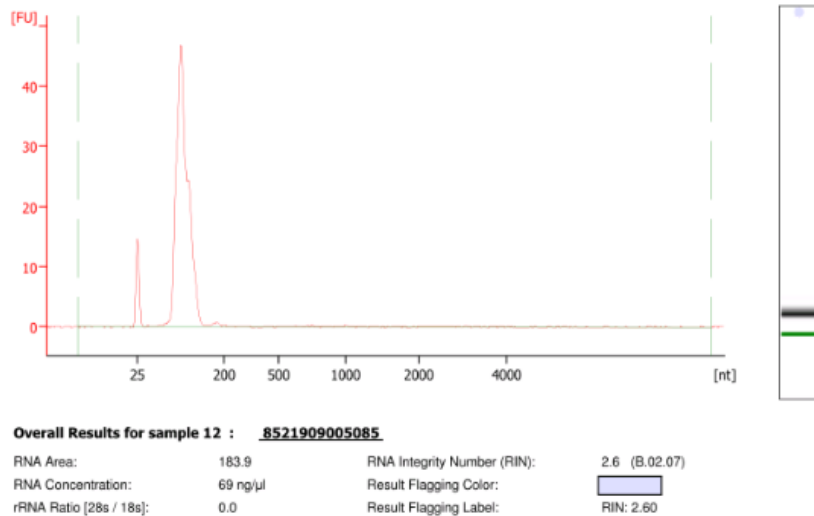


Figura 5. Electroferograma representativo de los RNAs menores a 200nt. Se muestran en unidades fluorescentes contra cantidad de nucleótidos de los fragmentos de RNA presentes en la muestra, el pico muestra que son fragmentos menores a 200 nt, coincidentes con la imagen del gel de la electroforesis capilar, la integración de las áreas, obtención de la concentración de la muestra y la integridad con el valor RIN de 2.6.

Una vez calificadas las muestras para la preparación de librerías, la compañía BGI utilizó 200 ng de las muestras de RNA mayores a 200 nt. Las muestras, luego de ser depletadas de rRNA, se fragmentó el RNA, posteriormente se realizó una transcripción reversa, se fosforilaron los extremos, se ligaron adaptadores tipo burbuja, se realizó una amplificación por PCR, se separaron las hebras dobles de DNA y se circularizó cada hebra. Estas hebras simples fueron sustrato para la secuenciación por síntesis de DNA en nanobolas en la plataforma DNBseq™ (BGI, Hong Kong, China), la cual utiliza replicación por círculo rotatorio (RCR) con la polimerasa del fago Phi29, de alta procesividad y fidelidad, generando lecturas pareadas de 150 bases (**Figura 6A**). Para las muestras de RNA menores a 200 nt, se utilizaron 200 ng y se resolvieron los fragmentos mediante una electroforesis en el gel de agarosa, seleccionando aquellos con un tamaño de entre 18-30 nt, se ligaron con un adaptador 3' (36-50 nt) y luego un adaptador 5' (62-75 nt), y finalmente se procedió a realizar la transcripción reversa para una posterior amplificación por PCR. Estos productos se purificaron en un gel PAGE y los cDNAs fueron denaturados por temperatura y circularizados. Estos círculos de cDNA de hebra simple son usados como librería final a secuenciar por la plataforma DNBseq™, generando lecturas de 50 bases (**Figura 6B**). El resultado de la secuenciación obtenido con la plataforma DNBseq™ son los archivos FASTQ estándar, conteniendo información referente a la secuencia nucleotídica y su respectiva calidad de secuenciación (puntaje Phred en formato ASCII) para cada lectura secuenciada (**Figura 6C**).

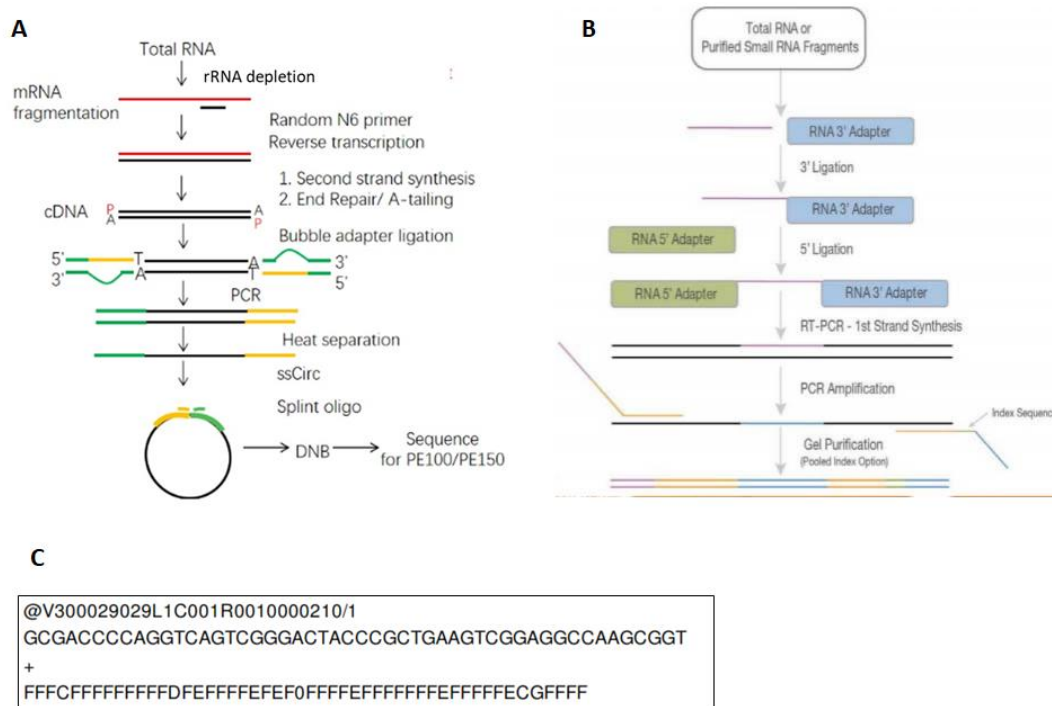


Figura 6. Esquema que representa las etapas para la preparación de librerías de secuenciación. (A) Preparación de librerías para RNAs mayores a 200 nt y (B) para RNAs menores a 200 nt. (C) Archivo FASTQ secuenciado por DNBseq usando un sistema de calidad Phred +33. La primera y la tercera fila son los nombres de las secuencias generadas por el analizador de secuencias. La segunda línea es la secuencia; La cuarta línea es la calidad de la secuencia, donde cada letra corresponde a la base en la segunda línea; la calidad de esa base es igual al valor ASCII del carácter en la cuarta línea menos 33. Ejemplo si el valor ASCII de A es 65, entonces la calidad de la base es 32.

4.4 Pipeline computacional para la predicción de circRNAs

El análisis bioinformático comenzó tras la adquisición de los archivos en formato FASTQ desde la empresa BGI. Estos archivos fueron generados a partir de las 20 muestras de HCv, separadas en RNAs mayores a 200 nt (etiquetadas del 1 al 20) y menores a 200 nt (etiquetadas del 21 al 40). Para la identificación de circRNAs, se utilizan los 20 pares de archivos FASTQ correspondientes a las muestras de RNA mayores a 200 nt, que contienen lecturas de extremos pareados o *paired ends* (PE) de 150 bases. Para asegurar la calidad de las lecturas obtenidas para cada muestra, se realizó un *trimming* de los datos eliminando secuencias provenientes de los adaptadores utilizados para preparar la

librería de secuenciación, los primeros y últimos nucleótidos de mala calidad de cada lectura, además de las lecturas de baja calidad en general. Este paso fue realizado utilizando la herramienta Trimmomatic versión 0.39 (Bolger y cols., 2014), usando un puntaje o *score* Phred de corte $Q > 28$. Los archivos resultantes, ahora con lecturas de “alta calidad”, contenían en promedio 31 millones de lecturas por muestra y fueron utilizados para la predicción y cuantificación de circRNAs presentes en cada una de las muestras (Figura 7).

Se escribieron *scripts* en Bash para automatizar el paso a paso referente a la predicción de circRNAs y se analizaron todas las muestras de RNAseq (20 pares de archivos FASTQ) de manera secuencial (Figura 7), usando los programas CIRCexplorer3 (Ma y cols., 2020) y CIRI2 (Gao y cols, 2018). Los resultados de ambos predictores fueron analizados de manera independiente y finalmente fueron comparados.

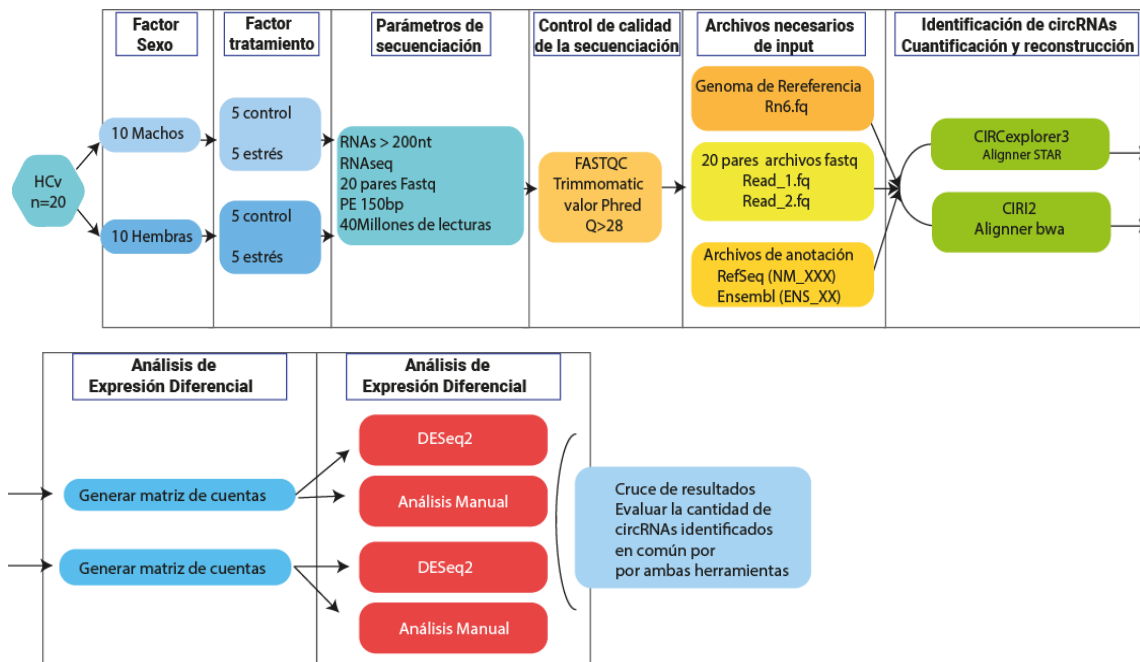


Figura 7. Flujo de trabajo a partir de los datos de secuenciación. Incluye el control de calidad y la automatización para la identificación de circRNAs con los algoritmos de predicción de circRNAs utilizados CIRCexplorer3 y CIRI2. Posteriormente un análisis de expresión diferencial con DESeq2 y un análisis manual.

Se utilizó el software CIRCexplorer3, el cual recibe como entrada los archivos FASTQ pareados (*read1* y *read2*), el genoma de referencia (*Rattus norvegicus*, rn6) y archivos de referencia conteniendo la anotación de los genes de la misma versión del genoma disponible en UCSC Genome Browser (knownGene.txt y refFlat.txt). En una primera etapa, CIRCexplorer3 realiza un alineamiento de las lecturas contra el genoma de referencia usando el alineador HISAT2 versión 2.0.5 (parameters: hisat2 --no-softclip --score-min L,-16,0 --mp 7,7 --rfg 0,7 --rdg 0,7 --dta -k 1 --max-seeds 20) (Kim y cols., 2015) y el archivo de anotación. En esta etapa, son mapeadas principalmente las lecturas correspondientes a genes codificantes o por eventos de *splicing* canónico, obteniendo como salida un archivo que conserva todas las lecturas no mapeadas por este alineador. Las lecturas sin mapear ahora sirven de entrada para el alineador STAR (--chimSegmentMin 10) (Dobin y cols., 2013), que mapea estas lecturas al genoma de referencia apoyado con el mismo archivo de anotación, pero esta vez identificando y obteniendo las lecturas candidatas a formar *back splice junctions* (BSJ), sitio de identificación de los circRNAs. Luego, para identificar de forma precisa las posiciones de los sitios dador y acceptor de cada evento de *back-splicing*, cada BSJ es remapeada contra el archivo de anotación (Zhang y cols., 2014), obteniendo un archivo de salida llamado "circRNA_known.txt". Este archivo contiene columnas con diversas anotaciones en relación al circRNA predicho, tales como: circRNA_ID, cromosoma, inicio, término, hebra, cantidad de lecturas para las BSJ, cantidad de exones contenidos en el circRNA, tamaño de estos exones, intrones flanqueantes a la BSJ, el transcrito que origina al circRNA, entre otras.

De forma complementaria, se utilizó el software CIRIquant, última versión de CIRI2 que incluye un primer paso de alineamiento de transcritos codificantes con HISAT2, al igual que CIRCexplorer3, pero luego sigue el *pipeline* de CIRI2. CIRI2 es una herramienta para la identificación *de novo* de circRNAs. CIRI2 utiliza como entrada los archivos FASTQ pareados (*read1* y *read2*) y el mismo archivo de genoma de referencia y de anotación utilizados con CIRCexplorer3. Las lecturas son mapeadas al genoma de referencia utilizando el alineador BWA (Li & Durbin, 2009). Este alineador escanea los archivos SAM (obtenidos del mapeo contra el genoma de referencia) dos veces. Brevemente, durante el primer escaneo se detectan las BSJ con señales PCC (*Paired Chiastic Clipping*), que reflejan

un circRNA candidato. Se implementa un filtro usando un mapeo de extremos pares (PEM) y señales de *splicing junction* (GT-AG) para los eventos de BSJ. Después de agrupar las lecturas BSJ y registrar los candidatos de circRNAs, CIRI2 escanea nuevamente el alineamiento SAM para detectar las BSJ adicionales y, mientras tanto, realiza un filtrado adicional para eliminar candidatos falsos positivos resultantes de lecturas mapeadas incorrectamente a genes homólogos o secuencias repetitivas (Gao y cols., 2015). Finalmente, se obtiene como salida un archivo “out.ciri”, el cual contiene información de anotación referente al circRNA predicho: circRNA_ID, cromosoma, inicio, término, hebra, cantidad de lecturas BSJ, cantidad de lecturas mapeadas al interior del circRNA, intrones flanqueantes, entre otros.

Tras la obtención de la salida de ambas herramientas, sus resultados fueron analizados por separado, con los 20 pares de archivos con la lista de circRNAs identificados manipulados en R v3.6.1. El identificador “circRNA_ID” de estos circRNAs predichos consiste en la unión del cromosoma de origen, la posición de inicio y término del *locus* del circRNA (ej. Chr2:22950023|22964734). De esta manera, ambas herramientas permiten recuperar el mismo circRNA a partir de sus coordenadas genómicas. Para esto, se debe sumar 1 nt a la coordenada de inicio al circRNA_ID obtenido por CIRCexplorer3, debido a que en esta herramienta se realiza el alineamiento considerando la posición 0 como el inicio, mientras que en CIRI2, el inicio es considerado como la posición 1 en el genoma de referencia (Liu y cols., 2019). De esta forma, ambos identificadores provenientes de las diferentes herramientas pueden ser comparados entre ellos y con la base de datos circAtlas 2.0 (Ji y cols., 2019).

4.5 Análisis de expresión diferencial de circRNAs

Para realizar los análisis de expresión diferencial de circRNAs, se trabajó en paralelo los resultados obtenidos por CIRCexplorer3 y CIRI2. Utilizando el circRNA_ID y el número de lecturas cuantificadas por cada programa, se construye una “matriz de cuentas”. En esta matriz, la primera columna corresponde a circRNA_ID, mientras que el título de las demás columnas corresponde a un identificador asociado a cada muestra (número de la muestra, sexo y condición). El contenido de estas columnas es la cantidad de lecturas

referente a cada muestra. Basado en la literatura (Xi y cols., 2019), son considerados como expresados en una condición aquellas muestras conteniendo más de dos lecturas en la matriz. Luego, se suma 1 cuenta a toda la matriz para evitar los ceros en el análisis de expresión diferencial.

El análisis de expresión diferencial se realizó a través de dos abordajes distintos. El primero utiliza el programa DESeq2 (Love y cols., 2014). Esta herramienta no requiere una normalización previa de los datos, siendo realizada internamente. Se utiliza como entrada la matriz de cuentas generada en el paso anterior y un archivo de anotación conteniendo identificadores para cada una de las condiciones utilizadas. Para determinar circRNAs expresados diferencialmente se estableció un umbral de $p\text{-value} < 0,05$ y un $|\log_2(\text{FC})| > 1$. El segundo abordaje consistió en una normalización realizada usando la cantidad de lecturas para un circRNA por la suma de lecturas obtenidas para esta muestra. De esta forma se obtienen valores normalizados y, en seguida, se aplica una transformación de los datos a escala \log_2 , luego se obtiene el promedio de estos valores para cada condición y realizar las comparaciones. Finalmente, para obtener los circRNAs diferencialmente expresados, obtenemos las veces de cambio $\log_2(\text{FC})$ a través de la sustracción entre las condiciones en comparación (**Fórmula 1**). Consideramos como diferencialmente expresados aquellos circRNAs con un $|\log_2(\text{FC})| > 1$. Los resultados de los dos abordajes fueron comparados con el objetivo de definir el conjunto final de circRNAs expresados diferencialmente, obteniendo una mayor robustez de los datos al ver similitudes entre ambos.

$$\log_2 \left(\frac{\text{cuentas circRNA}}{\sum \text{cuentas circRNAs en la muestra}} \right) \bar{x}_{\text{condición1}} - \log_2 \left(\frac{\text{cuentas circRNA}}{\sum \text{cuentas circRNAs en la muestra}} \right) \bar{x}_{\text{condición2 referencia}} = \log_2(\text{Veces de cambio})$$

Fórmula 1. Normalización de cuentas de circRNAs. Cálculo de las veces de cambio de los circRNAs durante la comparación de condiciones.

4.6 Análisis de enriquecimiento funcional

Con la información del conjunto de circRNAs diferencialmente expresados se realizó un análisis de enriquecimiento funcional usando R v3.6.1, a través del paquete enrichR v2.1 (Kuleshov y cols., 2016), utilizando como entrada los genes de origen de los circRNAs

expresados diferencialmente, y como *background* se utilizaron todos los genes presentes en la anotación del genoma humano. Estos genes fueron asociados con la librería de Proceso Biológico y Componente Celular del *Gene Ontology* (*GO Biological Process*, *GO Cellular Component*). La visualización fue realizada con el paquete de R *ggplot2* v3.2.1.

4.7 Análisis de expresión diferencial de miRNA

El análisis de identificación y expresión diferencial de miRNAs fue realizado en el Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética por Wladimir Corrales, a partir de los datos de secuenciación de las muestras etiquetadas del 21 al 40, las cuales corresponden a los RNAs menores a 200 nt. Se utilizó *Rsubread* version 2.0.0 (Liao & Smyth, 2019) para las etapas de alineamiento y cuantificación de los transcritos y la anotación de los transcritos fue realizada con los datos de miRBase que incluye 764 miRNAs de rata (Kozomara & Griffiths-jones, 2011). Consideramos como diferencialmente expresados aquellos miRNAs con un $|\log_2(\text{FC})| > 0.5$ y $p\text{-value} < 0.05$.

4.8 Análisis de expresión de mRNAs

Se realizó el análisis de transcritos codificantes utilizando el genoma de referencia de rata *Rattus norvegicus*, rn6 y el archivo de anotación de los genes de la misma versión del genoma disponible en UCSC Genome Browser (Rnor_6.0.98.gtf). Adicionalmente, se descargaron los archivos de índice para utilizar HISAT2 con esta versión del genoma de referencia (<ftp://ftp.ccb.jhu.edu/pub/infphilo/hisat2/data/rn6.tar.gz>). Las lecturas fueron alineadas usando HISAT2 con los parámetros *-dta-cufflinks* y *-S*, que hace la búsqueda de sitios de corte y empalme para luego entregar el informe del alineamiento a medida para usar con *cufflinks* y guardar el alineamiento en formato SAM. Usando *samtools* (Li y cols., 2009) (*view -bS*), se convierte el archivo SAM a BAM y luego se ordena (*samtools sort*). Se ejecuta *cuffcompare* y *cuffdiff* (*-FDR 0.2*) (Trapnell y cols., 2012), el cual toma el archivo gtf de transcritos con los archivos BAM de las muestras y produce los archivos con los niveles de expresión de transcritos, transcritos primarios y genes.

4.9 Predicción de sitios de unión a miRNAs en circNlgn1

La predicción de sitios de unión a miRNAs, también conocidos como MREs, presentes en la secuencia de circNlgn1 fue realizada con RNA22 (Miranda y cols., 2006) utilizando la secuencia de los miRNA expresados diferencialmente obtenida de miRBase (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011)

4.10 Predicción de blancos de miRNAs

Las interacciones miRNA-mRNA fueron predichas utilizando la base de datos miRDB (Chen & Wang, 2020). Los puntajes de predicción de miRDB van entre 50-100. Estos puntajes son asignados por su algoritmo y recomiendan utilizar un valor de predicción de interacción mayor a 80 para encontrar interacciones mayormente probables. Los transcritos seleccionados para la interacción con circNlgn1 son transcritos presentes en los datos de expresión de estos animales y que tienen un valor de predicción de interacción con los miRNA seleccionados mayor a 90 y para el análisis de enriquecimiento de blancos un valor mayor a 60.

4.11 Construcción de la red circRNA-miRNA-mRNA

La representación de la interacción de circNlgn1 con los miRNA diferencialmente expresados, y de estos con sus probables transcritos blancos se realizó utilizando el software Cytoscape 3.8.0 (Shannon y cols., 2003).

