

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Evaluación de miARNs asociados a neuroplasticidad estructural y funcional ante estrés agudo y crónico por restricción de movimiento en hipocampo de rata

Memoria para optar al título de bioquímico
María Alexandra García Pérez

Directora

Jenny Fiedler Temer PhD

Laboratorio de Neurobioquímica
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Cotutor

Mauricio Muñoz PhD(c)

Laboratorio de Neurobioquímica
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago de Chile

2015

LUGAR DE REALIZACIÓN

Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT 1120528

A la fecha, este trabajo ha dado origen a las siguientes comunicaciones:

Publicación científica

- Castañeda, P., Muñoz-Llanos, M., García-Rojo, G., Ulloa, JL., Bravo, J., Marquez, R., **García-Pérez, M.A.**, Arancibia D, Rojas P, Mondaca-Ruff D, Díaz-Véliz G, Mora S, Aliaga E., y Fiedler JL. (2015). "Association of N-Cadherin Levels and Downstream Effectors of Rho GTPases With Dendritic Spine Loss Induced by Chronic Stress in Rat Hippocampal Neurons." Journal of Neuroscience Research. **93**(10):Sp1.

Presentación a congreso internacional

- Aguayo, F., Rojas, P., Pacheco, A., García-Rojo, G., Muñoz-Llanos, M., **García-Pérez, M.A.**, Márquez, R., y Fiedler, J. Acute stress increases FMRP levels in hippocampus and promotes Akt-mTOR and MAPK pathways activation in rats. 9th Annual Canadian Neuroscience (CAN) Meeting. Vancouver, Canada. 24 – 27 de Mayo, 2015. Panel.

Presentación a congresos nacionales

- **García-Pérez, M.A.**, Muñoz-Llanos, M., Vidal, E., Moyano, T., Gutiérrez, R., Pacheco, A., Aguayo, F., y Fiedler, J. Acute stress produce changes in specific microRNAs levels that targets genes coding for key proteins involved in neuroplasticity. XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología de Chile. Puerto Varas, Chile. 30 de septiembre – 4 de octubre, 2014. Panel.

- Trabajo premiado: Beca de estudios por primer lugar en presentación panel, en la XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología de Chile. Puerto Varas, Chile. 30 de septiembre - 4 de octubre, 2014.

- Aguayo, F., Rojas, P., Márquez, R., Pacheco, A., **García-Pérez, M.A.**, García-Rojo, G., Muñoz-Llanos, M., y Fiedler, J. Acute stress controls FMRP levels and its activity through AKT-Mtor and MAPK ERK1/2 pathway in rat hippocampus. XXXVII. Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología de Chile. Puerto Varas, Chile. 30 de septiembre – 4 de octubre, 2014. Panel.

- Pacheco, A., Muñoz-Llanos, M., García-Rojo, G., Aguayo, F., **García-Pérez, M.A.**, Márquez, R., Werner, M., Cidlowski, J., y Fiedler, J. Acute administration of corticosterone to adrenalectomized rats changes miRNAs levels in the hippocampus: relationship with AMPA and NMDA receptors expression. XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología de Chile. Puerto Varas, Chile. 30 de septiembre - 4 de octubre, 2014. Panel.

“Tengo tiempo para saber si lo que sueño concluye en algo”

L.A Spinetta

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mis padres María Pérez y Héctor García, por el apoyo incondicional, su amor infinito y toda la confianza que depositaron en mí y en que está etapa de mi vida cerraría exitosamente.

No hay forma de que pueda retribuir o explicar en palabras lo eternamente agradecida que estoy de ustedes, de su enseñanza, valores y principios. Pero ustedes saben que la persona que soy hoy es el reflejo de su arduo trabajo y esfuerzo.

También me gustaría agradecer a mi familia, a mis abuelos Moye y Tata por ser los pilares de la familia García, han sido una gran inspiración y me han demostrado que mediante la perseverancia y esfuerzo se pueden cumplir los sueños y mucho más. También a mis tías Rosy, Lili, Vivi y Susana por todo su cariño, apoyo y palabras de aliento cuando fueron necesarias.