4.12 Cuantificación y análisis estadísticos

Todas las pruebas estadísticas, las significancias estadísticas de la comparación de promedios y el número de muestras están expuestos en las respectivas leyendas de figuras. Los análisis estadísticos bioinformáticas están descritos en las respectivas secciones de métodos.

5. RESULTADOS

5.1 Evaluación de los efectos del estrés crónico en ratas macho y hembra

Dentro de los efectos fisiológicos que produce el estrés crónico en las ratas, se encuentra en primer lugar una alteración del consumo de alimento diferente en ratas macho y hembra. El estrés crónico no afectó el consumo de alimento diario en ratas macho. Sin embargo, en hembras, el grupo estresado consumió en promedio 8 g menos que el grupo control y 10 g menos que los machos estresados. Estos resultados evidencian que el estrés crónico afecta el consumo de alimento mayormente en ratas hembra (**Figura 8A**). En segundo lugar, otro parámetro fisiológico que cambia por efecto del estrés crónico es el número de heces por día, de manera que las ratas macho producen dos veces más heces, mientras que las hembras producen cinco veces más heces en comparación con sus respectivos controles. La activación del eje HHA por efecto del estrés, con la consecuente liberación de CRH, puede producir un aumento en la motilidad intestinal (Lenz y cols., 1988), que parece ser más efectivo en ratas hembra que en machos (**Figura 8A**). En tercer lugar, una evaluación del porcentaje de ganancia de peso de los animales luego del experimento evidenció que las ratas macho aumentaron de peso con una ganancia 2 veces mayor que las ratas hembra control. Este porcentaje de ganancia de peso se redujo aproximadamente en el 50% por efecto del estrés crónico. Este parámetro, además, muestra que el estrés afectó en mayor medida a las ratas macho, probablemente por un mayor gasto energético durante la sesión de restricción y/o menor absorción de nutrientes reflejado en el aumento del número de deposiciones. En las hembras, no se evidencian mayores diferencias en este parámetro ya que, con la disminución en el consumo del alimento, sumado a la mayor cantidad de heces, estas ratas lograron conservar su masa probablemente optimizando su metabolismo (**Figura 8A**).

Un cuarto parámetro fisiológico evaluado fue la regularidad del ciclo estral en las ratas hembra durante el periodo de estrés crónico. El ciclo estral de las ratas no se vio mayormente afectado, con el grupo de ratas control mostrando un ciclo estral regular de cuatro días. En ratas estresadas crónicamente, a pesar de que presentan una tendencia a permanecer más días en diestro, no muestra diferencias respecto al grupo control. Estos resultados indican que hubo una tendencia de las ratas estresadas a disminuir la cantidad de días que estaban en el metaestro y aumentaron los días en diestro (**Figura 8B**).

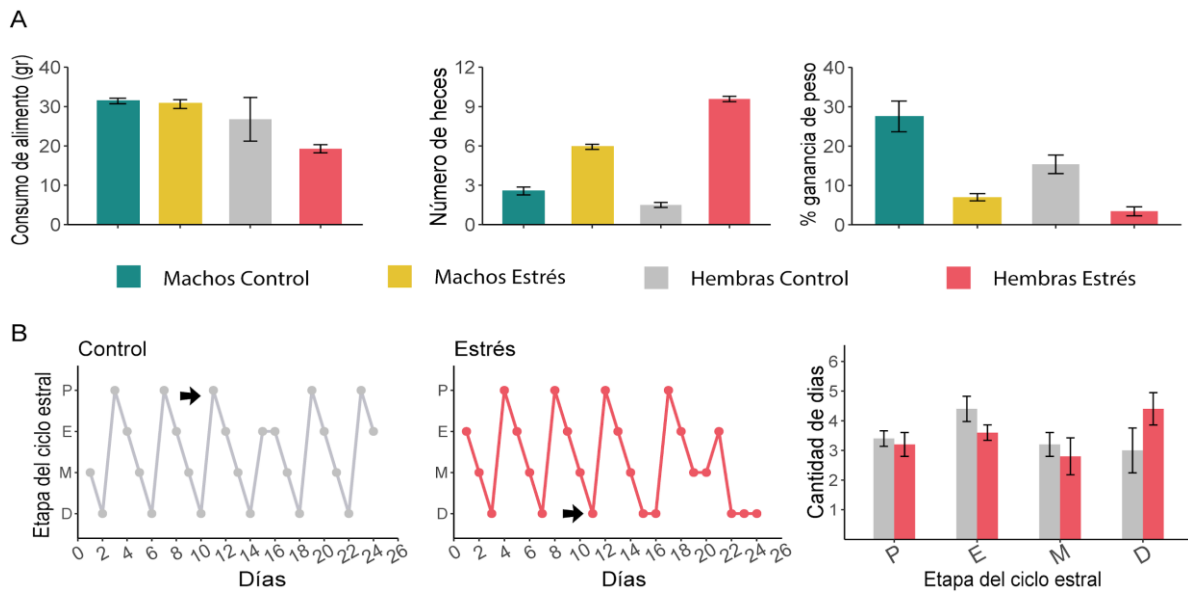


Figura 8. Evaluación de los efectos del estrés sobre parámetros fisiológicos: (A) consumo de alimento diario promedio por animal, número de heces por día, porcentaje de ganancia de peso al final del experimento. Los gráficos representan valores promedio \pm SEM de los correspondientes grupos experimentales. (B). Efecto del estrés crónico en el ciclo estral de las ratas hembra .Se representa el progreso de los ciclos de una rata perteneciente al grupo control y el ciclo estral de una rata perteneciente al grupo estrés, en etapas a lo largo de los días la flecha indica el comienzo de las sesiones de estrés crónico por restricción de movimiento (P: Proestro, E: Estro, M: Metaestro, D: Diestro) y finalmente se presenta cantidad de días promedio en cada etapa del ciclo. Se aplicó el test de Mann Whitney, comparando la cantidad de días promedio en cada etapa para las cuatro etapas del ciclo por separado (hembras control (n=5), hembras estrés (n=5)), y no se encontraron diferencias significativas entre el grupo estrés vs control.

Finalmente, el conjunto de alteraciones en los parámetros descritos para ratas macho y hembra indican que hubo alteraciones fisiológicas importantes por efecto del estrés crónico, permitiendo continuar con la extracción del hipocampo y verificar, mediante secuenciación de RNA, los efectos transcriptómicos del estrés en el hipocampo ventral de ratas, con un enfoque particular en la identificación de circRNAs.

5.2 Diversidad de circRNAs en HCv de ratas

Luego de la secuenciación, la compañía BGI hizo entrega de los archivos FASTQ filtrados; es decir, sin lecturas de baja calidad y sin secuencias perteneciente a adaptadores. Se informó para las muestras mayores a 200 nt un promedio de 44,8 millones de lecturas limpias, su distribución en porcentaje de bases se muestra en la **Figura 9A**, y la distribución de calidad de las bases a lo largo de las lecturas se muestra en la **Figura 9B**. Para las muestras de RNA menores a 200 nt, se obtuvieron, en promedio, 20 millones de lecturas limpias, donde cerca del 50% corresponde a fragmentos de 22 nt (**Figura 9C**).

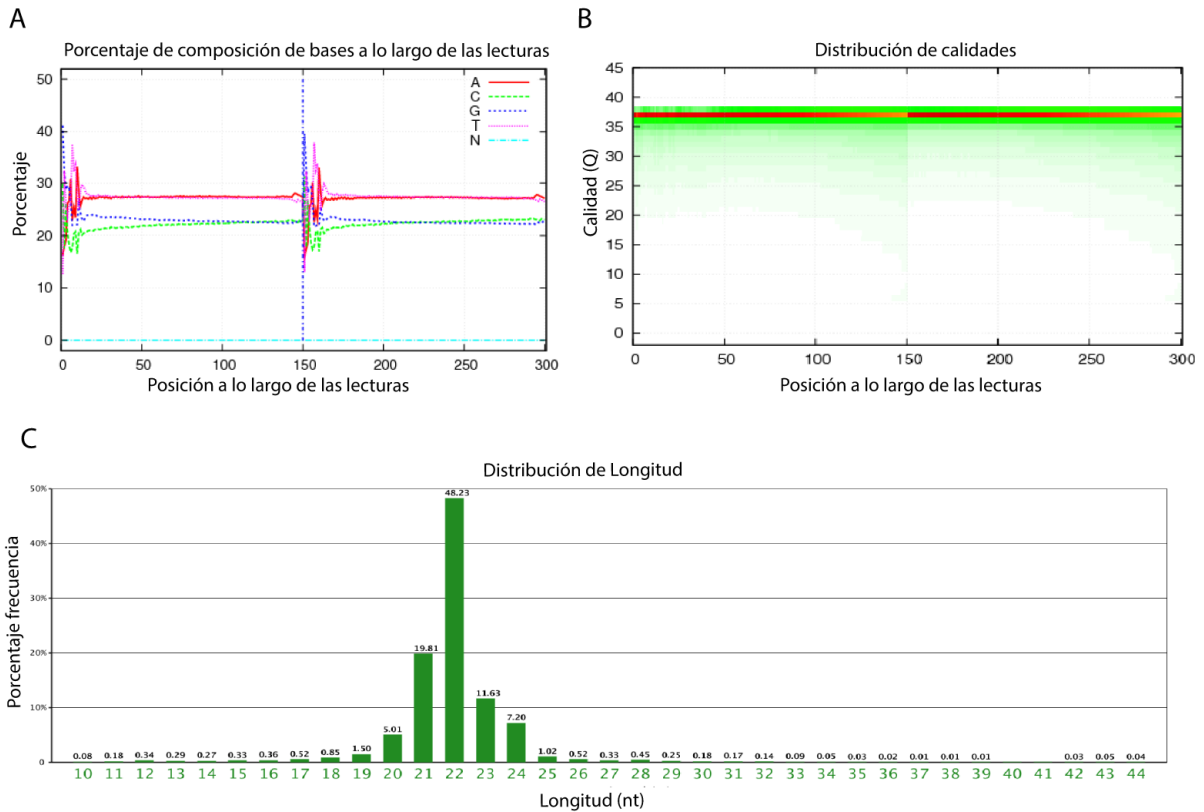


Figura 9. Reporte de la composición de las bases y calidad de las lecturas.(A) Composición de las lecturas en bases sobre el eje x, la posición 1-150 corresponde a la lectura 1 (*read 1*), y 151 a 300 bp representa a la lectura 2 (*read 2*), donde se muestra un composición balanceada, la curva A se superpone con la curva T, y la curva G con la curva C. (B) Distribución de la calidad de las bases en la escala Phred se presentan ambas lecturas sobre el eje x, mostrando calidad superior a $Q>33$. (C) Reporte distribución de longitud para los RNA menores a 200nt. Se presenta el porcentaje de lecturas compuestas por determinada cantidad de nucleótidos, alrededor del 50% de las lecturas posee un largo de 22 nt.

Para asegurar aún más la calidad de las lecturas a utilizar en los análisis de identificación de circRNAs, se realizó un “*trimming*” eliminando lecturas de baja calidad y remanentes de los adaptadores utilizados en la preparación de librerías, como se describió en la sección de metodología. Este proceso conservó un 70% de las lecturas que, en promedio, corresponden a 32,1 millones de lecturas por muestra (**Figura 10A**). Luego, se utilizaron los algoritmos de detección de circRNAs, CIRCexplorer3 y CIRI2. Estas herramientas identifican la característica principal de los circRNAs a partir del

alineamiento, la unión circular denominada *back-splice-junction* (BSJ) y determinan la cantidad de lecturas pertenecientes a esta unión para cada circRNA. Además, se determinó que la suma de las lecturas mapeadas a la BSJ en cada muestra corresponde al 0.026% de las lecturas totales (**Figura 10B**).

Sin contemplar la condición experimental correspondiente a cada muestra, y seleccionando los circRNAs que presentan más de dos lecturas para la unión característica, CIRCexplorer3 logró identificar en promedio 783 ± 180 circRNAs por muestra (**Figura 10C**), mientras que CIRI2 logró identificar un promedio de 1050 ± 332 circRNAs (**Figura 10D**). La cantidad de circRNAs identificados se ve influenciada por la cantidad inicial de lecturas totales para cada muestra, lo que se verifica en las muestras número 12 y 16, las cuales poseen una menor cantidad de lecturas totales y al mismo tiempo en éstas se identifican la menor cantidad de circRNAs (**Figura 10D**). Se identificó un **total de 10.829 circRNAs**, CIRCexplorer3 permitió detectar **5.483 circRNAs** distintos (no redundantes), mientras que CIRI2 logró identificar **8.820**. Ambas herramientas detectaron en común 3.474 circRNAs, equivalente al 32% de los candidatos. (**Figura 10E**).

La descripción obtenida mediante el análisis con CIRCexplorer3 permite caracterizar los circRNAs en cuanto a: (i) número de exones que retienen del transcrito de origen, donde se encontró que el 68,7% (3776/5483) de los circRNAs contienen entre 1 y 5 exones (**Figura 10F**); (ii) La longitud en nucleótidos que existe entre el sitio dador y aceptor del evento de *back-splicing*, encontrando que el 46% (2513/5483) de los circRNAs abarca menos de 10.000 nt, y que el 10% (553/5483) tiene una distancia menor a los 500 nt (**Figura 10G**); (iii) La distribución de los circRNAs respecto al cromosoma de origen señala que el 10% proviene del cromosoma 1, siendo el cromosoma que más produce circRNAs y solo 4 circRNAs son originados en el cromosoma Y (0,07%), con el número más bajo (**Figura 10H**). Finalmente, la última caracterización (iv) considera el tamaño de los exones presentes en los circRNAs identificados y se obtuvo un tamaño promedio de 840 nt, donde un 78% (4295/5483) tiene un tamaño de menos de 1kb (**Figura 10I**).

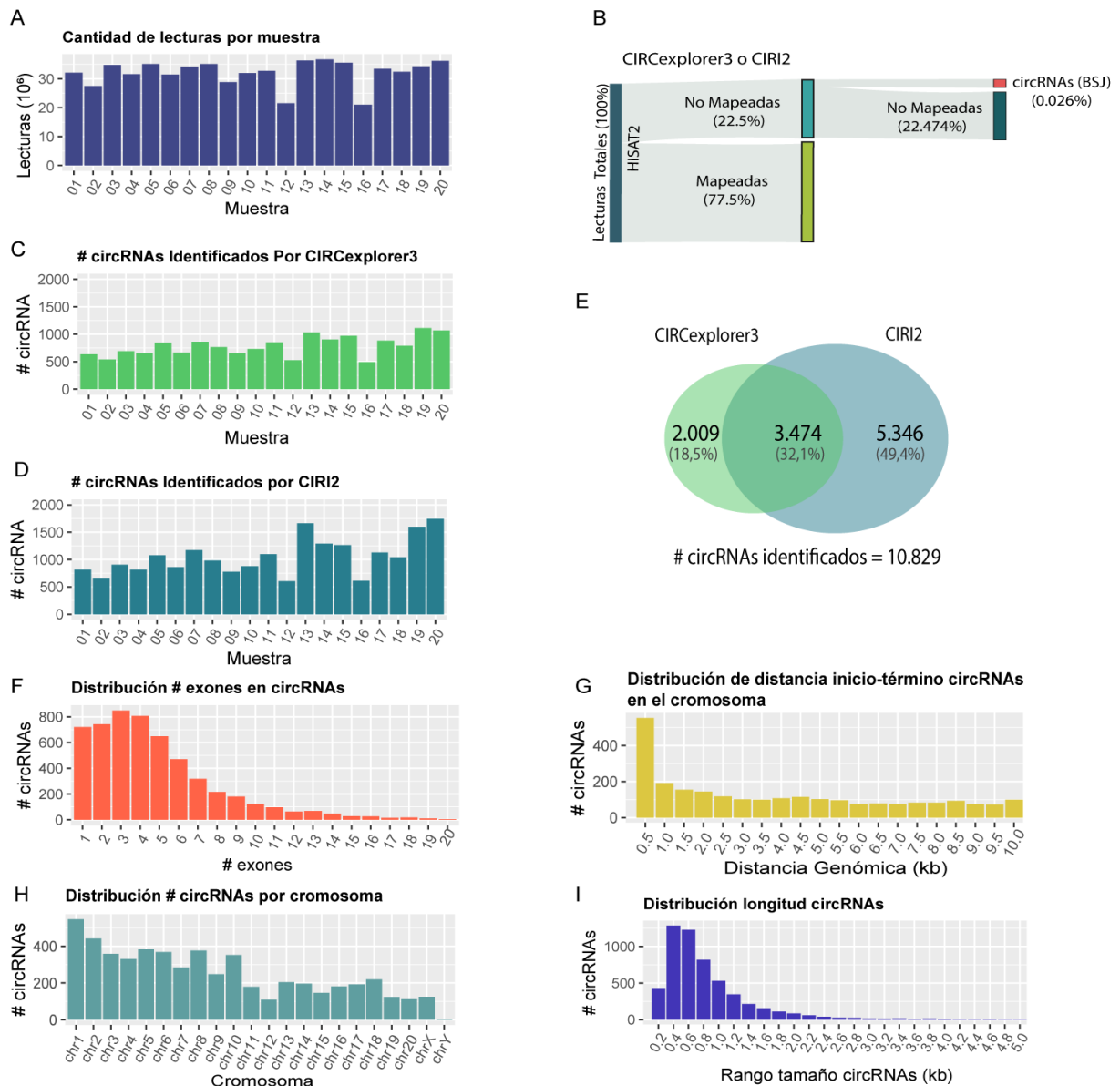


Figura 10. Diversidad de circRNAs identificados. (A) Número de lecturas en millones de lecturas obtenidas tras la secuenciación y posterior filtro de control de calidad para cada muestra. (B) Representación del porcentaje de lecturas mapeadas en cada muestra con HISAT2, porcentaje de lecturas no mapeadas y porcentaje de lecturas identificadas para circRNAs correspondiendo al 0,02% de las lecturas. (C) Número de circRNAs identificados por CIRCexplorer3 y (D) CIRI2 en cada una de las muestras. (E) Cantidad de circRNAs identificados (no redundantes) por cada una de las herramientas y los circRNAs identificados por ambas. (F) Número de exones utilizados en circRNAs identificados por CIRCexplorer3 (G) distancia genómica en kilobases que existe entre el sitio dador y aceptor. (H) Número de circRNAs identificados por cromosoma. (I) Distribución de la longitud de circRNAs considerando el tamaño de los exones contenidos, el promedio de tamaño de circRNAs es de 840 nt.

5.3 Identificación de circRNAs expresados diferencialmente por sexo y en respuesta al estrés crónico.

El análisis de expresión diferencial de circRNAs permite obtener aquellos que presentan mayor expresión y los que presentan menor expresión en determinada condición respecto a la otra. Se realizaron cuatro comparaciones que permiten evidenciar: (i) La expresión diferencial de circRNAs entre grupos control, obteniendo veces de cambio de ratas hembra respecto a las ratas macho (**Figura 11A**); (ii) el efecto del estrés crónico sobre la expresión de circRNAs en ratas macho (**Figura 11B**); (iii) el efecto del estrés crónico sobre la expresión de circRNAs en ratas hembra (**Figura 11C**); y (iv) la expresión diferencial de circRNAs de ratas hembra estresadas respecto a las ratas macho estresadas (**Figura 11D**). Según el análisis realizado con los **resultados obtenidos con CIRCexplorer3**, al comparar los grupos controles de ratas hembra y ratas macho, se encontraron 56 circRNAs, de los cuales 35 tienen alta expresión en ratas hembra y 21 tienen alta expresión en machos (**Figura 11A**). Un total de 41 circRNAs cambian sus niveles de expresión significativamente en HCv producto del estrés crónico en ratas macho (**Figura 11B**) y 44 circRNAs en ratas hembra (**Figura 11C**). Por último, comparando las ratas hembra estresadas con las ratas macho, 47 circRNAs están expresados diferencialmente, 32 poseen un mayor nivel de expresión en ratas hembra que en ratas macho y 15 poseen un menor nivel de expresión (**Figura 11D**). Se resumen estos resultados junto con la dirección del cambio en la **Figura 11E**.

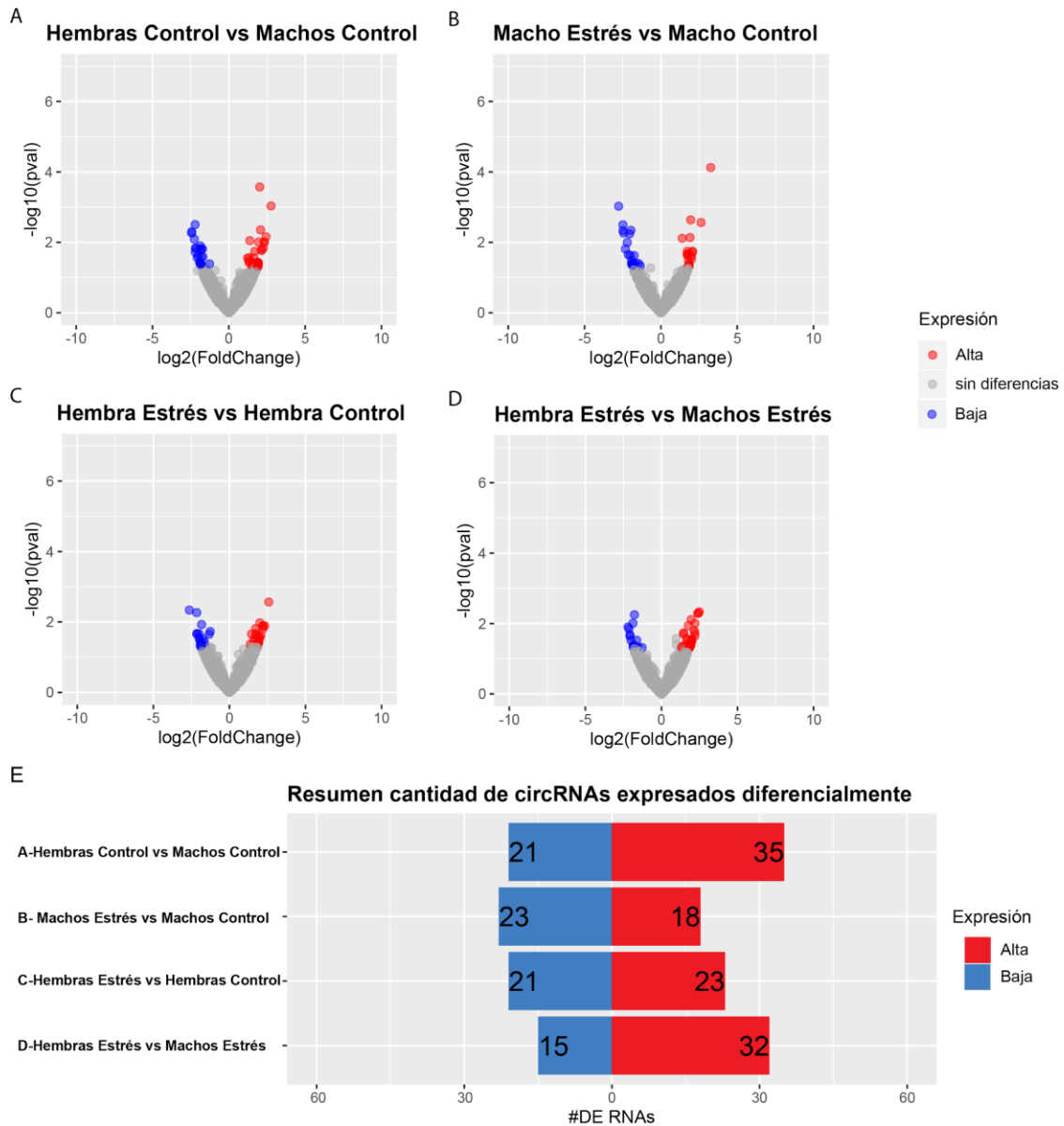


Figura 11. Análisis de expresión diferencial para circRNAs identificados con CIRCexplorer3 utilizando DESeq2. Los gráficos volcán representan (A) la expresión diferencial de circRNAs en ratas no estresadas dependiendo del sexo; el efecto del estrés en ratas (B) macho y (C) en ratas hembra sobre los niveles de expresión de circRNAs (aumento en rojo, disminución en azul). (D) Se representa la comparación entre machos y hembras estresadas. Para cada una de las comparaciones como valor umbral p -value <0.05 y las veces de cambio $|\log_2(\text{FC})| > 1$. (E) Muestra el resumen en número de circRNAs expresados diferencialmente y la dirección de cambio para las cuatro comparaciones.

Se realizó el mismo análisis y comparaciones con los resultados obtenidos mediante CIRI2. Al comparar la expresión de circRNAs según el sexo entre los animales control, se observa que 50 circRNAs están altamente expresados en ratas hembra contra 38 circRNAs que están altamente expresados en machos (**Figura 12A**). Por otro lado, el estrés crónico en ratas macho induce un aumento en los niveles de 40 circRNAs y la reducción en los niveles de 43 circRNAs (**Figura 12B**). En el caso de las ratas hembra, 51 circRNAs aumentan su expresión y 41 disminuyen su expresión en respuesta al estrés (**Figura 12C**). Finalmente, con la idea de comparar el efecto del sexo sobre la respuesta del estrés, se comparó la expresión ratas hembra y machos estresadas, y se determinó que 52 circRNAs poseen un mayor nivel de expresión en ratas hembra que en ratas macho y 26 poseen un menor nivel de expresión en ratas hembra en comparación a las ratas macho (**Figura 12D**). El resumen de los circRNAs obtenidos para cada una de las comparaciones se muestra en la **Figura 12E**.

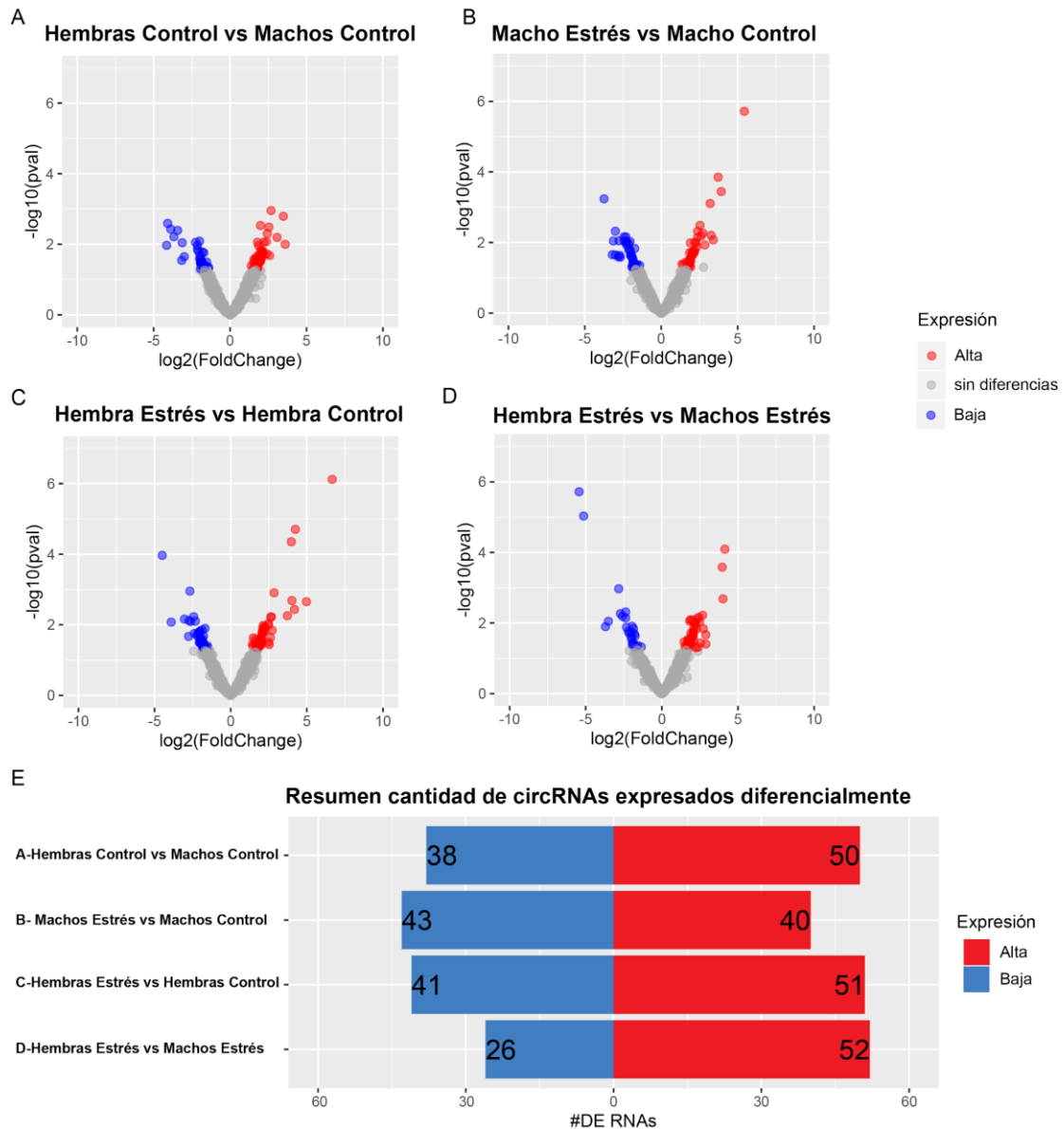


Figura 12. Análisis de expresión diferencial para circRNAs identificados con CIRI2 utilizando DESeq2. Los gráficos volcán representan (A) la expresión diferencial de circRNAs dependiendo del sexo en ratas no estresadas; (B) expresión diferencial de circRNAs por efecto del estrés en ratas macho y (C) en ratas hembra (aumento en rojo, disminución en azul), (D) expresión diferencial de circRNAs al comparar ratas hembra estresadas respecto a ratas macho estresadas. Para cada una de las comparaciones se consideró como valor umbral $p < 0.05$ y las veces de cambio $|\log_2(FC)| > 1$. (E) Muestra el resumen en número de circRNAs expresados diferencialmente y la dirección de cambio para las cuatro comparaciones.

Posteriormente, se contrastaron los resultados de los circRNAs expresados diferencialmente obtenidos por ambas herramientas (CIRI2 y CIRCexplorer3), respecto a la identidad y dirección de cambio. En la **Figura 13**, se indica el número total de circRNAs expresados diferencialmente obtenidos en cada comparación (#Total circRNAs). Estos resultados indican que 1,2% (130/10.829) de los circRNAs identificados en conjunto entre ambos algoritmos, se expresan diferencialmente por efecto del sexo y un 10,8% de estos circRNAs son identificados, al mismo tiempo, por ambas herramientas. El estrés crónico en ratas macho produce la expresión diferencial de un 1% (110/10.829) de los circRNAs identificados, de los cuales 12,7% son identificados por ambos algoritmos, mientras que un 1.6% (125/10.829) de los circRNAs se expresa diferencialmente en ratas hembra, donde un 8.8% de estos circRNAs es identificado por CIRI2 y CIRCexplorer3. Por último, un 1.1% (120/10.829) de los circRNAs se identifican como diferencialmente expresados al comparar los grupos de ratas macho y hembra estresados con una coincidencia de 4%.

Es importante mencionar que el análisis de expresión diferencial realizado con DESeq2 fue filtrado por p -value < 0.05. En la **Tabla 1** se indican los circRNAs diferencialmente expresados, identificados por ambas herramientas en cada una de las comparaciones realizadas. Se descartó el uso del p -value ajustado dado que la poca abundancia de cuentas para los circRNAs, torna el análisis realizado por DESeq2 demasiado restrictivo descartando posibles candidatos positivos.

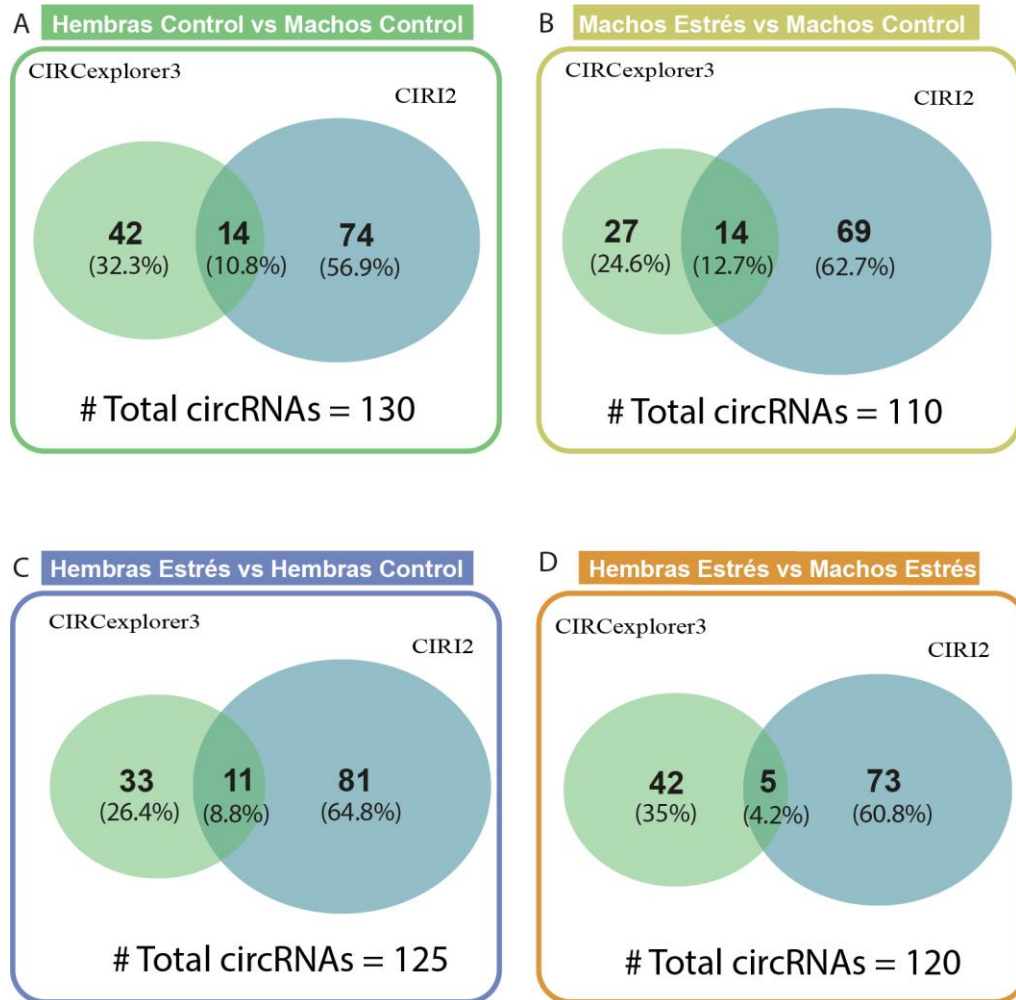


Figura 13. Número circRNAs consenso entre CIRCexplorer3 y CIRI2 diferencialmente expresados al comparar las cuatro condiciones experimentales. Se presenta el número de circRNAs expresados diferencialmente obtenidos por cada herramienta y el grado de coincidencia según el análisis realizado con DESeq2 en cada uno de los contrastes realizados. **(A)** Comparación entre grupos control, 130 circRNAs se expresan diferencialmente; **(B)** 102 circRNAs son diferencialmente expresados por efecto del estrés en ratas macho y **(C)** 123 en hembras; **(D)** 107 circRNAs son expresados diferencialmente al comparar los grupos estresados identificado circRNAs característicos de machos y hembras por efecto del estrés.

Tabla 1. circRNAs diferencialmente expresados identificados en común por CIRCexplorer3 y CIRI2 en el análisis con DESeq2

circRNAs diferencialmente expresados en ratas hembra respecto a machos control							
circAtlas_ID	circRNA_ID	Hebra	Nombre del gen	Regulación	log2(FC)	p-value	p-ajustado
rno-Gabrg3_0001	chr1:112435003 112436794	-	Gabrg3	Up	2.765528	0.0009262812	0.8729442
rno-Specc1l_0001	chr20:14358034 14375435	-	Specc1l	Up	2.432956	0.0069261124	0.8729442
rno-Chchd6_0001	chr4:121539774 121545300	-	Chchd6	Up	2.321924	0.0097911262	0.8729442
rno-Arl8b_0001	chr4:140870956 140876764	+	Arl8b	Up	2.078000	0.0044175344	0.8729442
rno-Rrn3_0007	chr10:3191466 3204962	+	Rrn3	Up	1.847993	0.0428440246	0.8729442
rno-Cacna2d1_0006	chr4:15748952 15780820	-	Cacna2d1	Up	1.700439	0.0418413248	0.8729442
rno-AC126641_0007	chr1:136685583 136699335	-	Sv2b	Up	1.700438	0.0179796915	0.8729442
rno-Morc3_0005	chr11:34060061 34073206	+	Morc3	Up	1.231325	0.0283789025	0.8729442
rno-Wdr47_0005	chr2:211409922 211433553	+	Wdr47	Down	-1.700438	0.0259205273	0.8729442
rno-Epb41l5_0001	chr13:35597461 35608096	-	Epb41l5	Down	-1.807352	0.0151500665	0.8729442
rno-Srp54a_0003	chr6:76020952 76031336	+	Srp54a	Down	-1.807352	0.0258724843	0.8729442
rno-Ptptra_0004	chr3:123031310 123043172	+	Ptptra	Down	-1.847993	0.0405482612	0.8729442
rno-Ubac2_0001	chr15:108315937 108318732	+	Ubac2	Down	-2.201630	0.0147426436	0.8729442
rno-Kmt2e_0004	chr4:8223839 8242710	-	Kmt2e	Down	-2.432953	0.0054501024	0.8729442

circRNAs diferencialmente expresado en ratas macho por efecto del estrés crónico							
circAtlas_ID	circRNA_ID	Hebra	Nombre del gen	Regulación	log2(FC)	p-value	p-ajustado
rno-Gabrg3_0001	chr1:112435003 112436794	-	Gabrg3	Up	3.263028	7.531562e-05	0.4129555
rno-Mllt3_0005	chr5:106171073 106202563	-	Mllt3	Up	2.070387	1.902481e-02	0.9600145
rno-Hdac4_0007	chr9:99266782 99267021	-	Hdac4	Up	2.070386	1.792270e-02	0.9600145
rno-Dmd_0004	chrX:51713404 51794841	+	Dmd	Up	1.999995	3.010685e-02	0.9600145
rno-AC126641_0007	chr1:136685583 136699335	-	Sv2b	Up	1.906889	7.337071e-03	0.9600145
rno-Slc4a4_0001	chr14:20749844 20769564	-	Slc4a4	Up	1.722464	2.304511e-02	0.9600145
rno-Srp54a_0003	chr6:76020952 76031336	+	Srp54a	Down	-1.637427	3.897070e-02	0.9600145
rno-Lrp6_0009	chr4:168219619 168221653	-	Lrp6	Down	-1.754885	2.379656e-02	0.9600145
rno-Ptptra_0004	chr3:123031310 123043172	+	Ptptra	Down	-1.847993	4.054826e-02	0.9600145
rno-Dennd4c_0002	chr5:105182876 105187360	+	Dennd4c	Down	-1.847994	4.025370e-02	0.9600145
rno-Cnksr2_0002	chrX:39860824 39885483	+	Cnksr2	Down	-1.963472	4.567702e-03	0.9600145
rno-AABR07058158_0001	chr7:102723272 102724348	+	AABR07058158.1	Down	-2.044392	5.738564e-03	0.9600145
rno-Kmt2e_0004	chr4:8223839 8242710	-	Kmt2e	Down	-2.432953	5.450102e-03	0.9600145
rno-Epb41l5_0001	chr13:35597461 35608096	-	Epb41l5	Down	-2.485422	3.178075e-03	0.9600145

circRNAs diferencialmente expresados en ratas hembra por efecto del estrés crónico							
circAtlas_ID	circRNA_ID	Hebra	Nombre del gen	Regulación	log2(FC)	p-value	p-ajustado
rno-AABR07006458_0001	chr1:235393348 235395737	-	Vps13a	Up	2.584959	0.002711768	0.9280854
rno-Ntrk3_0001	chr1:140131617 140142798	-	Ntrk3	Up	2.070389	0.024268399	0.9280854
rno-Sdccag8_0001	chr13:95003381 95013012	+	Sdccag8	Up	1.999998	0.010550926	0.9280854
rno-Tmem192_0002	chr16:26628564 26633439	-	Tmem192	Up	1.925998	0.034326843	0.9280854
rno-Tusc3_0004	chr16:56313380 56326806	+	Tusc3	Up	1.925996	0.036957894	0.9280854
rno-Hnrnp1_0007	chr10:35876012 35876397	+	Hnrnp1	Up	1.700438	0.031079040	0.9280854
rno-Fmnl2_0001	chr3:38609105 38614592	+	Fmnl2	Down	-1.584962	0.049051762	0.9280854
rno-Unc79_0004	chr6:126864142 126883987	+	Unc79	Down	-1.830074	0.011826992	0.9280854
rno-AC126641_0005	chr1:136690161 136699335	-	Sv2b	Down	-1.999998	0.028223496	0.9280854
rno-Dgkb_0010	chr6:57720452 57821418	+	Dgkb	Down	-2.152002	0.005425272	0.9280854
rno-Mlip_0003	chr8:84443615 84482700	-	Mlip	Down	-2.632265	0.004590028	0.9280854

circRNAs diferencialmente expresados en ratas hembra respecto a macho estresadas							
circAtlas_ID	circRNA_ID	Hebra	Nombre del gen	Regulación	log2(FC)	p-value	p-ajustado
rno-Gabrg1_0004	chr14:39985574 40035210	+	Gabrg1	Up	2.485424	0.004642952	1
rno-Glis3_0002	chr1:246472166 246476440	-	Glis3	Up	1.925997	0.031436810	1
rno-Arih1_0016	chr8:64205385 64214997	-	Arih1	Up	1.925996	0.032947219	1
rno-AABR07058539_0002	chr7:122834691 122835329	+	AABR07058539.1	Up	1.700440	0.029202201	1
rno-Gabrg3_0001	chr1:112435003 112436794	-	Gabrg3	Down	-1.777605	0.005602496	1

Además, se realizó un análisis de expresión diferencial manual como alternativa al análisis con DESeq2, de forma de validar estos resultados en un análisis menos restrictivo y así identificar una mayor cantidad de circRNAs para un posterior análisis de enriquecimiento con los genes de origen de los circRNAs. A partir de los resultados obtenidos con CIRCexplorer3, se realizó el mismo esquema de comparaciones descrito anteriormente. Al contrastar la expresión entre grupos control, se identificaron 325 circRNAs expresados diferencialmente dependiendo del sexo. En detalle, se identificaron 184 circRNAs de alta expresión en ratas hembra, mientras que 141 circRNAs tienen una mayor expresión en machos (**Figura 14A**). El efecto del estrés sobre el HCv produce la expresión diferencial de 306 circRNAs en ratas macho, donde 164 circRNAs aumentan y 142 disminuyen su expresión (**Figura 14B**), mientras que en las ratas hembra, 312 circRNAs se detectaron como diferencialmente expresados, correspondientes a 177 circRNAs que aumentan su expresión, mientras que 135 circRNAs disminuyen su expresión (**Figura 14C**). Por último, comparando los grupos de ratas estresadas, se obtiene un total de 307 circRNAs que presentan expresión diferencial por efecto del estrés, 150 circRNAs que están altamente expresados en ratas hembra, mientras que en los machos son 157 circRNAs (**Figura 14D**). Se resumen las cantidades de circRNAs obtenidos para cada una de las comparaciones en la **Figura 14E**.