A todos mis primos, en especial a Emilio, Javi, Dani, Carolina, Cindy, Julio, Camila y Jorge que han sido una parte hermosa e importante de mi vida, mis hermanos que nunca tuve los cuales han llenado mi memoria de recuerdos, risas, aventuras, locuras, espiritualidad, música y mucho amor. Les estoy eternamente agradecida por todo eso, espero que sigamos siendo una familia muy unida a pesar de todos los imprevistos y desafíos de la vida y estoy segura que así será.

También quiero hacer una mención especial a la Cholita que la amo eternamente y agradezco el honor de haber sido parte de su familia, haberla conocido y poder haberla acompañado en su viaje por este mundo donde no solo me enseñó que la vida es hermosa y hay personas hermosas de corazón por lo que nunca hay que perder las esperanzas en los sueños. También agradecer a tía Carmen, Nina, Magaly, Delfina y a los tios Luis, Nano, Tuto, Chano. A mis primos Pérez más cercanos Lili, Jessica, Nico, Jano, Denisse, Hans, María Cecilia, Yoyo, Cristián, Anita, Vivi y Francisco por su compañía y recuerdos de infancia.

Este logro académico también se lo debo a mis hermosas amigas del colegio Daniela Acuña y Fernanda Rojas que siempre han estado incondicionales para mí, apoyándome en las

buenas y en las malas, llevamos más diez años siendo amigas y es algo de lo cual estoy infinitamente agradecida y valoro muchísimo. También agradecer a Carlos que ha sido parte importante de mi vida y lo quiero mucho! Y a otra amiga de la infancia la Pame Godoy que siempre se ha mantenido cerca con su sonrisa y palabritas de amor y apoyo deseando lo mejor para mí.

No podría no agradecer a todos mis amigos de la U tanto de Bachillerato como de Bioquímica que compusieron recuerdos increíbles en mi vida, lleno de risas, viajes, confidencias, aventuras, y también en las malas apoyándonos, dándonos aliento en los momentos difíciles a pesar de las distancias u otros, y tantas cosas más que nunca olvidaré, entre ellos a Nicolín, Mati, Jake, Coni Oyarzún, Marquito, Eli, y mi Andreita bella (los quiero demasiado y muchas gracias por todo). Además a mi círculo de chatitas Dani Letelier, Maca S., Chio, Carito y Javivi (Chata!) que son todas bellísimas mujeres luchadoras y llenas de sueños y buenos deseos. Las admito infinitamente y también les agradezco por su compañía en este recorrido y en la vida. Y por último a mis loquillas de Bq a la Paulii y la Valina que también formaron parte indispensable de esta travesía. Nunca dejaron de apoyarme y creer en mí inclusive cuando yo ya no lo hacía jajaja. Las adoro y también doy las gracias de haber llegado a conocerlas y tenerlas en mi vida. También agradecer la compañía y buenos recuerdos que tuve junto a Pascal, Gaba, Juan, Martín, Chahín, Ale Alvéstegui, Maca Ubilla, entre otros.

Personas invaluable que tuve el privilegio de conocer y que actualmente forman parte indiscutible de mi vida son mis Contempolupitas Gaby, Kacho, Pancha, Dani, Aurora, Cami, Nelly, Manu, Jerry y Joaco. Gracias a la danza y el arte que emana de ustedes, gracias por compartirlo conmigo su confianza, amor y además nutrir mi alma de arte. Las re quiero!

Para haber llegado donde estoy, creo que el complemento que siempre estuvo ahí para mí fue el Arte, a todos y cada uno(a) de los que aportó de esta forma les agradezco por siempre. A Pascale que entre el francés y la poesía hoy junto a Dani conformamos el Colectivo pajarístico.

Junto con todas estas personas quiero agradecer además a mis compañeros de trabajo que sin su orientación, guía y apoyo no hubiese sido posible finalizar esta meta. Entre estos a Mauro, Aníbal, Gonzalo, Felipe, Ruth, Coni, Maca y Gladys. Muchas gracias chiquillos por todo.