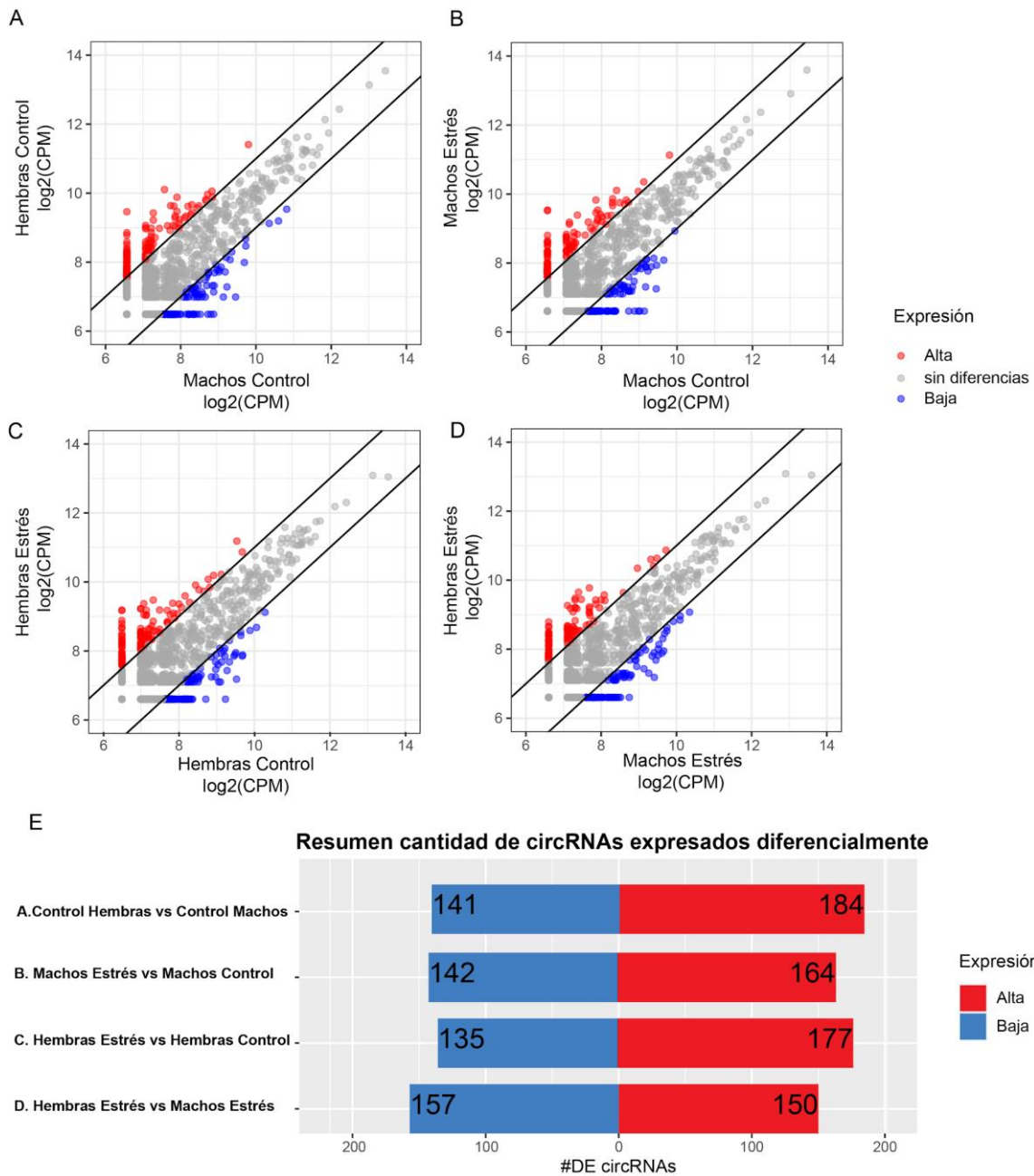


Figura 14. Análisis de expresión diferencial manual para la cuantificación de circRNAs realizada con CIRCexplorer3. Se presentan gráficos de dispersión para visualizar (A) la comparación entre controles e identificar circRNAs diferencialmente expresados dependiendo del sexo; (B) del efecto del estrés en ratas macho y (C) en ratas hembra sobre los niveles de expresión de circRNAs (aumento en rojo, disminución en azul). (D) Se presenta la expresión diferencial de circRNAs al comparar ratas hembra estresadas respecto a ratas macho estresadas. Se consideró para cada una de las comparaciones como valor umbral las veces de cambio $|\log_2(FC)| > 1$ (diagonales en negro). (E) Resumen en número de circRNAs expresados diferencialmente y la dirección de cambio para las cuatro comparaciones.

De forma similar, se realizó el análisis de expresión diferencial manual de circRNAs con los resultados otorgados por CIRI2 con el mismo esquema de comparaciones. Para evaluar el efecto del sexo, se compararon los grupos de ratas macho y hembra control, identificando 234 circRNAs altamente expresados en hembras y 222 circRNAs en machos (**Figura 15A**). El análisis de ratas macho estresadas indicó que 229 circRNAs aumentan y 187 disminuyen su expresión (**Figura 15B**). Por otro lado, en ratas hembra estresadas se verificó que 262 circRNAs aumentan su expresión; en cambio 230 circRNAs disminuyen su expresión (**Figura 15C**). Al comparar ambos grupos estresados (**Figura 15D**), se obtienen 228 circRNAs de alta expresión en ratas hembra estresadas mientras que 201 circRNAs presentan alta expresión en las ratas macho estresadas. Se resume el número de circRNAs que cambian para cada una de las comparaciones en la **Figura 15E**, donde se puede observar que las hembras estresadas presentan un mayor número de circRNAs que cambian su expresión respecto a las otras comparaciones.

Finalmente, se comparó el número de circRNAs diferencialmente expresados y el grado de coincidencia según el análisis realizado manualmente para los resultados obtenido con CIRCexplorer3 y CIRI2. De estos análisis se puede concluir que aproximadamente un 18% de los circRNAs expresados diferencialmente son identificados por ambas herramientas y que, además, coinciden en la dirección del cambio en cada una de las comparaciones (**Figura 16**).

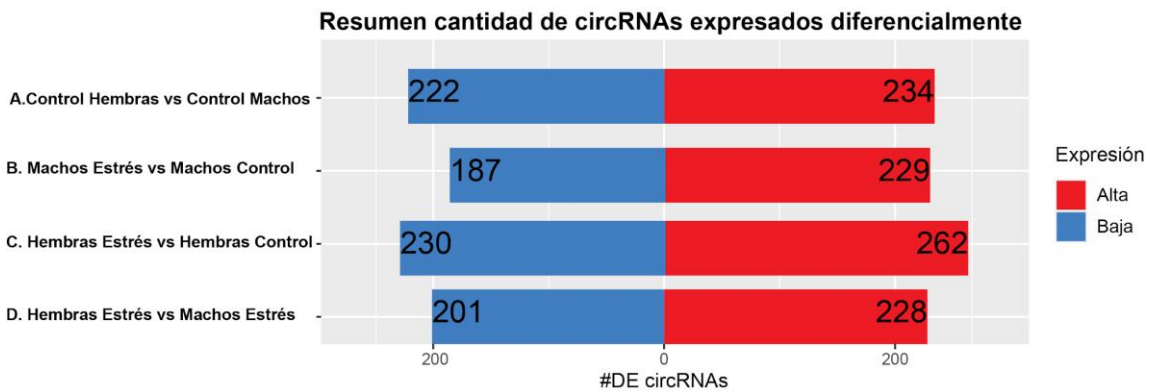
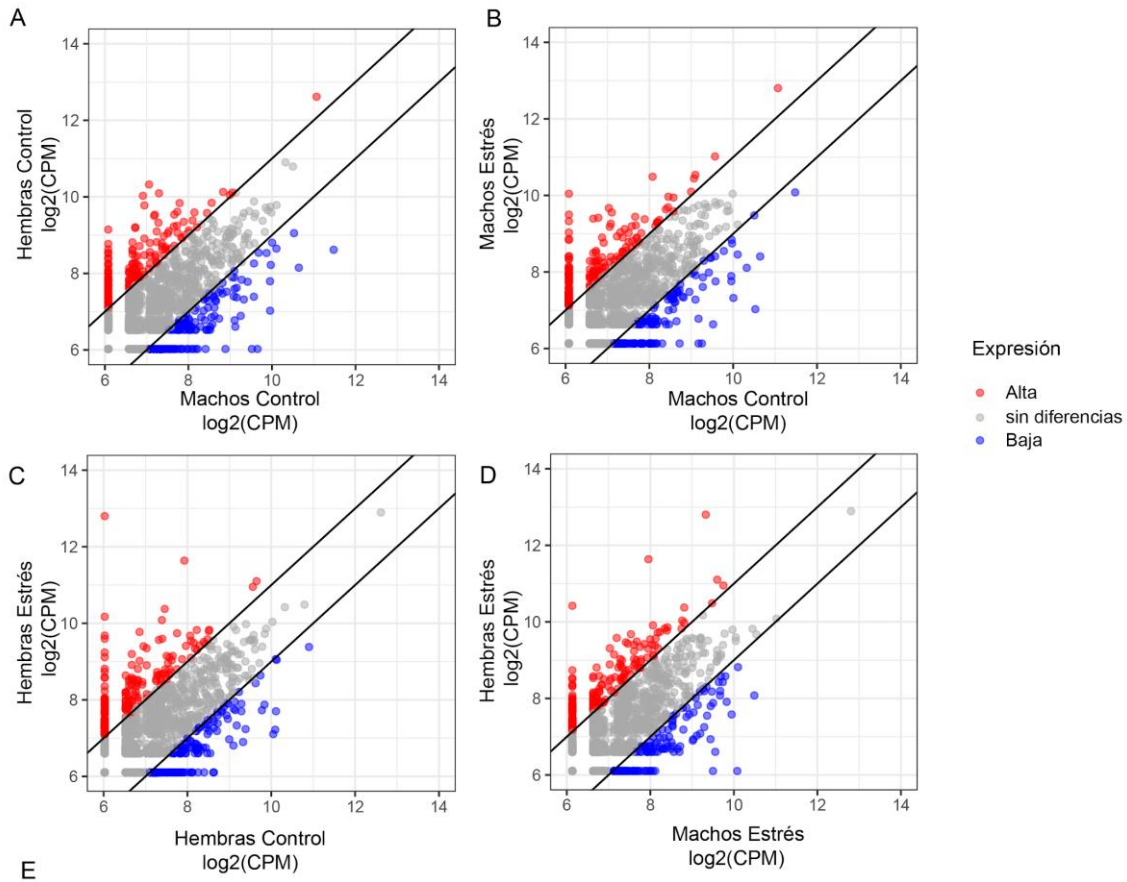
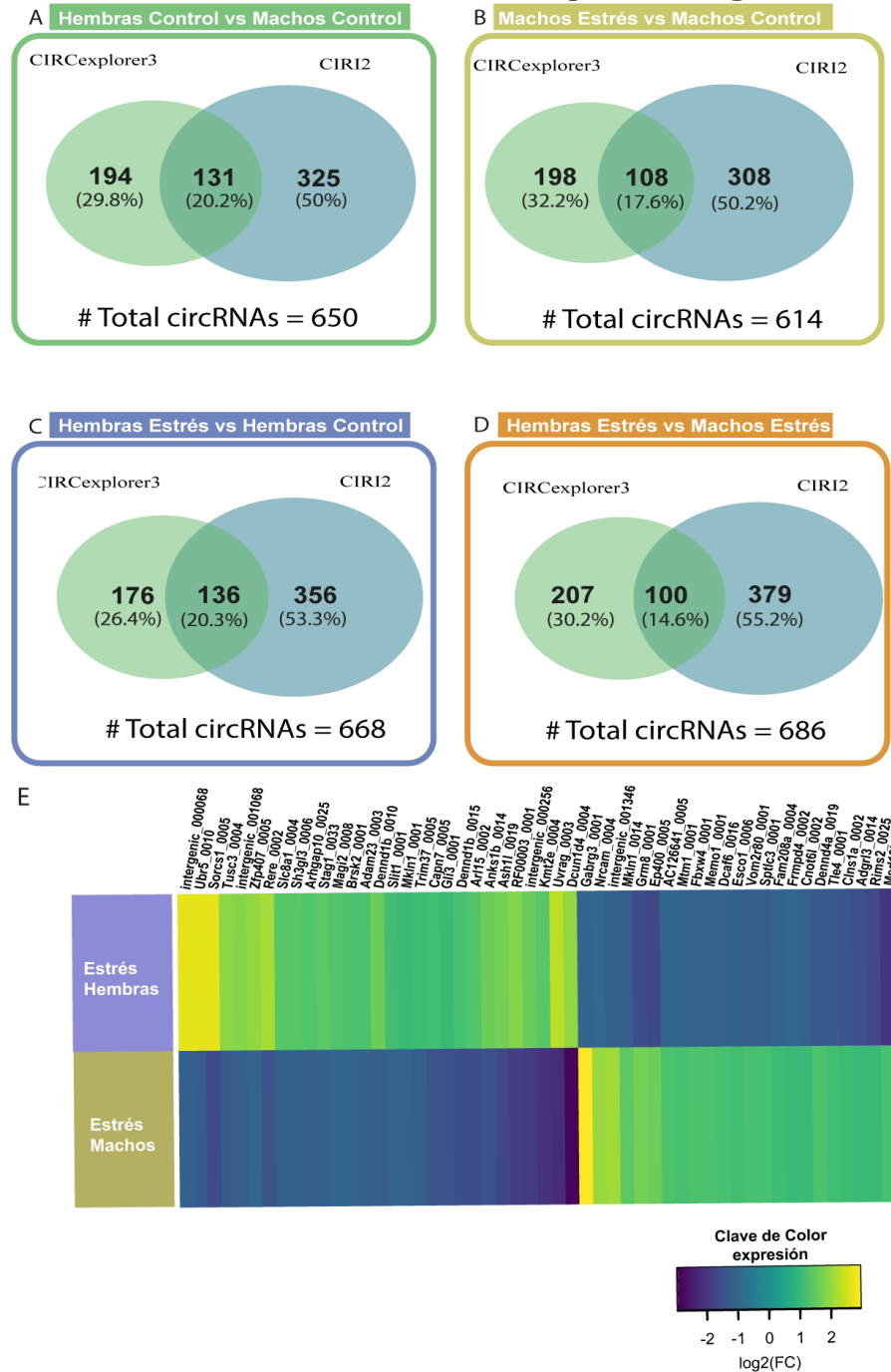


Figura 15. Análisis de expresión diferencial manual para la cuantificación de circRNAs realizada con CIRI2. Se presentan gráficos de dispersión para visualizar (A) la comparación entre controles e identificar circRNAs diferencialmente expresados dependiendo del sexo; (B) El efecto del estrés en ratas macho y (C) en ratas hembra sobre los niveles de expresión de circRNAs (aumento en rojo, disminución en azul). (D) Se presenta la expresión diferencial de circRNAs al comparar ratas hembra estresadas respecto a ratas macho estresadas. Se consideró se consideró para cada una de las comparaciones como valor umbral las veces de cambio $|\log_2(FC)| > 1$ (diagonales en negro). (E) Resumen en número de circRNAs expresados diferencialmente y la dirección de cambio para las cuatro comparaciones.

Figura 16. Número de circRNAs diferencialmente expresados según el análisis realizado



manualmente para los resultados obtenidos tras la identificación y cuantificación con CIRCexplorer3 y CIRI2. Se incluyen los niveles en log₂(FC) de circRNAs expresados en direcciones opuestas en ratas macho y hembra por efecto del estrés crónico, relativo a sus respectivos controles en una escala de color desde el azul (menor expresión por efecto del estrés) al amarillo (mayor expresión por efecto del estrés).

El análisis de expresión diferencial manual permitió aumentar el número de circRNAs identificados para cada una de las comparaciones. Además, se corroboró que los circRNAs diferencialmente expresados obtenidos con DESeq2, están contenidos en los resultados del análisis manual y coinciden en la dirección del cambio (aumento o disminución). Sin embargo, se observaron leves diferencias en las veces de cambio para cada circRNA, lo cual puede ser atribuible al método de normalización. Se verifica que existen circRNAs expresados diferencialmente en ratas macho y hembra dependiendo del sexo, donde además en ratas hembra existe un efecto mayor del estrés crónico en cuanto al número de circRNAs expresados diferencialmente. A partir de la **Figura 16**, se puede estimar que un 6% de los circRNAs identificados (650/10.829) se expresa diferencialmente dependiendo del sexo, un 5.6% (614/10.829) se expresa diferencialmente por efecto del estrés crónico en machos y un 6.2% (668/10.829) en ratas hembra. En la **Tabla 2** se presentan los 5 circRNAs diferencialmente expresados encontrados en común por ambas herramientas que tienen mayor y menor expresión en cada una de las comparaciones. Adicionalmente se identificaron circRNAs que cambian su expresión en direcciones opuestas por efecto del estrés crónico dependiendo del sexo (**Figura 16E**).

Tabla 2. circRNAs diferencialmente expresados mayor expresión identificados en común por CIRCexplorer3 y CIRI2 en el análisis manual

circRNAs diferencialmente expresado en ratas hembra respecto a machos control

circAtlas_ID	circRNA_ID	Hebra	Nombre del gen	Regulación	log2(FC)
rno-Arl8b_0001	chr4:140870956 140876764	+	Arl8b	Up	2.891388
rno-Gabrg3_0001	chr1:112435003 112436794	-	Gabrg3	Up	2.285872
rno-Specc1l_0001	chr20:14358034 14375435	-	Specc1l	Up	2.213495
rno-Polk_0001	chr2:27326040 27333634	-	Polk	Up	2.152217
rno-AC126641_0007	chr1:136685583 136699335	-	Sv2b	Up	1.995816
rno-Arl15_0002	chr2:45801785 45859187	+	Arl15	Down	-1.947469
rno-intergenic_000068	chr6:76613548 76626199	-	Ralgapa1	Down	-2.030825
rno-Epb4115_0001	chr13:35597461 35608096	-	Epb4115	Down	-2.143627
rno-Kmt2e_0004	chr4:8223839 8242710	-	Kmt2e	Down	-2.232663
rno-Mctp1_0008	chr2:3809212 3839676	+	Mctp1	Down	-2.469546

circRNAs diferencialmente expresado en ratas macho por efecto del estrés

circAtlas_ID	circRNA_ID	Hebra	Nombre del gen	Regulación	log2(FC)
rno-Slc4a4_0001	chr14:20749844 20769564	-	Slc4a4	Up	2.964866
rno-Gabrg3_0001	chr1:112435003 112436794	-	Gabrg3	Up	2.946366
rno-Hdac4_0007	chr9:99266782 99267021	-	Hdac4	Up	2.030624
rno-Nlgn1_0003	chr2:111771931 111772738	-	Nlgn1	Up	2.030624
rno-Mllt3_0005	chr5:106171073 106202563	-	Mllt3	Up	2.020464
rno-Dgkb_0010	chr6:57720452 57821418	+	Dgkb	Down	-1.861543
rno-Kmt2e_0004	chr4:8223839 8242710	-	Kmt2e	Down	-2.117373
rno-Cnksr2_0002	chrX:39860824 39885483	+	Cnksr2	Down	-2.197855
rno-AABR07058158_0001	chr7:102723272 102724348	+	AABR07058158.1	Down	-2.270900
rno-Epb4115_0001	chr13:35597461 35608096	-	Epb4115	Down	-2.528337

circRNAs diferencialmente expresados en ratas hembra por efecto del estrés

circAtlas_ID	circRNA_ID	Hebra	Nombre del gen	Regulación	log2(FC)
rno-intergenic_000068	chr6:76613548 76626199	-	Ralgapa1	Up	2.686671
rno-AABR07006458_0001	chr1:235393348 235395737	-	Vps13a	Up	2.394190
rno-Dscam1l_0001	chr8:49754716 49757732	+	Dscam1l	Up	2.300591
rno-Sdccag8_0001	chr13:95003381 95013012	+	Sdccag8	Up	2.234832
rno-Ppp3ca_0002	chr2:242041488 242041689	+	Ppp3ca	Up	2.234832
rno-Ankib1_0013	chr4:27509135 27563899	+	Ankib1	Down	-1.806237
rno-Ttc3_0018	chr11:34668090 34722272	+	Ttc3	Down	-2.000934
rno-Mlip_0003	chr8:84443615 84482700	-	Mlip	Down	-2.111077
rno-Dgkb_0010	chr6:57720452 57821418	+	Dgkb	Down	-2.344450
rno-Unc79_0004	chr6:126864142 126883987	+	Unc79	Down	-2.632451

circRNAs diferencialmente expresados en ratas hembra respecto a macho estresadas

circAtlas_ID	circRNA_ID	Hebra	Nombre del gen	Regulación	log2(FC)
rno-Rere_0002	chr5:167516580 167581074	+	Rere	Up	2.167704
rno-Pcf11_0006	chr1:157470070 157490006	-	Pcf11	Up	2.162024
rno-Gabrg1_0004	chr14:39985574 40035210	+	Gabrg1	Up	2.053784
rno-Rgs7_0002	chr13:93158564 93184258	-	Rgs7	Up	1.892820
rno-AABR07058539_0002	chr7:122834691 122835329	+	AABR07058539.1	Up	1.859382
rno-RGD1311595_0002	chr1:247922779 247945662	-	RGD1311595	Down	-1.730144
rno-Mtm1_0001	chr6:18825578 18834272	+	Mtm1	Down	-1.810626
rno-Pik3r1_0002	chr2:31816051 31816763	-	Pik3r1	Down	-1.866224
rno-Ppp3cc_0001	chr15:51936365 51944899	-	Ppp3cc	Down	-1.962546
rno-Unc79_0004	chr6:126864142 126883987	+	Unc79	Down	-2.143982

5.4 Los circRNAs diferencialmente expresados son originados a partir de genes que modulan la plasticidad sináptica en estrés crónico

Con los resultados obtenidos tras la identificación, cuantificación con CIRCexplorer3 y CIRI2, sumado al posterior análisis de expresión diferencial manual, se seleccionó la “unión” de los conjuntos de circRNAs (# total de circRNAs contenidos en el diagrama de Venn) presentados en la **Figura 16**. Este criterio permite aumentar el número de genes a una cantidad óptima para realizar un análisis de enriquecimiento funcional. Los circRNAs obtenidos de las comparaciones entre grupos control (**Figura 16A**) representan circRNAs que tienen alta expresión en machos y en hembras en condiciones basales, mientras que los circRNAs obtenidos en las comparaciones entre grupos estrés (**Figura 16D**) representan los circRNAs de mayor expresión en machos y en hembras por efecto del estrés. Utilizar estos grupos permite obtener las vías en las que participan los genes de origen de los circRNAs que aumentan su expresión en las condiciones control y estrés.