Agradecer también al Laboratorio de Microbiología por su soporte y asesoría, al profesor Sergio Álvarez, Pipe, Paula y todos quienes me ayudaron durante mi estadía en el laboratorio.

También me gustaría agradecer al Laboratorio De Virología por su apoyo intelectual, acogida y buena onda, especialmente al profesor Ricardo Soto, que me permitió trabajar en su laboratorio para finalmente lograr una etapa crucial de mi tesis. A Alessandra por su paciencia, enseñanzas y simpatía, que fue la persona que estuvo codo a codo trabajando conmigo. También a la Bárbara, el Pancho por su buenísima onda, al profesor Fernando, Álvaro y todos los del laboratorio en general.

Por último, pero no por eso menos importante me gustaría agradecer a mi profesora Jenny Fiedler por haber sido una excelente guía, haber creído en mí como científica, su apoyo y cariño. Finalmente no solo me mostró su faceta como docente sino también como una gran mujer luchadora y de grandes valores. He aprendido mucho de usted en este camino y agradezco todos los momentos y aprendizajes que me ha entregado para el presente y el futuro.

Sin más, muchas gracias a cada uno(a) de ustedes han sido parte fundamental de mi vida y de este proceso, en el cual cierro una etapa para emprender nuevas y mejores cosas.

“Siempre parece imposible hasta que se hace” (Nelson Mandela).

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ABREVIATURAS	vii
RESUMEN	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estrés y glucocorticoides	1
1.2 Hipocampo	3
1.3 Neuroplasticidad	5
1.4 Estrés agudo y crónico	5
1.5 Estrés y glutamato	6
1.6 MicroARNs y su rol en la neuroplasticidad	7
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo general	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18

4.1 Reactivos, softwares y equipos	18
4.1.1 Reactivos generales	18
4.1.2 Soluciones y medios de cultivo	18
4.1.3 Sistemas comerciales y oligonucleótidos	18
4.1.4 Equipamiento	19
4.1.5 Software	19
4.2 Animales: manejo y modelos experimentales	19
4.3 Estrés agudo	20
4.4 Determinación de los niveles séricos de corticosterona	21
4.5 Estrés crónico	22
4.6 Adrenalectomía	23
4.7 Extracción de ARN y PCR cuantitativo	25
4.7.1 Extracción de ARNs menores a 200 nt	25
4.7.2 Transcripción inversa de ARNs menores a 200 nt	25
4.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	26
4.8 Predicción de blancos 3'UTR para miR-92a	27
4.9 Clonación en plásmido pmiRGLO	28
4.9.1 Hibridación de oligonucleótidos que contienen secuencia semilla	28
4.9.2 Fosforilación de ADN doble hebra	28
4.9.3 Preparación de bacterias competentes	29
4.9.4 Transformación de bacterias	30
4.9.5 Purificación del ADN plasmidial	30

5.0 Secuenciación	32
5.1 Cultivo de células HEK-293T	33
5.1.1 Transfección celular y ensayos de reportero	34
5.1.2 Cuantificación de la actividad luciferasa de luciérnaga y renilla	34
5.2 Análisis Estadístico	35
6.0 RESULTADOS	36
6.1 PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	36
6.1.1 Niveles de corticosterona plasmática aumentan en respuesta a estrés agudo	36
6.1.2 Número de heces aumenta en respuesta a estrés agudo	36
6.2 ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO	38
6.2.1 Efectos del estrés agudo y crónico sobre miARNs relevantes en la modulación de morfología de las espinas dendríticas	38
6.2.2 El estrés agudo y crónico afecta diferencialmente los niveles del miR-92a a nivel del hipocampo	40
6.2.3 Regulación de los niveles de miARNs por corticosterona y actividad glutamatérgica	42
6.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	46
6.3.1 MiR-92a posee blancos relevantes en el sistema nervioso, específicamente en señalización y guía axonal	46
6.4 Ensayo de reportero de luciferasa para determinar la función de miARNs	48
7.0 DISCUSIÓN	51
8.0 CONCLUSIONES	60
9.0 BIBLIOGRAFÍA	61
10. ANEXO	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1: Anatomía y vías sinápticas del hipocampo de rata.	4
Figura 2: Síntesis y procesamiento de los miARNs.	9
Figura 3: Representación del modelo descrito entre la relación de miR-132, miR-134 y miR-138 con morfología de la espina dendrítica.	11
Figura 4: Diagrama del modelo propuesto: Regulación de los niveles de miARNs por la acción de GCs.	16
Figura 5: Modelo experimental de estrés agudo por restricción de movimiento.	21
Figura 6: Modelo experimental de estrés crónico por restricción de movimiento.	23
Figura 7: Modelo experimental de adrenalectomía.	24
Figura 8: Verificación de sitio interno de clonamiento (Not I) en reportero de luciferasa para determinar actividad de miARNs.	32
Figura 9: Confirmación de los clones seleccionados por secuenciación.	33
Figura 10: Durante el estrés agudo hay incremento en los niveles séricos de corticosterona y del número de heces.	37
Figura 11: Cambios en los niveles de miR-134 inmediatamente posterior al período de estrés agudo.	39
Figura 12: Niveles de miR-92a aumentan inmediatamente posterior al período de estrés agudo y disminuyen tras el estrés crónico.	41
Figura 13: El aumento en los niveles del miR-92a inducido por la administración aguda de CORT en ratas ADX se previene por la administración del antagonista NMDAR MK-801.	43
Figura 14: Los niveles de miR-485 no cambian en respuesta a CORT o al antagonista NMDAR MK-801 en ratas ADX.	45
Figura 15: MiR-92a posee blancos relevantes en el sistema nervioso, específicamente en señalización y guía axonal.	47
Figura 16: La línea celular HEK293T posee altos niveles de miR-92a y SNORD95 en comparación al hipocampo de rata.	48

Figura 17: El mRNA de REST posiblemente es modulado post-transcripcionalmente por miR-92a.	50
Figura 18: Modelo propuesto de regulación de miARNs para estrés agudo y crónico.	59
Anexo	68
Figura I: Los niveles de miR-152, miR-15b y miR-219 no cambian durante y posterior al período de estrés agudo.	68
Figura II: Organización genómica de los tres clúster parálogos de miR-92a.	69
Figura III: El estrés crónico promueve una disminución en la ganancia de peso y aumento de las glándulas adrenales.	70
Figura IV: Curvas de calibración de los partidores utilizados.	71
Figura V: Vector pmirGLO utilizado para la clonación de los 3'UTR blanco de miR-92a.	72
Figura VI: Curva de luminiscencia versus concentración de plasmidio pmirGLO.	73
Figura VII: Perfil de secreción de corticosterona durante el día en ratas macho.	74

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1: Oligonucleótidos usados para la cuantificación de miARNs.	27
Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados para la generación de sitios blanco de miR-92 en el vector pmirGLO.	29
Anexo	68
Tabla I: Resumen de la búsqueda bioinformática de blancos putativos de miR-92a.	73

ABREVIATURAS

3'UTR: Región no codificante 3'

ACTH: Hormona adrenocorticotrófica

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADX: Adrenalectomizadas

AMPA: Receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

Amp_r: Resistencia a ampicilina

Antagomir: Oligonucleótidos sintéticos diseñados específicamente para silenciar miARNs endógenos

APT1: Proteína acil-tioesterasa-1

ARN: Ácido ribonucleico

CA: Cuerno de Ammon

CA1/4: Cuerno de Ammon 1, 2, 3 y 4

CaMKII γ : Proteína quinasa II gamma dependiente de Ca²⁺-calmodulina

CORT: Corticosterona

CPEB3: Proteína de unión al elemento de poliadenilación citoplasmático isoforma 3