Se tomó la consideración de que el aumento de los circRNAs es producto de que el gen hospedero está siendo transcrito activamente. Así, es posible que parte de estos transcritos contribuya a la formación de los circRNAs para potenciar de alguna forma la acción del gen requerido por la neurona. La información entregada por las herramientas de identificación de circRNAs incluye la anotación del transcrito que da origen al circRNA y con esto el nombre del gen. Esta información se utilizó para realizar un análisis de enriquecimiento funcional asociando términos o vías al conjunto de genes que producen circRNAs. Con esto, se buscó evidenciar si los genes que dan origen a los circRNA están relacionados con la plasticidad sináptica, reflejando por asociación una posible función celular y fisiológica de los circRNAs.

En la **Figura 17** se puede evidenciar que en ratas control los términos significativos asociados a procesos biológicos, según la terminología GO, incluyen fosforilación de proteínas, modificación de peptidil-serina, regulación positiva del desarrollo y guía del axón. Además de términos GO relacionados a componentes celulares como centros organizadores de microtúbulos y remodelamiento de cromatina. En cambio, para los

genes de origen de los circRNAs expresados diferencialmente por efecto del estrés crónico, se distinguen términos relacionados con transmisión sináptica, desfosforilación de proteínas, transporte mediado por vesículas y modulación de sinapsis; y procesos celulares como dendrita y complejo receptor GABA_A, membrana vesicular citoplasmática, que tienen un enfoque más bien local, ya que son procesos que ocurren en la terminal sináptica y que podrían estar siendo modificados por efecto del estrés crónico.

Al realizar el mismo abordaje, pero considerando los genes hospederos de circRNAs que aumentan su expresión por efecto del estrés crónico en machos y hembras **por separado (Figura 18)**, se encontró que en **ratas macho** existe una sobrerrepresentación de funciones biológicas asociadas con la regulación positiva del potencial sináptico excitatorio, ensamblaje de la sinapsis, desarrollo de la proyección neuronal, regulación de la morfogénesis de dendritas y organización de la densidad postsináptica. Estos términos representan la presencia de genes como *Nlgn1*, *Nrxn1*, *Pten*, *Rims1*, *Rims2*, *Magi2*, *Rhoa* y *Nell2*. Por otro lado, la terminología GO para componentes celulares incluye componentes del transporte de vesículas de GABA y el complejo receptor GABA_A, que incluye a genes como *Syt1*, *Gad2*, *Gabrg1* y *Gabrg3*. En **ratas hembra** los términos GO correspondientes a procesos biológicos incluyen la axonogénesis, morfogénesis de la proyección neuronal, guía y desarrollo del axón, las cuales involucran muchos más genes, entre estos están *Epha5*, *Ntng1*, *Fgfr2*, *Ank3*, *Nup155*, *Nrcam* y *Brk2*. Los términos GO respecto a componentes celulares se presentan genes asociados al transporte de vesículas, endosoma tardío y centros organizadores de microtúbulos, términos representados por genes como *Sgsm1*, *Htt*, *Kif1b*, *Rab11a*, *Uvrag*, *Rapgef2*, *Rabgap1* y *Sorb1*.

Análisis de Enriquecimiento genes parentales circRNAs

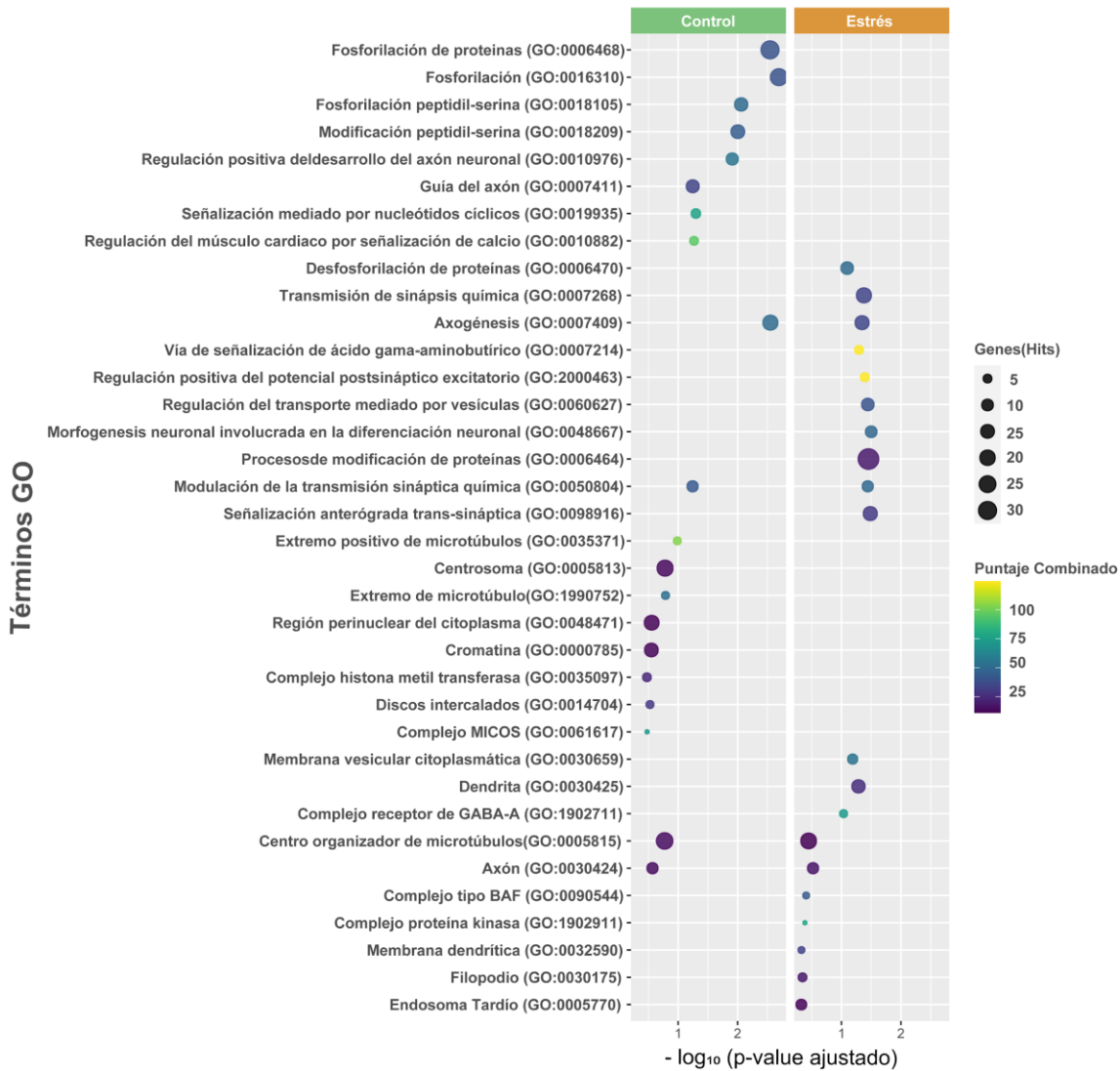


Figura 17. Análisis de enriquecimiento funcional para los genes que dan origen a los circRNAs altamente expresados en condición control y estrés. Los términos fueron filtrados por un $p\text{-value} < 0.05$ para el test exacto de Fisher. Se muestran los *Top10* con puntos coloreados en base al "Puntaje combinado o *Combined Score*" ($cs = \log(p) * z$, $p = p\text{-value}$ del *Fisher exact test*, y un $z = z\text{-score}$ para la desviación del *ranking* esperado). Los *Hits* corresponden al número de genes incluidos en el término, los cuales a su vez pertenecen a la anotación "GO biological process 2018" y "GO cellular component 2018".

Análisis de Enriquecimiento genes parentales circRNAs



Figura 18. Análisis de enriquecimiento funcional para los genes que dan origen a los circRNAs expresados diferencialmente con alta expresión por efecto del estrés en hembras y machos. Los términos fueron filtrados por un $p\text{-value} < 0.05$ para el test exacto de Fischer. Se muestran los *Top10* con puntos coloreados en base al “Puntaje combinado o *Combined Score*” ($cs = \log(p) * z$, $p = p\text{-value}$ del *Fisher exact test*, y un $z = z\text{-score}$ para la desviación del ranking esperado). Los Hits corresponden al número de genes incluidos en el término, los cuales a su vez pertenecen a la anotación “*GO biological process 2018*” y “*GO cellular component 2018*”.

Siguiendo la hipótesis que el estrés crónico afecta la expresión de circRNAs con una posible función en la plasticidad sináptica, los términos asociados a los genes que producen estos circRNAs reafirman esta visión, destacando procesos biológicos que regulan los eventos de sinapsis en machos, mientras que en hembras se destacan procesos de desarrollo neuronal y transporte vesicular.

Un término GO para componente celular interesante, y que refleja lo mencionado anteriormente, es “Dendrita (GO:0030425)”, el cual está presente en el top 10 de los genes que dan origen a circRNAs que se expresan diferencialmente en animales sometidos a estrés crónico (**Figura 17**). Este término está representado en la primera comparación por genes como *Homer1*, *Nlgn1*, *Shank3*, *Als2*, *Map2*, *Magi2*, *Nf1*, *Adcy2*, *Atxn10*, *Gabrg1*, *Gabrg3* y *Strn3*. Los genes *Homer1*, *Nlgn1* y *Shank3* producen proteínas que funcionan como andamiaje, permitiendo reclutar a otros elementos para la formación y sostenimiento de la sinapsis. *Gabrg1* y *Gabrg3* son genes que producen proteínas que van a formar parte de las subunidades del receptor GABA_A, el cual participa en sinapsis de tipo inhibitorias. En la comparación por sexo (**Figura 18**), este término está representado en ratas hembra estresadas por genes como *Epha5*, *Atxn10*, *Ank3*, *Htt*, *Kif1b*, *Als2*, *Nsmf*, *Magi2*, *Strn3*, *Gabra2* y *Nlgn1*.

5.5 Evaluación *in silico* de los probables efectos de un circRNA diferencialmente expresado por efecto del estrés crónico dependiente del sexo

De los genes involucrados en la plasticidad sináptica que aumentan la expresión de circRNAs en HCv por efecto del estrés se encuentra el que codifica para Neurologina-1 (*Nlgn1*). El transcrito de *Nlgn1* (ENSRNOT00000092660.1) produce al menos 15 circRNAs diferentes. Solo uno de estos es predominante por su alta expresión, reconocido por sus coordenadas chr2:111771932-111772738, el cual contiene en su secuencia el exón 2 del gen *Nlgn1*. Este circNlgn1 se identificó en este estudio por ambas herramientas, CIRCexplorer3 y CIRI2. Al evaluar sus cambios de expresión en las distintas condiciones, se verificó que este circRNA en particular aumenta sus niveles de expresión en ratas macho por efecto del estrés y no en hembras (**Figura 19**). Esta diferencia entre machos y hembras resultó ser interesante por lo que se evaluó la posible función de este circRNA como esponja de miRNA y su relación con la expresión de mRNAs.

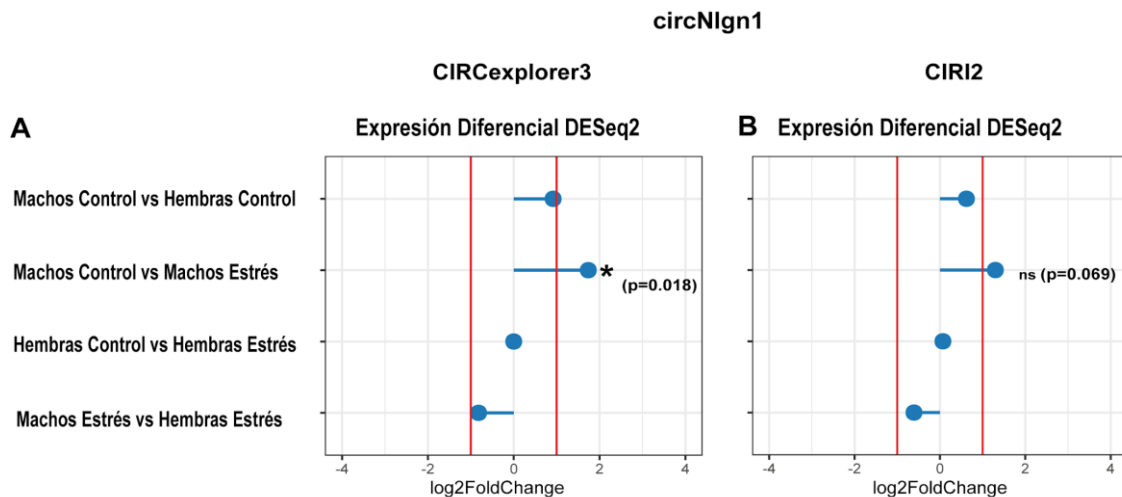


Figura 19. Veces de cambio de circNlgn1. Se grafican las veces de cambio para circNlgn1 con los datos obtenidos con (A) CIRCexplorer3 y con (B) CIRI2 en la expresión diferencial con DESeq2. Los puntos representan el log₂(FC) o veces de cambio para el esquema de cuatro comparaciones realizadas entre los grupos. Las líneas punteadas en rojo indican el umbral $|\log_2(\text{FC})| > 1$.

Se realizó el análisis de expresión diferencial de miRNAs con los RNAs menores a 200 nt en el Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética (Wladimir Corrales). Brevemente, se identificó un total de 49 miRNAs diferencialmente expresados en ratas macho por efecto del estrés, con 21 miRNAs que aumentan su expresión y 28 miRNAs que disminuyen su expresión. Mientras que, en las ratas hembra, 32 miRNAs se expresan diferencialmente, 15 miRNAs aumentan su expresión y 17 miRNAs disminuyen su expresión (**Figura 20**). Utilizando la base de datos miRBase (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011) se obtuvo la secuencia de los miRNAs diferencialmente expresados en animales macho y hembra por efecto del estrés. Por otro lado, se obtuvo la secuencia de circNlgn1 en la base de datos de circAtlas, donde se identificó como circNlgn1_0003. Utilizando el software RNA22 (Miranda y cols., 2006), se realizó la búsqueda de MREs (*miRNA Response Elements*) en la secuencia de circNlgn1, que podrían sugerir una interacción con los miRNAs diferencialmente expresados por efecto del estrés crónico en ratas macho y hembra.

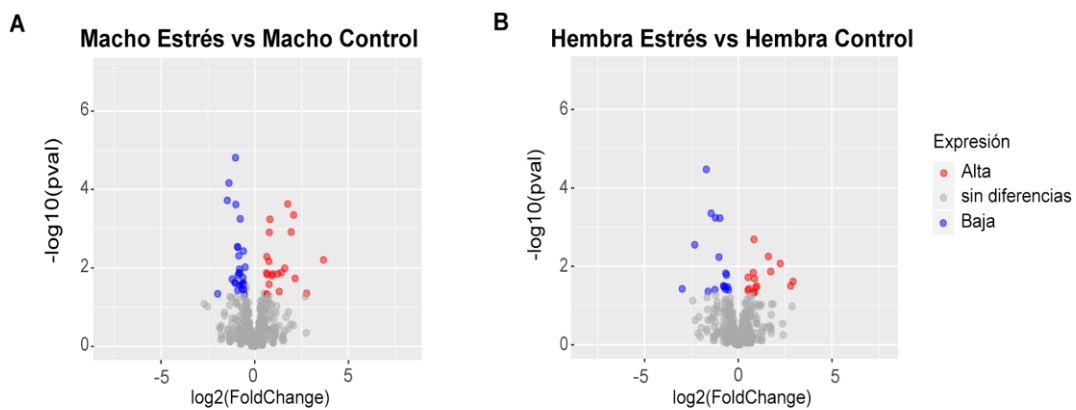


Figura 20. Expresión diferencial de miRNAs por efecto del estrés crónico en ratas macho y hembra. (A) miRNAs diferencialmente expresados por efecto del estrés crónico en ratas macho. (B) miRNAs diferencialmente expresados por efecto del estrés crónico en ratas hembra. Se consideró para cada una de las comparaciones como valor umbral $p < 0.05$ y las veces de cambio $|\log_2(\text{FC})| > 0.5$.

Se identificaron 10 potenciales MRE para miRNAs en la secuencia de circNlgn1 para 5 de los 49 miRNA que se expresan diferencialmente en machos por efecto del estrés crónico: miR-1188-5p, miR-760-3p, miR-222-5p, miR-485-5p y miR-129-5p. La reducción en estos miRNAs en machos estresados es consistente, reflejando una posible interacción con circNlgn1, ya que presentan baja expresión por efecto del estrés crónico en machos respecto a los controles (**Figura 21A**). Por otra parte, el nivel de expresión de circNlgn1 no cambia en ratas hembra estresadas y al evaluar la interacción de circNlgn1 con los miRNAs diferencialmente expresados, se obtuvieron solo 4 MRE para 4 de los 32 miRNAs; es decir, el miR-346, miR-92a-3p, miR-505-5p y miR-431. A diferencia de lo que ocurre en los machos, la expresión de todos estos miRNAs es alta en ratas hembra estresadas (**Figura 21B**). Este fenómeno propio de los machos sugiere que circNlgn1 podría actuar como un competidor endógeno secuestrando y promoviendo la degradación de miRNAs, permitiendo que los mRNAs blanco de estos miRNAs conserven altos niveles de expresión sólo en ratas macho.

Adicionalmente, se identificaron los mRNAs que pueden competir con circNlgn1 por la unión de miRNAs haciendo uso de la base de datos miRDB y posteriormente se filtraron estos mRNAs identificando aquellos que tuvieran niveles de expresión mayor en machos estresados respecto a su control. Con esta información se realizó un análisis de enriquecimiento para verificar el impacto en los procesos celulares. (**Figura 22**).

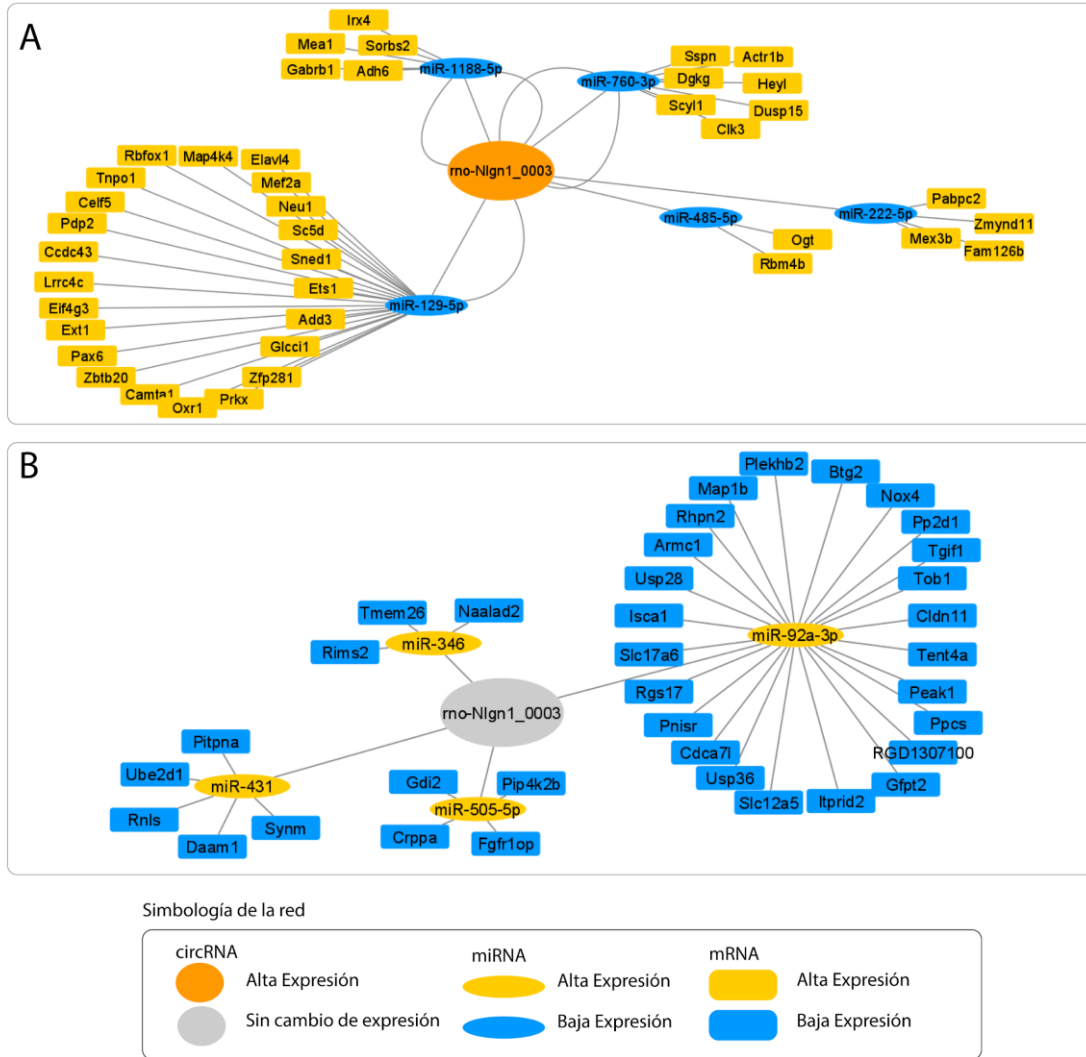


Figura 21. Red de interacción circNlgn1-miRNA-mRNAs en ratas macho y hembra por efecto del estrés crónico. Representación de las posibles interacciones influenciadas por circNlgn1 en (A) ratas macho estresadas y en (B) ratas hembra estresadas. La interacción de circNlgn1_0003 con los miRNAs fue evaluada con RNA22 con un p -value < 0.1. La interacción de miRNAs y mRNAs fue obtenida de la base de datos mirDB. Se representan las interacciones con un valor de “target score > 90”.