CRH: Hormona liberadora de corticotrofinas

Ct: Ciclo umbral (qPCR)

EEM: Error estándar medio

GABA: Receptor de ácido γ -aminobutírico

GABA_A: Receptor ionotrópico de ácido γ -aminobutírico

GCs: Glucocorticoides

GD: Giro dentado

Glu: Glutamato

GLUR1/4: Subunidades del receptor AMPA

GR: Receptor de glucocorticoides

GRIN (1,2A/B/D, 3A/B/C): Subunidades del receptor NMDA (1,2A/B/D, 3A/B/C)

GTP: Guanosín trifosfato

G α 12/13: Subunidades 12 y 13 de la proteína G α

HEK293T: Células humanas embrionarias de riñón 293T

HEPES: Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico

HHA: Eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal

HRluc-neo: Gen de luciferasa de Renilla humanizada resistente a neomicina

I.p: Intraperitoneal

IPA: Análisis de rutas o vías Qiagen's Ingenuity

KAT2B: Acetiltransferasa K isoforma 2B

KCC2: Cotransportador de K^+/Cl^-

LB: Medio Luria-Bertani

LIMK1: Proteína LIM quinasa-1

LTP: Potenciación sináptica de larga duración

luc2: Gen reportero de luciferasa de luciérnaga

mARN : ARN mensajero

MCS: Sitio de multiclonamiento

MEF2D: Factor potenciador específico de miocitos isoforma 2D

mEPSCs: Corrientes postsinápticas excitatorias miniaturas

mGluR1-5 : Receptores metabotrópicos de glutamato 1 al 5

miARN: micro-ARN

Mimics: Oligonucleótidos sintéticos diseñados específicamente para emular a los miARNs

MR: Receptor de mineralocorticoides

NMDA: Receptor de N-metil-D-aspartato

NA: Noradrenalina

Nt: nucleótidos

p250GAP: Proteína estimuladora de la actividad GTPasa

PBS: Amortiguador fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PFC: Corteza prefrontal

PGK: Promotor de fosfoglicerato quinasa

Pre-miARN: Precursor de micro-ARN

Pri-miARN: Micro-ARN primario largo

PSD95: Proteína de la densidad post-sináptica 95

PVN: Núcleo paraventricular

qPCR : Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Rac: Proteínas G pequeñas pertenecientes a la familia Rho-GTPasas

REST: Factor transcripcional silenciador de RE-1

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por ARN

SV40: Promotor de virus 40 vacuolado del simio

RESUMEN

El estrés es una respuesta fisiológica natural del organismo que ha permitido la evolución y supervivencia. El cerebro recibe e interpreta los estímulos del medio ambiente, comandando respuestas a través de mediadores para mantener la homeostasis. Si este proceso no ocurre de forma eficiente, genera un costo al organismo que al acumularse provocará un sinnúmero de patologías atribuidas al estrés. La respuesta de estrés, inducida por la restricción de movimiento, gatilla la liberación de catecolaminas y glucocorticoides (GCs) a nivel central y periférico, respectivamente. Se ha descrito en roedores que alzas en los niveles de GCs producto de un evento estresor único (agudo), o repetido (crónico) modulan diferencialmente procesos cognitivos asociados en parte al hipocampo; debido a que esta estructura está enriquecida en receptores de GCs. Estos receptores al unirse a su hormona (corticosterona) inducen cambios lentos a nivel de la expresión génica o cambios rápidos provocando un aumento en la liberación del neurotransmisor glutamato.

El hipocampo es heterogéneo en sus funciones; Así la porción dorsal participa en procesos como aprendizaje y memoria, en cambio su porción ventral participa en la respuesta de estrés y en las emociones. Estas funciones se llevan a cabo a través de circuitos neuronales glutamatérgicos que incluyen la activación de sus receptores del tipo AMPA y NMDA. A nivel molecular, se observa que la actividad neuronal excitatoria induce traducción local de transcritos a nivel dendrítico produciendo cambios locales en proteínas relacionadas a la regulación del citoesqueleto y de las subunidades de receptores glutamatérgicos. Un mecanismo fino de regulación post-transcripcional involucra la participación de los microARNs (miARNs) cuyos niveles se ven modificados en diversas neuropatologías o enfermedades neurodegenerativas. Además, algunos miARNs regulan los niveles de P250GAP (miR-132), LimK1 (miR-134) y APT1 (miR-138), proteínas involucradas en mecanismos neuroplásticos al promover cambios estructurales de las espinas dendríticas y por ende en su funcionalidad. Recientemente en el laboratorio, mediante microarreglos se determinaron cambios en los niveles de miARNs en hipocampo dorsal en un modelo de estrés por restricción de movimiento, destacando el miR-92a y miR-485; ambos involucrados en la modulación de las sinapsis excitatorias. De especial relevancia fue el miR-92a, altamente conservado entre vertebrados e invertebrados y cuya expresión se asocia a dos clúster (cromosoma 13 y X). Más aún, es de alta expresión en neuronas glutamatérgicas y está enriquecido en el axón. Tiene como blancos relevantes a transcritos neuronales como el factor potenciador específico de miocitos isoforma 2D (MEF2D), la proteína de unión al elemento de

poliadenilación citoplasmático isoforma 3 (CPEB3), el cotransportador neuronal de Cl⁻ y K⁺ (KCC2), la subunidad del receptor AMPA (GluR1), entre otros.

En base a estos antecedentes, se propuso la siguiente hipótesis: “Los miR-132, miR-134 y miR-138 asociados a plasticidad estructural y los miR-92a y miR-485 que regulan la sinapsis excitadoras, cambian diferencialmente sus niveles en el hipocampo de rata en respuesta a estrés por restricción de movimiento”. Para el modelo de estrés agudo, se utilizaron hipocampos completos de ratas macho sometidas a sesiones de 0,5 o 2,5 h de restricción por movimiento, sacrificándose inmediatamente después. Se determinó mediante qPCR que los niveles de miR-92a aumentaron a las 2,5 h. Adicionalmente se evaluaron los efectos posteriores (6 y 24 h) a una sesión de estrés agudo (2,5 h). Se observó que el miR-92a aumentó luego de 6 h y en cambio el miR-134 incrementó a las 24 h. Para el modelo de estrés crónico, se realizaron sesiones de restricción (2,5 h) durante 14 días y se observó una disminución significativa en los niveles del miR-92a. Para determinar si los cambios observados están relacionados a una acción directa o indirecta de los GCs, se extirparon las glándulas adrenales (ADX) para eliminar la producción de los GCs. La restitución de la corticosterona (i.p.) incrementó los niveles del miR-92a 0,5 h posterior a la administración en comparación a animales ADX. Más aún, este incremento fue prevenido al antagonizar el receptor NMDA con MK-801, sugiriendo una acción indirecta de los GCs sobre los niveles de este miARN. Adicionalmente, se realizaron análisis *in silico* para determinar blancos putativos del miR-92a, sugiriendo a KCC2, MEF2D, KAT2B y REST como altamente probables. Se llevaron a cabo ensayos de reportero de luciferasa en células HEK293T, las que presentan altos niveles de miR-92a. Se determinó que la inserción en el reportero de la secuencia blanco de este miARN presente en el mRNA del factor transcripcional silenciador de RE-1 (REST), produjo una reducción en la actividad de la luciferasa. En base a esto, postulamos al mRNA de REST como posible blanco del miR-92a.

En esta memoria se demuestra que efectivamente los miARNs son diferencialmente modulados en respuesta a estrés por restricción por movimiento tanto agudo (miR-134, miR-92a) como crónico (miR-92a). Más aún, se demostró que los niveles de miR-92a están indirectamente regulados por los GCs a través de la señalización mediada por el receptor NMDA. Además proponemos a REST como un probable blanco de miR-92a, destacando el hecho de que este factor transcripcional está involucrado en la mantención de las funciones cognitivas durante el envejecimiento y por tanto, su reducción podría estar relacionada a respuestas compensatorias frente al estrés comandadas por el miR-92a.