La red circRNA-miRNA-mRNA en ratas macho indica una posible regulación de la cascada de la vía asociada a la kinasa JNK, representada por la pérdida de la interacción entre miR-760-3p-DUSP15, miR-222-5p-ZMYND11, y miR-126-5p-MAP4K4. Además, sugiere una regulación positiva de la transcripción desde el promotor de la RNA polimerasa II por miR-129-5p-RBFOX1 y miR-129-5p-CELF5 y la regulación de la metilación de histonas por miR-485-5p-OGT.



Figura 22. Enriquecimiento de las posibles vías afectadas por la red circNlgn1-miRNA-mRNAs en ratas macho estresadas. Se utilizaron transcritos con un valor de predicción de interacción de mirDB mayor a 60. Se muestran aquellos 10 primeros términos con menor *p-value* de un test exacto de Fischer. La intensidad de color de los puntos está en base al “Puntaje combinado o *Combined Score*” ($cs = \log(p) * z$, $p = p\text{-value}$ del *Fisher exact test*, y un $z = z\text{-score}$ para la desviación del *ranking* esperado). Los *Hits* representados por el tamaño del círculo, corresponden al número de genes incluidos en el término, los cuales a su vez pertenecen a la anotación “*GO biological process 2018*”.

6. DISCUSIÓN

El cerebro está encargado de integrar los diversos estímulos sensoriales, tanto internos como externos, para iniciar respuestas fisiológicas y conductuales que permiten al organismo adaptarse al entorno en una relación continua y dinámica a lo largo de la vida. El HC es una de las regiones cerebrales imprescindibles del sistema límbico para dar lugar a procesos cognitivos básicos como la memoria, la cual permite procesar y adquirir las experiencias sensoriales de eventos amenazantes o potencialmente adversos conocidos como estresores, facilitando la adaptación y la sobrevida. La percepción de eventos estresores activa de forma simultánea diversos circuitos neuronales claves en el cerebro, que coordinan y preparan al organismo para sobreponerse a la situación de estrés, como la activación del eje HHA con la consecuente liberación de GCs. La acción inmediata de estos mediadores del estrés resulta beneficiosa para hacer frente a los desafíos. Sin embargo, la exposición recurrente y sostenida en el tiempo a eventos estresores, es decir, el estrés crónico, puede inducir efectos nocivos en diversos órganos y áreas cerebrales altamente plásticas como el HC, impidiendo el proceso de adaptación y desencadenando patologías neuropsiquiátricas como la depresión.

6.1 Efectos diferenciales del estrés sobre el eje dorso-ventral del hipocampo

Los estudios respecto a la alteración de la función del HC en el contexto del estrés crónico y el trastorno depresivo, se centran en los cambios bioquímicos y morfológicos que ocurren en esta estructura por influencia de la activación de receptores de GCs, sistemas de neurotransmisores y acción de neurotrofinas sobre la neuroplasticidad, proceso dinámico que incluye neurogénesis, reducción del número de neuronas, ensamblaje, mantención y desensamblaje de sinapsis que forman los distintos circuitos neuronales. Estos cambios ocurren por activación de diferentes mecanismos moleculares que afectan la expresión de genes, el procesamiento de transcritos y la modificación de la función de proteínas esenciales para la función neuronal, cuyos efectos se reflejan en cambios conductuales en modelos animales de estrés crónico, reconocidos como síntomas tipo depresivos o de ansiedad.

Actualmente, se reconocen dos subregiones del HC que son funcionalmente distintas a lo largo de su eje dorso-ventral: el HCd, encargado del procesamiento de la memoria espacial; y el HCv, que procesa las experiencias de tipo emocionales, mayormente relacionado al estrés. Esto se ha demostrado por experimentos de lesión y se ha evidenciado que la expresión de genes en HCd se correlaciona con la expresión en regiones corticales involucradas en el procesamiento de la información; mientras que los genes expresados en HCv se correlacionan con regiones involucradas con el procesamiento emocional y el estrés, tales como la amígdala y el hipotálamo (Gulyaeva 2015; Fanselow 2010). El estrés crónico afecta la morfología neuronal en ambos polos del HC. Pinto y cols., 2015 demostraron que en HCd disminuye la longitud de las dendritas apicales de CA3 y CA1, sumado a una reducción del volumen del HCd, mientras que en HCv aumenta el largo de las dendritas apicales de CA3 y el volumen de este polo hipocampal. Además, relacionaron estos cambios señalando un deterioro cognitivo y un aumento de las conductas de tipo ansiosas de las ratas sometidas a estrés crónico (Pinto y cols., 2015).

6.2 La expresión de mRNAs cambia en HCd e HCv desde el desarrollo postnatal

Estudios ómicos recientes abordan las diferencias entre estas subregiones del HC de ratas macho por secuenciación de RNAs (RNA-seq), destacando que, a lo largo del desarrollo postnatal (cerca al destete) y etapa juvenil (14,28 y 45 días), en ambos polos hay una expresión mayor de transcritos relacionados a la potenciación a largo plazo en HCd comparado al HCv, mientras que en el HCv se expresan mayormente transcritos que participan en la transmisión colinérgica y la sinapsis GABAérgica (Lee y cols., 2017). Adicionalmente, Floriou-Servou y cols., 2018 destaca que en comparación al HCd, el HCv es particularmente sensible a los cambios inducidos por el estrés agudo, afectando la expresión de una mayor cantidad de transcritos. Así mismo, en HCd se expresan transcritos asociados a la sinapsis glutamatérgica; y en HCv a vías metabólicas, señalando que la expresión la demetilasa *Kdm6b* sólo en HCv es responsable de sostener una conducta de resiliencia a estímulos novedosos (Floriou-Servou y cols., 2018). Sin embargo, a la fecha no se ha realizado un estudio que permita identificar los efectos producidos por

el estrés crónico sobre el transcriptoma de ambas regiones del HC. Es por esto que, teniendo en cuenta la distinción funcional de ambos polos del HC y su rol en la conducta, sumado a la sensibilidad del HCv a los efectos del estrés, ésta es una región cerebral particularmente relevante para el estudio de los eventos moleculares a nivel transcripcional que contribuyen al desarrollo de patologías neuropsiquiátricas como la depresión, permitiendo el estudio de nuevos mecanismos que explican la patología desde el punto de vista molecular, identificación de nuevos blancos farmacológicos y posibles biomarcadores, incluso previo al desarrollo de la patología.

6.3 Expresión de RNAs circulares en el cerebro y su posible función

En la última década, los estudios transcriptómicos han permitido abordar los cambios moleculares que ocurren en torno a la expresión de genes y sus funciones a nivel celular de manera integrativa en los diversos tejidos, revelando nuevos niveles de regulación de la expresión de transcritos y proteínas, cuyos niveles de expresión pueden ser característicos de condiciones patológicas. Los circRNAs fueron el foco de esta Tesis. Recientemente han surgido numerosas investigaciones que buscan caracterizar la expresión y la función de los circRNAs en diversos tejidos. Entre las funciones descritas para los circRNAs, se incluye el secuestro de RNAs pequeños no codificantes conocidos como miRNAs, cuya función es actuar como reguladores postranscripcionales de la traducción de mRNAs. De esta forma, un circRNA puede impactar la regulación de la síntesis de muchas proteínas. Interesantemente, la expresión de estos RNAs en el cerebro es alta en comparación a otros tejidos (You y cols., 2015), lo que, sumado a los cambios en su expresión a lo largo del neurodesarrollo, los posicionan como importantes reguladores y posibles biomarcadores de los procesos neuroplásticos en el cerebro. Más aún, existe un patrón de expresión particular de circRNAs en distintas áreas cerebrales y, sumado al hecho de que derivan de transcritos que originan proteínas importantes para la función cerebral, sugiere un rol específico en las regiones donde se expresan (van Rossum y cols., 2016). En esta Tesis se describe por primera vez el efecto del estrés crónico sobre la

expresión de circRNAs en HCv de ratas y, además, como el sexo modula la respuesta en la expresión de circRNAs frente a un evento estresor crónico.

6.4 Características de los circRNAs expresados en HCv de ratas.

En el cerebro de humanos se han identificado 32.350 circRNAs, mientras que en el cerebro de ratones 25.120. La comparación entre ellos determinó que los circRNAs evolucionan rápido ya que, por ejemplo, se ha identificado que solo un 4.4% de los circRNAs encontrados en humanos se expresan también en ratones, lo que es un porcentaje relativamente bajo respecto al 67% de conservación en genes codificantes de proteínas (Ji y cols., 2019). A su vez, se ha evidenciado una expresión diferencial de circRNAs dependiendo del área cerebral (bulbo olfatorio, corteza prefrontal, HC y cerebelo), destacando que el cerebelo es el que tiene mayor expresión de circRNAs, seguido por la corteza prefrontal y el HC, lo cual es atribuido a la mayor densidad de células neuronales comparado con las otras regiones (Rybak-Wolf y cols., 2015; Van Rossum y cols., 2016).

En esta Tesis, mediante la técnica de RNA-seq y los algoritmos de identificación de circRNA CIRCexplorer3 y CIRI2, se logró la identificación de 10.829 circRNAs candidatos. La proporción de lecturas correspondientes a la BSJ de los cerca de 800 circRNAs identificados por muestra, corresponde en promedio a un 0,026% de las lecturas totales obtenidas del transcriptoma de HCv de ratas. Esto da cuenta a grandes rasgos de una diversidad y una menor abundancia de circRNAs en HCv respecto a los transcriptomas de cerebro completo que se han estudiado en otras investigaciones, donde se ha descrito que la proporción de lecturas para circRNAs respecto a las lecturas totales en cerebro de ratones corresponde al 0,08% (You y cols., 2015).

En esta Tesis, los circRNAs identificados con CIRCexplorer3 permitieron realizar una caracterización en cuanto al número de exones que retienen del transcrito de origen; revelando que el 68.7% de los circRNAs contiene entre 1 y 5 exones, con una longitud promedio de 840 nt, algunos incluso incluyen hasta 20 exones. Esta característica también

ha sido reportada en circRNAs de ratas identificadas en al menos 11 tejidos (Zhou y cols., 2018). Con respecto a la distancia en nucleótidos que existe entre el sitio dador y aceptor del evento de *back-splicing*, se pudo constatar que en 46% de los circRNAs esta distancia es menor a 10 kb, y que solo en el 10% es menor a los 500 nt. La distancia entre las secuencias inversas complementarias contenidas en intrones adyacentes a estos puntos de circularización, como las secuencias Alu, constituye un factor adicional importante en la formación de circRNAs puesto que va a permitir acercar los extremos dador y aceptor de la secuencia del pre-mRNA, facilitando el evento de *back-splicing*. Se reconoce por ejemplo que una longitud de 1.434 nt para secuencias Alu convergentes más cercanas es necesaria para la circularización de secuencias pertenecientes al pre-mRNA y formar circRNAs (Zhang y cols., 2016). Se propone, además, que a mayor distancia existe mayor probabilidad de encontrar más secuencias para la circularización, permitiendo un mayor número de alternativas para la circularización y por lo tanto una mayor diversidad de circRNAs. Además, en la circularización participan otros elementos en *cis* y/o en *trans*, que junto a la maquinaria de *splicing*, ya sea durante la transcripción o post-transcripcionalmente, promueven la formación de una variante de circRNA u otra (Zhang y cols., 2014).

La distribución de los circRNAs respecto al cromosoma de origen parece ser conservada en distintos tejidos y presentan una proporción en promedio del 10% de circRNAs provenientes del cromosoma 1 en ratas (Mahmoudi & Cairns, 2019). De hecho, en esta Tesis también se evidenció que un 10% de los circRNAs provienen del cromosoma 1 y solo 4 circRNAs son originados en el cromosoma Y (0,07%). Esto podría estar relacionado con el número de genes codificantes presentes en cada cromosoma y el tamaño, como reporta la base de datos Uniprot (Genome & Project, 2004), que indica que el cromosoma 1 es el que tiene un mayor número de genes codificantes (3.560), siendo el más grande y el cromosoma Y es el que tiene menor cantidad de genes codificantes (12), siendo el más pequeño. No obstante, no se ha realizado una correlación entre genes codificantes y número de circRNAs asociados a estos cromosomas. (Genome & Project, 2004). En general, esto nos da cuenta que las mayores diferencias en las expresión de circRNAs es atribuida a los cromosomas autosómicos, por lo que los sesgos observados

dependiendo del sexo podrían ser explicados por condiciones fisiológicas sexo-específicas, como las hormonas sexuales y diferencias en los patrones de expresión de genes.

6.5 Asociación entre el origen y función de los circRNAs en HCv

En esta Tesis se realizó un análisis de expresión diferencial, de forma paralela, con los circRNAs obtenidos con CIRCexplorer3 y CIRI2. La implementación de más de una herramienta permite sin duda complementar la predicción de circRNAs en las muestras de tejido y robustecer el análisis. Ambos algoritmos pertenecen a la categoría de *split-alignment-based-approach*, los cuales consideran las lecturas que abarcan las uniones BSJ y las separan en segmentos, los que luego son alineados a la secuencia de referencia (en este caso el genoma de la rata) en un orden reverso. CIRCexplorer3 requiere de un archivo de anotación para remover falsos positivos durante la etapa de filtrado y, por otro lado, CIRI2 es un algoritmo que realiza una detección *de novo*, totalmente independiente del archivo de anotación. Sin embargo, se utilizó este archivo de anotación para aumentar la sensibilidad y mejorar el *false discovery rate* (FDR), al permitir acotar la búsqueda y trabajar con un menor número de candidatos y más confiables (Gao & Zhao, 2018). El nivel de coincidencia fue de un 32% respecto a la totalidad de especies de circRNAs que fueron identificadas. Este bajo nivel de coincidencia puede atribuirse a los distintos abordajes utilizados por ambas herramientas para la identificación de circRNAs (Hansen y cols., 2015).

En cuanto a la identidad de los circRNAs encontrados en el transcriptoma de HCv de rata, podemos tener una noción de su posible función conociendo el gen de origen. La comparación realizada con DESeq2 **entre controles macho y hembra**, permitió identificar un total de 130 circRNAs que están expresados diferencialmente en HCv, de los cuales 14 circRNAs fueron identificados en común por las herramientas CIRCexplorer3 y CIRI2. De éstos, tres circRNA presentan la más alta expresión en HCv de hembras: circGabrg3_0001, circSpecc1l_0002 y circMkln1_0012. Mientras que en machos hay una alta expresión de circKmt2e_0004, circUbac2_0001, circPtpra_0004.

Una asociación entre los circRNAs y la función asociada al gen de origen es como se ha elucidado la función de varios circRNAs. Bajo esta premisa se constató que en hembras circGabrg3_0001 deriva del gen *Gabrg3*, que codifica la subunidad γ_3 del receptor de GABA_A, la cual le confiere al receptor la sensibilidad a benzodiazepinas, fármacos moduladores positivos del receptor GABA utilizados para tratar la ansiedad generalizada (Greger y cols., 1995; Knoflach y cols., 1991). El producto génico de *Specc11*, del cual deriva circSpecc11_0002, participa en la organización del citoesqueleto de actina y la estabilización de microtúbulos requerido para la adhesión celular y migración (Saadi y cols., 2011). El circMkln1_0012 deriva del gen *Mkln1* que codifica una proteína requerida para la internalización, vía endosoma, de la subunidad α_1 del receptor GABA_A, para su posterior degradación (Heisler y cols., 2012). Por otro lado, en machos se evidenció un aumento en la expresión de circKmt2e_0004, derivado del gen *Kmt2e*, que produce la lisina N-metil transferasa 2, enzima que participa en la metilación de la histona H3K4m3 (Wood y cols., 2019). Adicionalmente, el circUbac2_0001 deriva del gen *Ubac2*, cuyo producto proteico pertenece al complejo de degradación asociado a retículo endoplásmico, un importante sistema de control de calidad para la mantención de la homeostasis de proteínas (Zhu y cols., 2017). El circPtpra_0004 deriva del gen *Ptpra*, que codifica para un miembro de la familia de proteínas tirosina fosfatasas que es esencial para la migración neuronal hipocampal y la LTP (Petroni y cols., 2003). Así mismo, el análisis de expresión diferencial manual de los grupos de ratas macho y hembra control evidenció que los genes que producen los 650 circRNAs diferencialmente expresados, que son originados a partir de genes que participan principalmente en procesos biológicos como fosforilación de proteínas, guía del axón, sinapsis química, reorganización de microtúbulos y cromatina. Estos términos están de acuerdo con la función de los tres genes señalados anteriormente: circGabrg3_0001, circSpecc11_0002, circMkln1_0012, circKmt2e_0004, circUbac2_0001 y circPtpra_0004.

En **ratas macho el efecto del estrés** produce la expresión diferencial de 110 circRNAs, con 14 circRNAs que fueron identificados por ambos análisis (CIRCexplorer3 y CIRI2), donde destaca el aumento en la expresión en tres circRNAs. El circMllt3_0005 deriva del transcrito de *Mllt3*, que codifica una histona metiltransferasa (Qiao y cols 2015). Mientras

que, el circHdac4_0007 proviene del transcrito de *Hdac4*, que codifica la histona deacetilasa 4, la cual actúa como un regulador negativo de la expresión de las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 4$ del receptor GABA_A (Press y cols., 2019). Por otra parte, es interesante destacar que circGabrg3_0001, que se expresa más en ratas hembra control respecto a ratas macho control, corresponde al circRNA de mayor expresión en ratas macho por efecto del estrés. En esta comparación también se destaca que los circRNAs que disminuyen su expresión por efecto del estrés crónico son circKmt2e_0004 y circPtpra_0004, cuya expresión es mucho mayor en ratas macho control respecto a las hembras, estos ahora disminuyen significativamente su expresión por efecto del estrés crónico. También disminuye el circEPB41L5_0001, cuya función ha sido recientemente descrita como supresor de tumores en glioblastoma, donde su gen de origen, *Epb41l5*, produce una proteína involucrada en la diferenciación neuronal y formación de adhesiones focales. Se ha descrito que existe un eje circEPB41L5/miR-19a/EPB41L5/Akt, donde el circEPB41L5 actúa como un RNA esponja para el miR-19, el cual reprime a EPB41L5. A su vez, la proteína EPB41L actúa como un regulador negativo de la actividad de la proteína RhoC. Esta GTPasa en estado inactivo impide la activación de Akt y, consecuentemente, la proliferación, invasión y migración del tumor (Lv y cols., 2020). Adicionalmente, el análisis de expresión diferencial manual determinó que el **efecto del estrés crónico en ratas macho** produce la expresión diferencial de 614 circRNAs, cuyos genes de origen según el análisis de enriquecimiento funcional están representados en la terminología GO por los procesos biológicos: regulación positiva del potencial sináptico excitatorio, ensamblaje de la sinapsis, desarrollo de la proyección neuronal, regulación de la morfogénesis de dendritas y organización de la densidad postsináptica.

Al determinar los **efectos del estrés crónico** sobre la expresión de circRNAs en el HCv de **ratas hembra**, se identificaron 125 circRNAs con 11 de ellos comunes entre ambos algoritmos de identificación. Los 3 circRNAs mayormente expresados corresponden a circSdccag8_0001, circVps13a_0001 y circNtrk3_0001. El circSdccag8_0001 deriva del gen *Sdccag8*, el cual codifica una proteína con un rol en la migración neuronal durante el desarrollo (Insolera y cols., 2014). El circVps13a_0001 proviene del gen *Vps13a*, el cual codifica una proteína que regula etapas del ciclo de proteínas en la red *cis*-golgi de

endosomas tempranos y tardíos, lisosomas y membrana plasmática (Mun y cols., 2019). El circNtrk3_0001 deriva del gen *Ntrk3*, conocido por codificar TrkC, un receptor tirosina quinasa que activa la vía de las MAPK al unir su ligando NT-3. Un *knockout* de este gen en HCv de ratones produce hiperexcitabilidad de esta región del HC frente al aprendizaje del miedo y el procesamiento de memorias, que es recuperado con la intervención farmacológica con un inhibidor de la recaptación de GABA (Amico y cols., 2013). Por otro lado, disminuye el circUnc79_0004, un circRNA que fue identificado en el estudio de You y cols., 2015, como un circRNA que aumenta su expresión durante el neurodesarrollo junto al mRNA de *Unc79*, su gen de origen que codifica para la proteína UNC79, la cual participa del complejo canal de fuga de Na⁺, UNC79-UNC80-NALCN actúa como proteína auxiliar controlando la excitabilidad de neuronas en el hipocampo. UNC79 contribuye a la sensibilidad ante descensos de Ca⁺² extracelular señalizados por un receptor acoplado a proteína G, aumentando la excitación neuronal (Lu y cols., 2010). La disminución de este circRNA en particular podría indicar una disminución en la expresión del transcrito y con esto resultar en un descenso en la excitabilidad neuronal por efecto del estrés crónico en HCv en hembras. También disminuye la expresión del circSv2b_0005, cuyo gen de origen codifica una glicoproteína asociada a vesículas sinápticas en neuronas glutamatérgicas, SV2B, que disminuye su expresión en hipocampo de pacientes con Alzheimer y pacientes con esclerosis hipocampal. Algunos autores la asocian con zonas en que hay pérdida de la sinapsis (Bartholome y cols., 2017; Crèvecoeur y cols., 2014). Otro circRNA, el circDgkb_0001, recientemente ha sido descrito como una molécula que aumenta su expresión, participando en el eje circDgkb/miR-873/GLI1, promoviendo la proliferación, migración e invasión en una línea celular de neuroblastoma (Yang y cols., 2020). Sin embargo, este circRNA disminuye su expresión en HCv de las hembras, indicando que el estrés crónico puede potenciar mecanismos que desfavorecen los procesos antes señalados. Respecto al resto de los genes que producen los 668 circRNAs expresados diferencialmente por **efecto del estrés en ratas hembra** obtenidos del análisis de expresión diferencial manual, estos tienen funciones representadas por la terminología GO para proceso biológico como la Axonogénesis, Morfogénesis de la proyección neuronal, y Guía y desarrollo del axón. Estos términos también están de acuerdo con la función de los tres genes que producen los circRNAs de mayor expresión, según el análisis con

DESeq2. Esto da cuenta de cómo estos procesos podrían ser potenciados o perjudicados por efecto del circRNA producido por estos genes. Sin embargo, cuál de estos dos efectos es el que ocurre sobre esta vía, depende del mecanismo bioquímico que aún no ha sido descrito para los circRNAs identificados en esta Tesis.

Al comparar los grupos de **ratas macho y hembra estresados** se obtienen 120 circRNAs expresados diferencialmente, de los cuales solo 5 fueron comunes para ambos algoritmos. Los 4 circRNAs de mayor expresión en ratas hembra estresadas respecto a los machos son circGabrg1_0004, circGlis3_0002, circArih1_0016 y circEP300_0002. Como se describió, *Gabrg1* codifica la subunidad γ_1 del receptor GABA_A. Por otro lado, *Glis3* es un factor de transcripción en neuronas del hipocampo, cuyas mutaciones derivan en una pérdida de la densidad de espinas dendríticas y atrofia de las dendritas (Calderari y cols., 2018). *Arih1* codifica una ubiquitin ligasa E3 que participa en la regulación de la mitofagia (Palikaras y cols., 2018). El circEP300_0002 deriva del gen *EP300*, que codifica una histona acetilasa asociada a diversas enfermedades neurológicas (Valor y cols., 2013). A partir del análisis de expresión diferencial manual se obtuvieron 686 circRNAs diferencialmente expresados, según el análisis de enriquecimiento funcional y la terminología GO para procesos biológicos se identifican los términos transmisión sináptica, desfosforilación de proteínas, transporte mediado por vesículas y modulación de sinapsis.

En resumen, hasta este punto se logró cumplir con la identificación de circRNAs expresados diferencialmente en HCv de ratas dependiendo del sexo, y los cambios de la expresión de éstos por efecto del estrés crónico. Los circRNAs circGabrg1_0004 y circGabrg3_0001 resultan ser dos candidatos muy interesantes a evaluar por medio de experimentos bioquímicos, dado que son los circRNAs con mayores veces de cambio y que su expresión es reafirmada por la predicción de los dos algoritmos. circGabrg3_0001 tiene mayor expresión en ratas hembra control que en ratas macho control, pero este aumenta su expresión en ratas macho estresadas, teniendo una expresión mayor incluso que las hembras estresadas. Sin embargo, en las hembras estresadas se expresan mayormente circGabrg1_0004 y circNtrk3_0001, los cuales podrían ser propuestos como biomarcadores de estrés en HCv de hembras. Queda pendiente dilucidar el posible rol de

estos circRNAs provenientes de los genes que codifican para las subunidades del receptor de GABA_A y, así mismo, determinar la sensibilidad al estrés de los mRNA dependiendo del sexo. Brevemente, los receptores GABA_A corresponden a una superfamilia de canales iónicos de Cl⁻ dependientes del ligando GABA, principal neurotransmisor inhibitor del SNC. Comúnmente son conformados por combinaciones de 5 subunidades de un total de 19 subunidades identificadas por homología de secuencia. La combinación más abundante corresponde a dos subunidades α , dos β y una γ . Las subunidades α y γ permiten la unión de fármacos ansiolíticos, como las benzodiazepinas, específicamente la subunidad $\alpha 1$ posee una mayor afinidad, mientras que la subunidad $\gamma 3$ es esencial para la regulación alostérica. Cambios en la función del receptor GABA reflejan una regulación diferencial de genes para las subunidades. La regulación génica se controla predominantemente a nivel de inicio de la transcripción y la interacción combinatoria de factores de transcripción, donde los GCs son capaces de intervenir (Eskay, 1985). Algunos de los genes que codifican para las subunidades de estos receptores están regulados en clústers ubicados en diferentes cromosomas. En humanos se ha reportado el clúster $\beta 1$ - $\alpha 4$ - $\alpha 2$ - $\gamma 1$, ubicado en el locus 4p14-q12; el clúster $\beta 2$ - $\alpha 6$ - $\alpha 1$ - $\gamma 2$ en el locus 5q31.2-q25; y el clúster $\beta 3$ - $\alpha 5$ - $\gamma 3$, ubicado en el locus 15q11-q13 (Steiger, 2004; Greger, 1995). La relación física de las subunidades de GABA_A en el genoma puede ser requerida para coordinar la expresión de estos genes. Las hormonas esteroideas (progesterona, estrógeno y corticoides) podrían alterar los niveles de mRNA de las distintas subunidades de forma diferencial entre machos y hembras, a través de la activación de sus respectivos receptores cuyo mecanismo de acción es unirse a elementos de respuesta identificados en los promotores de los genes que codifican para las subunidades del receptor GABA_A. En particular, se han identificado elementos de respuesta para el receptor de andrógenos que afectan la expresión de las subunidades $\alpha 4$ y $\gamma 1$. Por otro lado, se han identificado secuencias consenso para el receptor de estrógeno que afecta las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 4$. (Steiger, 2004). En esta compleja regulación de las subunidades de GABA se podrían encontrar mecanismos que necesiten la formación de los circRNAs circGabrg1_0004 y circGabrg3_0001, para favorecer el ensamblaje de receptores GABA_A preferentemente con ciertas subunidades. De esta forma, los circRNAs estarían involucrados en procesos que implican cambios tanto en la neurotransmisión de tipo

excitatoria, como en la neurotransmisión inhibitoria. Notablemente, y de acuerdo a lo encontrado en esta Tesis, derivan a partir de genes que participan en la dinámica vesicular, ensamblaje de la sinapsis y modificaciones a la cromatina.

La expresión de circRNAs inducida por estrés crónico puede tener un efecto sobre la neuroplasticidad según la función del gen de origen. Un ejemplo claro de esto es el mecanismo propuesto para circHomer1_a, el cual proviene del gen que codifica para HOMER1, proteína con un rol importante en la organización de la densidad postsináptica, ya que actúa como andamiaje para receptores de glutamato mGluR. Es conocido que la actividad neuronal causa un aumento en la expresión de una variante del gen *Homer1* de expresión temprana inmediata, *Homer1a*, mientras que la expresión de *Homer1b/c* no cambia. La proteína truncada codificada por *Homer1a* interfiere con la interacción nativa entre mGluR y la proteína de andamio funcional codificada por *Homer1b/c*. El mecanismo propuesto para la función de circHomer1_a tiene relación con el uso del sitio dador del exón 5 del transcrito de *Homer1b/c* para formar la unión cabeza cola, o BSJ, para la biogénesis de circHomer1_a. De esta forma, el aumento en la expresión de circHomer1_a puede prevenir la sobreexpresión potencial de *Homer1b/c*, lo cual sería perjudicial para la mantención de la sinapsis ante una actividad sostenida. Es entonces concebible en este caso que el aumento en la expresión de *Homer1a* por una señal de poliadenilación río arriba del transcrito y la biogénesis de circHomer1_a trabajan juntos para alcanzar el mismo efecto; es decir, reducir la interacción del mGluR en la membrana y la proteína de andamiaje HOMER1 (You y cols., 2015; Bottai y cols., 2002).

6.6 circNlgn1 y sus potenciales efectos como esponja de miRNAs en HCv de ratas macho y hembra sometidas a estrés crónico.

Considerando que una de las funciones más destacadas atribuidas a los circRNAs es la interacción con miRNAs, los cuales a su vez regulan la expresión de los mRNAs, se decidió evaluar los niveles de circNlgn1. Este circRNA proviene del gen codificante para *Neuroligina 1*, la cual es una proteína de superficie celular implicada en las interacciones célula-célula a través de sus interacciones con los miembros de la familia de las

neurexinas, y desempeña un papel en la función sináptica, mediante el reclutamiento y agrupación de otras proteínas sinápticas. Puede promover la formación inicial de sinapsis, pero no es esencial para esto. *In vitro*, desencadena la formación *de novo* de estructuras presinápticas y podría estar involucrado en la especificación de las sinapsis excitatorias (Katzman & Alberini, 2018). circNlgn1 ha sido previamente descrito como un circRNA particularmente abundante en purificados de sinaptoneurosomas, junto a circHomer1_a, además de aumentar su expresión por cambios en la actividad sináptica de tipo excitatoria (You y cols., 2015).

En esta Tesis se determinó que circNlgn1 aumenta su expresión significativamente por efecto del estrés crónico sólo en ratas macho estresadas, dando indicios que el estrés crónico induce un aumento en la actividad sináptica en neuronas del HCv. Adicionalmente, se observaron 49 miRNAs diferencialmente expresados por el estrés en HCv de ratas macho. El análisis de la secuencia de circNlgn1 identificó 10 probables MRE para los miRNAs miR-1188-5p, miR-760-3p, miR-129-5p, miR-485-5p y miR-222-5p en ratas macho. Por lo tanto, si se considera el eje circRNA/miRNA/mRNA, es probable que la interacción con circNlgn1 contribuya a la disminución en los niveles de estos miRNAs, lo que se refleja en los resultados de la secuenciación de RNAs pequeños. Esto permitiría a su vez, que los mRNAs blancos de los miRNAs puedan ser traducidos en mayor medida, lo cual deberá ser determinado en futuros experimentos. Por otro lado, a pesar de que circNlgn1 no sea expresado diferencialmente por efecto del estrés en ratas hembra, no implica que circNlgn1 no puede ejercer efecto sobre los miRNAs diferencialmente expresados en hembra. Se puede considerar que el circNlgn1 actúe como una molécula capaz de secuestrar los miRNAs de alta expresión en hembra: miR-346, miR-431, miR-505-5p y miR-92a-3p, ya que esto depende de la competencia endógena que exista con otros miRNAs (que no están diferencialmente expresados) y de la localización subcelular del circRNA en las neuronas. Debido a esto queda pendiente evaluar la localización de este circRNA en neuronas del HCv de ratas utilizando sondas de nucleótidos marcados (Hibridación *in situ*), de tal forma de determinar el enriquecimiento, ya sea en núcleo, soma y/o dendritas, lo que permitiría postular alguna función. A su vez, la validación de la interacción con los miRNAs descritos mediante sobreexpresión del circRNA,

entrecruzamiento y posterior identificación mediante secuenciación y qRT-PCR, nos dará luces de la interacción entre estos RNAs en el HCv.

Es importante señalar que los miRNAs expresados diferencialmente por efecto del estrés y dependiendo del sexo incluidos en esta Tesis, en parte puede ser explicada por la interacción con circRNAs. Sin embargo, uno de los mecanismos principales que regula sus niveles es una alteración en la síntesis, específicamente al inicio de la transcripción. Los cambios en este punto de regulación pueden ser atribuidos a la presencia de factores de transcripción activados por hormonas y la presencia de motivos de unión río arriba de los clústers de miRNAs o miRNAs individuales. Por ejemplo, el clúster mir-17-92 en humanos es un gen policistrónico ubicado en el locus 13q31-q32, que codifica para 6 miRNAs (hsa-miR-17, hsa-miR-18a, hsa-miR-19a, hsa-miR-20a, hsa-miR19b-1 y hsa-miR-92-1). Es regulado por el receptor de estrógeno α y posteriormente regulado por el procesamiento realizado por DROSHA para obtener los miRNAs maduros, donde solo el hsa-miR-18a aumenta sus niveles por activación del receptor (Castellano y cols., 2009). Cada miRNA puede regular la expresión de cientos de genes y estos miRNAs son regulados por el estrés y el sexo, como se ha descrito en núcleo accumbens, un área relacionada a los circuitos de recompensa (Pfau y cols., 2016). Los blancos predichos de los miRNAs diferencialmente expresados en ratas macho, que son modulados por circNlgn1, corresponden a mRNAs que son capaces de afectar la neuroplasticidad. De hecho, uno de los términos más significativos obtenidos con el análisis de enriquecimiento corresponde a la mantención de la sinapsis química y regulación de la cascada JNK. El tratamiento crónico con corticosterona aumenta la actividad de JNK en el hipocampo, recreando los niveles elevados de cortisol en la depresión producidos por la alteración de la retroalimentación negativa del eje HHA, lo que contribuye a una pérdida de la sinapsis. Los modelos animales de estrés agudo y estrés crónico muestran que la actividad de JNK está hiperactivada en HC y en la corteza prefrontal. Además, en el modelo de estrés por derrota social, la actividad de JNK aumenta en animales que son susceptibles al estrés y es reducida en los animales resilientes, sugiriendo que un aumento en la actividad de JNK predispone a la depresión, mientras que su inhibición es protectora (Hollo y cols., 2018). De esta forma, este análisis propone a circNlgn1 como una molécula que contribuye a la depresión,

permitiendo la expresión de transcritos que van a formar parte de la cascada de señalización de JNK.

Este estudio ha sido el primero en caracterizar los circRNAs expresados en HCv, evidenciando las diferencias inherentes al sexo y los efectos del estrés crónico sobre esta región cerebral. En resumen,

- Se identificaron 10.829 circRNAs distintos en HCv de ratas, CIRI2 identificó una mayor diversidad de circRNAs y una mayor cantidad de circRNAs diferencialmente expresados, respecto a los resultados obtenidos con CIRCexplorer3.
- Del total de los circRNAs identificados un 1,2% tienen niveles de expresión dependientes del sexo, los cuales se originan en cromosomas autosómicos.
- El estrés crónico modifica la expresión del 1% de los circRNAs identificados en HCv de ratas macho, mientras que en hembras afecta la expresión del 1,6%.
- Una asociación entre la función del gen de origen con la posible función de los circRNAs diferencialmente expresados, sugiere que éstos están involucrados con el efecto del estrés crónico en ratas macho sobre procesos biológicos como el ensamblaje de la sinapsis, la organización de la densidad postsináptica y ensamblaje de receptores GABA_A.
- En hembras los circRNAs diferencialmente expresados estarían implicados en la morfogénesis de la proyección neuronal, guía y desarrollo del axón, como también el transporte y regulación de la exocitosis de vesículas sinápticas. Estos cambios podrían impactar sobre el funcionamiento tanto las sinapsis de tipo excitatorias como inhibitorias.
- Por otro lado, los genes que codifican proteínas que forman parte del ensamblaje de la sinapsis producen circRNAs cuya expresión es sensible al estrés crónico en ratas macho, como circNlgn1 cuya función propuesta en esta Tesis es actuar como esponja de miRNAs diferencialmente expresados contribuyendo posiblemente a la degradación de éstos, permitiendo una mayor expresión de mRNAs que favorece una regulación positiva de la cascada JNK y la modulación de la sinapsis química con posibles impactos sobre la morfología dendrítica.

7.PROYECCIONES

Queda por evaluar la existencia de MREs en la secuencia de todos los circRNAs diferencialmente expresados, para distinguir la posible función como esponjas de miRNAs de todos los candidatos, junto con sus posibles efectos sobre los mRNAs y las vías afectadas por la acción de cada circRNA, realizando un contraste en base al sexo. Resta esclarecer si los efectos en la expresión de circRNAs dependen de la acción de GCs o de otro mediador del estrés. Más aún, se debe determinar si las hormonas sexuales definen las diferencias al estrés entre machos y hembras.

Finalmente, los circRNAs diferencialmente expresados en el HCv de ratas macho y hembra representan candidatos interesantes para descubrir nuevos mecanismos que regulan la actividad de grupos de genes en el contexto del estrés crónico en ambos sexos, como también la génesis y progresión de la patología depresiva. Los circRNAs podrían ser considerados como nuevos posibles biomarcadores del diagnóstico de depresión, si mediante futuros experimentos se pueden encontrar fluidos biológicos contenidos en vesículas provenientes del cerebro. Además de ser nuevos actores para considerar en el desarrollo de nuevos tratamientos sexo-específicos a enfermedades relacionadas al estrés. En la **Figura 23** se representa un modelo general, sobre los efectos de la expresión diferencial de circRNAs en direcciones opuestas comparando ratas macho y hembra sometidas a estrés crónico.

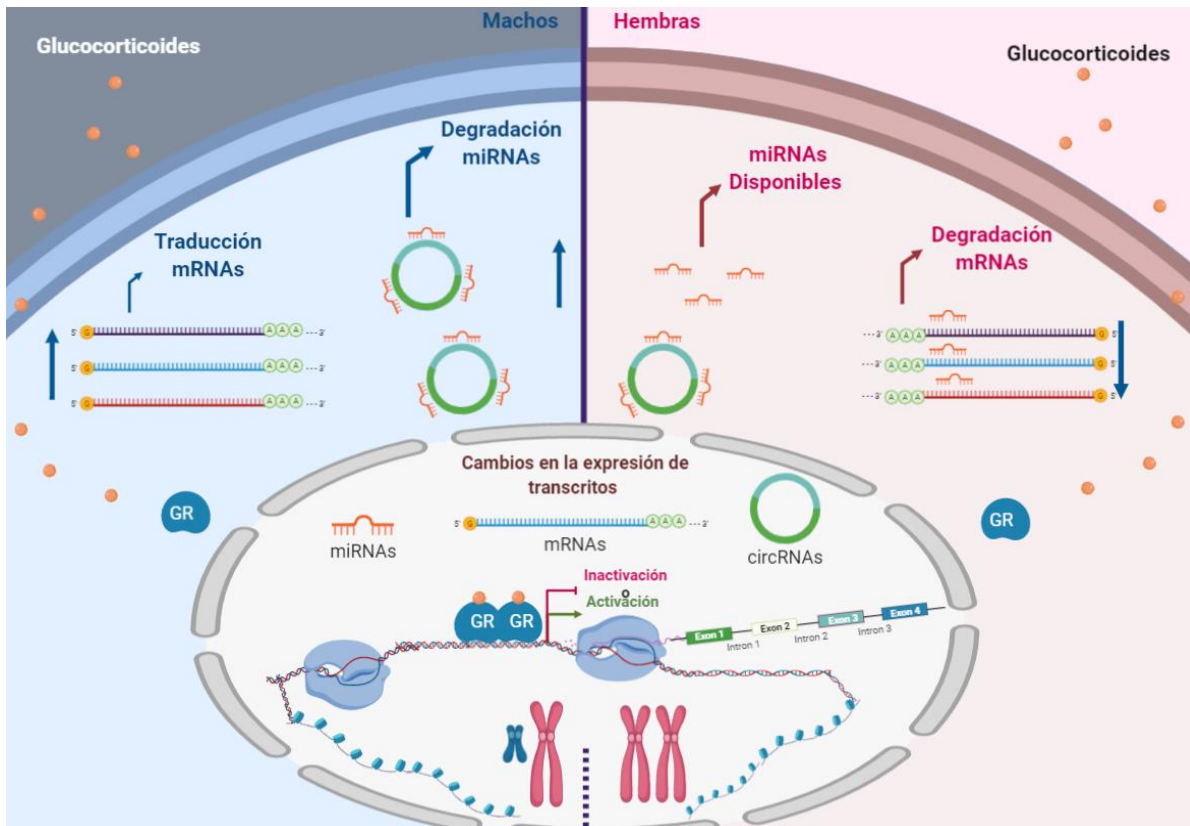


Figura 23. Modelo general de los efectos de la expresión diferencial de circRNAs inducidos por el estrés crónico. El estrés crónico es capaz de modificar el perfil de expresión de mRNAs, miRNAs y circRNAs, posiblemente a través de diferentes mediadores del estrés, como los GCs. Además, este perfil de expresión depende del sexo, donde influye el contexto hormonal de los animales a través de otros receptores nucleares como el receptor de estrógenos, el receptor de andrógenos, estadio del desarrollo y modificaciones epigenéticas en la estructura de la cromatina. La expresión diferencial de circRNAs por efecto del estrés crónico dependiendo del sexo indica que un circRNA puede aumentar su expresión y favorecer su interacción con varios miRNAs y de esta forma aumentar la disponibilidad de mRNAs para ser traducidos. Por otro lado, menores niveles del circRNA permiten una mayor disponibilidad de miRNAs para interactuar con sus diversos blancos mRNA impidiendo la traducción de estos. De esta forma los circRNAs pueden influir en los niveles de expresión de miRNAs y mRNAs modificando diferentes vías que van a afectar los eventos neuroplásticos del HCV contribuyendo a los efectos detrimentales y/o adaptativos del estrés.

8. CONCLUSION

Se evidenció una expresión diferencial de un grupo de circRNAs dependiendo del sexo y por efecto del estrés crónico en hipocampo ventral de ratas, cuyas funciones asociadas a sus genes de origen, indican una participación en los procesos de neuroplasticidad.

9. REFERENCIAS

- Akil, H., Gordon, J., Hen, R., Javitch, J., Mayberg, H., McEwen, B., Mayberg, H. (2018). Treatment resistant depression: A multi-scale, systems biology approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 84(May 2017), 272–288. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.08.019>
- Arnold, A. P., Chen, X., & Itoh, Y. (2012). Sex and Gender Differences in Pharmacology. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 214(January), 67–88. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30726-3>
- Bagot, Rosemary C.Geschwind, D., Huang, X., Neve, R. L., Liu, X., Issler, O., Nestler, E. J., Song, W. (2016). Circuit-wide Transcriptional Profiling Reveals Brain Region-Specific Gene Networks Regulating Depression Susceptibility. *Neuron*, 90(5), 969–983. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.015>
- Bannerman, D. M., Sprengel, R., Sanderson, D. J., Mchugh, S. B., Rawlins, J. N. P., Monyer, H., & Seeburg, P. H. (2014). spatial memory and anxiety. 15(March). <https://doi.org/10.1038/nrn3677>
- Bartholome, O., Ackerveken, P. Van Den, Gil, J. S., & Rogister, B. (2017). Puzzling Out Synaptic Vesicle 2 Family Members Functions. 10(May), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00148>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bottai, D., Guzowski, J. F., Schwarz, M. K., Kang, S. H., Xiao, B., Lanahan, A., Seeburg, P. H. (2002). Synaptic Activity-Induced Conversion of Intronic to Exonic Sequence in Homer 1 Immediate Early Gene Expression. 22(1), 167–175.

- Bremner, J. D., Narayan, M., Anderson, E. R., Staib, L. H., Miller, H. L., & Charney, D. S. (2000). Hippocampal Volume Reduction in Major Depression. *American Journal of Psychiatry*, 157(1), 115–118. <https://doi.org/10.1176/ajp.157.1.115>
- Brummelte, S., & Galea, L. A. M. (2010). Chronic high corticosterone reduces neurogenesis in the dentate gyrus of adult male and female rats. *Neuroscience*, 168(3), 680–690. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.04.023>
- Buckingham, J. C. (2006). Glucocorticoids: Exemplars of multi-tasking. *British Journal of Pharmacology*, 147(SUPPL. 1), 258–268. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706456>
- Calderari, S., Ria, M., Gérard, C., Nogueira, T. C., Villate, O., Collins, S. C., ... Gauguier, D. (2018). Genomics Molecular genetics of the transcription factor GLIS3 identifies its dual function in beta cells and neurons. *Genomics*, 110(2), 98–111. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.09.001>
- Castellano, L., Giamas, G., Jacob, J., Coombes, R. C., Lucchesi, W., Thiruchelvam, P., Stebbing, J. (2009). The estrogen receptor-induced microRNA signature regulates itself and its transcriptional response. *106(37)*, 0–5.
- Chen, Y., & Wang, X. (2020). miRDB : an online database for prediction of functional microRNA targets. *48(August 2019)*, 127–131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>
- Chen, Y., Li, C., Tan, C., & Liu, X. (2016). Circular RNAs: A new frontier in the study of human diseases. *Journal of Medical Genetics*, 53(6), 359–365. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103758>
- Choi, S. Y., Pang, K., Kim, J. Y., Ryu, J. R., Kang, H., Liu, Z., Han, K. (2015). Post-transcriptional regulation of SHANK3 expression by microRNAs related to multiple neuropsychiatric disorders. *Molecular Brain*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0165-3>
- Council, N. R. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition*. <https://doi.org/10.17226/12910>
- Crèvecoeur, J., Kaminski, R. M., Rogister, B., Foerch, P., Vandenplas, C., & Neveux, M. (2014). Expression pattern of synaptic vesicle protein 2 (SV2) isoforms in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis. *2*, 191–204. <https://doi.org/10.1111/nan.12054>

- Dalla, C., Antoniou, K., Papadopoulou-Daifoti, Z., Kokras, N., Sfikakis, A., Xagoraris, M., & Drossopoulou, G. (2005). Chronic mild stress impact: Are females more vulnerable? *Neuroscience*, 135(3), 703–714.
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- DSM IV-TR. (2009). In *Handbook of Disease Burdens and Quality of Life Measures* (pp. 4196–4196). https://doi.org/10.1007/978-0-387-78665-0_5543
- Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., Doyle, F., Lochovsky, L. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- Eskay, R. L. (1985). Glucocorticoids are modulators of GABA A receptors in brain. 512(Table I), 15–19.
- Fanselow, M. S., & Dong, H. W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus Functionally Distinct Structures? *Neuron*, 65(1), 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>
- Ferrari, A. J., Charlson, F. J., Norman, R. E., Patten, S. B., Freedman, G., Murray, C. J. L., Whiteford, H. A. (2013). Burden of Depressive Disorders by Country, Sex, Age, and Year: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *PLoS Medicine*, 10(11), e1001547. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001547>
- Floriou-Servou, A., Sturman, O., Bohacek, J., Rassi, A., Privitera, M., Thöny, B., von Ziegler, L. (2018). Distinct Proteomic, Transcriptomic, and Epigenetic Stress Responses in Dorsal and Ventral Hippocampus. *Biological Psychiatry*, 84(7), 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.02.003>
- Galea, L. A. M., McEwen, B. S., Tanapat, P., Deak, T., Spencer, R. L., & Dhabhar, F. S. (1997). Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience*, 81(3), 689–697. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00233-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00233-9)
- Gao, Y., Wang, J., & Zhao, F. (2015). CIRI: An efficient and unbiased algorithm for de novo circular RNA identification. *Genome Biology*, 16(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0571-3>

- Gao, Y., Zhang, J., & Zhao, F. (2018). Circular RNA identification based on multiple seed matching. *Briefings in Bioinformatics*, 19(5), 803–810. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx014>
- Genome, R., & Project, S. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 428(April), 493–521.
- Gobinath, A. R., Mahmoud, R., & Galea, L. A. M. (2015). Influence of sex and stress exposure across the lifespan on endophenotypes of depression: Focus on behavior, glucocorticoids, and hippocampus. *Frontiers in Neuroscience*, 9(JAN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00420>
- Greger, V., Knoll, J. H. M., Woolf, I. E., Glatt, I. K., Tyndale, R. F., Delorey, T. I. T. M., Lalande, M. I. (1995). The γ -Aminobutyric Acid Receptor 1 / 3 Subunit Gene (GABRG3) Is Tightly Linked to the Subunit Gene (GABRA5) on Human Chromosome 15q11-q13 and Is Transcribed in the Same Orientation. *Genomics*, 26(2), 258–264.
- Gulyaeva, N. V. (2015). Ventral Hippocampus , Stress and Psychopathology : 9(2), 85–94. <https://doi.org/10.1134/S1819712415020075>
- Guo, J. U., Agarwal, V., Guo, H., & Bartel, D. P. (2014). Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biology*, 15(7), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0409-z>
- Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K., & Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 495(7441), 384–388. <https://doi.org/10.1038/nature11993>
- Hansen, T. B., Venø, M. T., Damgaard, C. K., & Kjems, J. (2015). Comparison of circular RNA prediction tools. *Nucleic Acids Research*, 44(6). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1458>
- Heisler, F. F., Loebrich, S., Pechmann, Y., Maier, N., Aleksandar, R., Tokito, M., Kneussel, M. (2012). Musclin Regulates Actin Filament- and Microtubule-Based GABAA Receptor Transport in Neurons NIH Public Access. *Neuron*, 70(1), 66–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.008>
- Hillner, K. M., Neumann, I. D., Aigner, L., Slattery, D. A., & Couillard-Despres, S. (2013). Sex-dependent regulation of hippocampal neurogenesis under basal and chronic stress conditions in rats. *Hippocampus*, 23(6), 476–487. <https://doi.org/10.1002/hipo.22107>

- Hollos, P., Marchisella, F., & Coffey, E. T. (2018). JNK Regulation of Depression and Anxiety. *3*, 145–155. <https://doi.org/10.3233/BPL-170062>
- Jeck, W. R., & Sharpless, N. E. (2014). Detecting and characterizing circular RNAs. *Nature Biotechnology*, *32*(5), 453–461. <https://doi.org/10.1038/nbt.2890>
- Jentsch, M. C., Van Buel, E. M., Bosker, F. J., Gladkevich, A. V., Klein, H. C., Oude Voshaar, R. C., Schoevers, R. A. (2015). Biomarker approaches in major depressive disorder evaluated in the context of current hypotheses. *Biomarkers in Medicine*, *9*(3), 277–297. <https://doi.org/10.2217/bmm.14.114>
- Ji, P., Wu, W., Chen, S., Zheng, Y., Zhou, L., Zhang, J., Zhao, F. (2019). Expanded Expression Landscape and Prioritization of Circular RNAs in Mammals. *Cell Reports*, *26*(12), 3444–3460.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.078>
- Jiang, K., & Li, W. (2016). hsa_circRNA_103636: potential novel diagnostic and therapeutic biomarker in Major depressive disorder.
- Jin, J., Kim, S.-N., Liu, X., Zhang, H., Zhang, C., Seo, J.-S., Sun, T. (2016). miR-17-92 Cluster Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis, Anxiety, and Depression. *Cell Reports*, *16*(6), 1653–1663. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.101>
- Katzman, A., & Alberini, C. M. (2018). NLGN1 and NLGN2 in the prefrontal cortex: their role in memory consolidation and strengthening. *Current Opinion in Neurobiology*, *48*, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.12.003>
- Kaufman, J. (2018). Unraveling the Genetics of Major Depression and Stress-Related Psychiatric Disorders: Is It Time for a Paradigm Shift? *Biological Psychiatry*, *84*(2), 82–84. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.05.006>
- Kendler, K. S., Gatz, M., Gardner, C. O., & Pedersen, N. L. (2006). A Swedish National Twin Study of Lifetime Major Depression. *American Journal of Psychiatry*, *163*(1), 109–114. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.1.109>
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, *12*(4), 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>
- Knoflach F, Rhyner T, Villa M. (1991). The gamma 3-subunit of the GABAA-receptor confers sensitivity to benzodiazepine receptor ligands. *FEBS Lett.* 1991;293(1-2):191-194. doi:10.1016/0014-5793(91)81184-a

- Kozomara, A., & Griffiths-jones, S. (2011). miRBase : integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nature Reviews Genetics*, 12(October 2010), 152–157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>
- Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., Ma'ayan, A. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W90–W97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377>
- Labonté, B., Engmann, O., Purushothaman, I., Menard, C., Wang, J., Tan, C., ... Nestler, E. J. (2017). Sex-specific transcriptional signatures in human depression. *Nature Medicine*, 23(9), 1102–1111. <https://doi.org/10.1038/nm.4386>
- Leary, O. F. O., & Cryan, J. F. (2014). A ventral view on antidepressant action : roles for adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis. *Trends in Pharmacological Sciences*, (Figure 2), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.09.011>
- Lee, A.-R., Kim, M., Kim, J.-H., Park, M., & Cho, E. (2017). Dorsal and Ventral Hippocampus Differentiate in Functional Pathways and Differentially Associate with Neurological Disease-Related Genes during Postnatal Development. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00331>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Sam, T. (2009). The Sequence Alignment / Map format and SAMtools. *Biinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Liao, Y., & Smyth, G. K. (2019). The R package Rsubread is easier , faster , cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nature Reviews Genetics*, 19(8), 47(8). <https://doi.org/10.1093/nar/gkz114>
- Liu, Z., Ran, Y., Tao, C., Li, S., Chen, J., & Yang, E. (2019). Detection of circular RNA expression and related quantitative trait loci in the human dorsolateral prefrontal cortex. *Genome Biology*, 20(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1701-8>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lu, B., Zhang, Q., Wang, H., Wang, Y., Nakayama, M., & Ren, D. (2010). Article Extracellular Calcium Controls Background Current and Neuronal Excitability via an UNC79-

- UNC80-NALCN Cation Channel Complex. *Neuron*, 68(3), 488–499.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.014>
- Lv, T., Miao, Y., Xu, T., Sun, W., Sang, Y., Jia, F., & Zhang, X. (2020). Circ-EPB41L5 regulates the host gene EPB41L5 via sponging miR-19a to repress glioblastoma tumorigenesis. *12*(1), 318–339.
- Ma, X. K., Wang, M. R., Liu, C. X., Dong, R., Carmichael, G. G., Chen, L. L., & Yang, L. (2019). CIRCexplorer3: A CLEAR Pipeline for Direct Comparison of Circular and Linear RNA Expression. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 17(5), 511–521.
<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2019.11.004>
- Maggio, N., & Segal, M. (2012). Steroid modulation of hippocampal plasticity: switching between cognitive and emotional memories. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6(March), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00012>
- Mahmoudi, E., & Cairns, M. J. (2019). Circular RNAs are temporospatially regulated throughout development and ageing in the rat. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-38860-9>
- Martin, L. A., Neighbors, H. W., & Griffith, D. M. (2013). The Experience of Symptoms of Depression in Men vs Women. *JAMA Psychiatry*, 70(10), 1100.
<https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.1985>
- McHugh, S. B., Fillenz, M., Lowry, J. P., Rawlins, J. N. P., & Bannerman, D. M. (2011). Brain tissue oxygen amperometry in behaving rats demonstrates functional dissociation of dorsal and ventral hippocampus during spatial processing and anxiety. *European Journal of Neuroscience*, 33(2), 322–337.
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07497.x>
- Ministerio de salud. (2017). Segunda entrega ENS 2016-2017. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile, 1–59. Retrieved from http://www.ipsuss.cl/ipsuss/site/artic/20171122/asocfile/20171122142253/ens_2016_17_primeros_resultados.pdf
- MINSAL, Superintendencia de Salud, & Superintendencia de Seguridad Social. (2015). Estadísticas de licencias médicas y subsidio por incapacidad laboral - 2015. Retrieved from www.suseso.cl
- Miranda, K. C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y., Tam, W., Thomson, A. M., ... Rigoutsos, I. (2006). Resource A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites

and Their Corresponding Heteroduplexes. 1203–1217.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.031>

Muñoz-Llanos, M., García-Pérez, M. A., Xu, X., Tejos-Bravo, M., Vidal, E. A., Moyano, T. C., Fiedler, J. L. (2018). MicroRNA Profiling and Bioinformatics Target Analysis in Dorsal Hippocampus of Chronically Stressed Rats: Relevance to Depression Pathophysiology. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(August), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00251>

Palazzo, A. F., & Lee, E. S. (2015). Non-coding RNA: What is functional and what is junk? *Frontiers in Genetics*, 5(JAN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00002>

Palikaras, K., Lionaki, E., & Tavernarakis, N. (2018). homeostasis, physiology and pathology. *Nature Cell Biology*, 20(September), 1013–1022.
<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0176-2>

Petrone, A., Battaglia, F., Wang, C., Dusa, A., Su, J., Zagzag, D., Sap, J. (2003). Receptor protein tyrosine phosphatase a is essential for hippocampal neuronal migration and long-term potentiation. 22(16), 4121–4131.

Pfafenrot, C., & Preußner, C. (2019). Biomolecular Detection and Quantification Establishing essential quality criteria for the validation of circular RNAs as biomarkers. *Biomolecular Detection and Quantification*, 17(March), 100085.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100085>

Pfau, M. L., Purushothaman, I., Feng, J., Golden, S. A., Aleyasin, H., Lorsch, Z. S., Shen, L. (2016). Integrative Analysis of Sex-Specific microRNA Networks Following Stress in Mouse Nucleus Accumbens. 9(December).

Pinto, V., Costa, J. C., Morgado, P., Mota, C., Miranda, A., Bravo, F. V., ... Sousa, N. (2015). Differential impact of chronic stress along the hippocampal dorsal–ventral axis. *Brain Structure and Function*, 220(2), 1205–1212.
<https://doi.org/10.1007/s00429-014-0713-0>

Pittenger, C., & Duman, R. S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 88–109.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301574>

Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S., & Sanacora, G. (2012). The stressed synapse: The impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(1), 22–37. <https://doi.org/10.1038/nrn3138>

- Qiao, Y., Wang, X., Wang, R., Li, Y., Yu, F., Yang, X., & Song, L. (2015). AF9 promotes hESC neural differentiation through recruiting TET2 to neurodevelopmental gene loci for methylcytosine hydroxylation. *Cell*, 164(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2015.17>
- Reul, J. M. H. M., Collins, A., Saliba, R. S., Mifsud, K. R., Carter, S. D., Gutierrez-Mecinas, M., Linthorst, A. C. E. (2015). Glucocorticoids, epigenetic control and stress resilience. *Neurobiology of Stress*, 1(1), 44–59. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2014.10.001>
- Robertson, D. A. F., Beattie, J. E., Reid, I. C., & Balfour, D. J. K. (2005). Regulation of corticosteroid receptors in the rat brain: The role of serotonin and stress. *European Journal of Neuroscience*, 21(6), 1511–1520. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03990.x>
- Rybak-Wolf, A., Ashwal-Fluss, R., Bartok, O., Herzog, M., Rajewsky, N., Glažar, P., Giusti, S. (2015). Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Molecular Cell*, 58(5), 870–885. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.027>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Ideker, T. (2003). Cytoscape : A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. (*Karp 2001*), 2498–2504.
- Shao, Y., & Chen, Y. (2016). Roles of Circular RNAs in Neurologic Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(April), 1–5.
- Sher, L., Oquendo, M. A., Burke, A. K., Cooper, T. B., & John Mann, J. (2013). Combined dexamethasone suppression-corticotrophin-releasing hormone stimulation test in medication-free major depression and healthy volunteers. *Journal of Affective Disorders*, 151(3), 1108–1112. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.06.049>
- Shors, T. J., Chua, C., & Falduto, J. (2001). Sex differences and opposite effects of stress on dendritic spine density in the male versus female hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(16), 6292–6297. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-06292.2001>
- Spencer, R. L., Miller, A. H., Moday, H., Stein, M., & Mc Ewen, B. S. (1993). Diurnal differences in basal and acute stress levels of type I and type II adrenal steroid receptor activation in neural and immune tissues. *Endocrinology*, 133(5), 1941–1950. <https://doi.org/10.1210/endo.133.5.8404640>

- Sramek, J. J., Murphy, M. F., & Cutler, N. R. (2016). Sex differences in the psychopharmacological treatment of depression. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 18(4), 447–457. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.12.053>
- Steiger, J. L., & Russek, S. J. (2004). GABA A receptors: building the bridge between subunit mRNAs, their promoters, and cognate transcription factors. *101*, 259–281. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.12.002>
- Tata, D. A., & Anderson, B. J. (2010). *Physiology & Behavior* The effects of chronic glucocorticoid exposure on dendritic length, synapse numbers and glial volume in animal models: Implications for hippocampal volume reductions in depression. *Physiology & Behavior*, 99(2), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.09.008>
- Trapnell, C., Hendrickson, D. G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J. L., & Pachter, L. (2012). Articles Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*, 31(1), 46–53. <https://doi.org/10.1038/nbt.2450>
- Valor, L. M., Viosca, J., Lopez-atalaya, J. P., & Barco, A. (2013). Lysine Acetyltransferases CBP and p300 as Therapeutic Targets in Cognitive and Neurodegenerative Disorders. 5051–5064.
- van Rossum, D., Verheijen, B. M., & Pasterkamp, R. J. (2016). Circular RNAs: Novel Regulators of Neuronal Development. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(August). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00074>
- Volobueva, M. N., Manolova, A. O., Gulyaeva, N. V., Kvichansky, A. A., & Bolshakov, A. P. (2017). Neonatal proinflammatory stress alters the expression of genes of corticosteroid receptors in the rat hippocampus: Septo-temporal differences. *Neurochemical Journal*, 11(3), 255–258. <https://doi.org/10.1134/s1819712417030059>
- Wang, C. C., & Wang, S. J. (2009). Modulation of presynaptic glucocorticoid receptors on glutamate release from rat hippocampal nerve terminals. *Synapse*, 63(9), 745–751. <https://doi.org/10.1002/syn.20654>
- Wang, Y., Jiang, H., Meng, H., Lu, J., Li, J., Zhang, X., Bao, T. (2017). Genome-wide transcriptome analysis of hippocampus in rats indicated that TLR/NLR signaling pathway was involved in the pathogenesis of depressive disorder induced by chronic restraint stress. *Brain Research Bulletin*, 134(August), 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.07.021>

- Westenbroek, C., Den Boer, J. A., Veenhuis, M., & Ter Horst, G. J. (2004). Chronic stress and social housing differentially affect neurogenesis in male and female rats. *Brain Research Bulletin*, 64(4), 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2004.08.006>
- World Health Organization. (2020.). Depression. Retrieved March 19, 2020, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- Xi, Y., Fowdur, M., Liu, Y., Wu, H., He, M., & Zhao, J. (2019). Differential expression and bioinformatics analysis of circRNA in osteosarcoma. *Bioscience Reports*, 39(5), 1–11. <https://doi.org/10.1042/BSR20181514>
- Yang, J., Yu, L., Yan, J., Xiao, Y., Li, W., Xiao, J., & Lei, J. (2020). Circular RNA DGKB Promotes the Progression of Neuroblastoma by Targeting miR-873 / GLI1 Axis. *10(July)*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01104>
- You, X., Vlatkovic, I., Babic, A., Will, T., Epstein, I., Tushev, G., Chen, W. (2015). Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nature Neuroscience*, 18(4), 603–610. <https://doi.org/10.1038/nn.3975>
- Zhang, X. O., Wang, H. Bin, Zhang, Y., Lu, X., Chen, L. L., & Yang, L. (2014). Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell*, 159(1), 134–147. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.001>
- Zhang, Y., Xue, W., Li, X., Zhang, Y., Xue, W., Li, X., Chen, L. (2016). The Biogenesis of Nascent Circular RNAs Article The Biogenesis of Nascent Circular RNAs. *CellReports*, 15(3), 611–624. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.058>
- Zhou, T., Xie, X., Li, M., Shi, J., Zhou, J. I. N. J., Knox, K. S., Gu, W. (2018). Rat BodyMap transcriptomes reveal unique circular RNA features across tissue types and developmental stages. 1443–1456. <https://doi.org/10.1261/rna.067132.118>.
- Zhu, B., Jiang, L., Huang, T., Zhao, Y., Liu, T., Zhong, Y., Xu, H. (2017). modulating γ - secretase activity. *Nature Communications*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01799-4>