SUMMARY

The regulatory miR-132, miR-134 and miR-138 associated with structural plasticity and miR-92a and miR-485 that regulate the excitatory synapses, differentially change their levels in the rat hippocampus in response to stress by restriction of movement.

Stress is a natural physiological response of the body that has allowed evolution and survival. The brain receives and interprets environmental stimuli, commanding responses through mediators to maintain homeostasis. If this process does not occur efficiently, a number of diseases attributed to stress can be triggered. The stress response induced by the restriction of movement, elicits the release of catecholamines and glucocorticoids (GCs) at the central and peripheral level, respectively. Increases in levels of GCs in rodents product of a single (acute) or repeated (chronic) stressor event differentially modulate cognitive processes in part associated to the hippocampus, because this structure is enriched in GCs receptors. These receptors induce slow changes at the level or gene expression or rapid changes related to an increase in the release of the glutamate neurotransmitter by binding to its hormone (corticosterone).

The hippocampus is heterogeneous in its functions: the dorsal portion is involved in processes such as learning and memory; the ventral portion is involved in stress response and emotions. These functions are performed through glutamatergic neuronal circuits that include activation of NMDA and AMPA type receptors. At the molecular level, neuronal excitatory activity induces local translation of mRNAs at the dendrites producing local changes in proteins related to the regulation of the cytoskeleton and the subunits of glutamate receptors. A fine-tuning mechanism of gene expression is related to microRNAs (miRNAs) that are modified in various neuropathologies and neurodegenerative diseases. In addition, some miRNAs regulate the levels of p250GAP (miR-132), LimK1 (miR-134) and APT1 (miR-138) proteins involved in neuroplastic processes, promoting structural changes of dendritic spines and therefore their functionality.

Recently in our laboratory, we determined changes in miRNA levels in the dorsal hippocampus, using a stress model by restriction of movement. Using microarrays, increases were detected primarily in the

levels of miR-92a and miR-485 that are involved in the modulation of excitatory synapses. Of particular importance is the fact that miR-92a is highly conserved among vertebrate and invertebrates; in rats this miRNA is present in two copies as part of two clusters for several miRNAs in two chromosomal locations (chromosomes 13 and X). It is highly expressed in glutamatergic neurons and is enriched in the axon of these neurons, and its relevant neural specific targets are the myocyte enhancer factor isoform 2D (MEF2D), the cytoplasmic polyadenylation element binding protein isoform 3 (CPEB3), the neuronal K⁺/Cl⁻ cotransporter (KCC2) and the AMPA receptor subunit (GluR1), among others. Based on this background, the following hypothesis is proposed: "The miRNAs 132, 134 and 138 are associated with structural plasticity, while miR-92a and 485 regulate the excitatory synapses, differentially changing their levels in the rat hippocampus in response to stress by restriction of movement."

For the acute stress model, male rats were subjected to sessions of 0.5 or 2.5 h of movement restraint, immediately sacrificed and the different miRNAs analyzed in the hippocampus. Increased levels of miR-92a were detected at 2.5 h by qPCR. Additionally, post-stress effects were evaluated (at 6 and 24 h) after an acute stress (2.5 h) session. It was observed that miR-92a increased after 6 h, while miR-134 increased at 24 h. For the chronic stress model, single sessions (2.5 h) of movement restriction were performed for 14 days, observing a significant decrease in miR-92a levels. To determine whether the observed changes are related to the direct or indirect action of GCs, adrenal glands were removed (ADX) to eliminate the production of GCs. The restoration of corticosterone (i.p.) produced an increase of miR-92a levels 0.5 h after administration of this hormone, compared to ADX animals. Furthermore, this increase was prevented by antagonizing the NMDA receptor with MK-801, suggesting an indirect action of GCs on the levels of this miRNA. Additionally, *in silico* analyses were performed to determine putative targets of miR-92. Predictions suggested that KCC2, MEF2D, KAT2B and REST as highly probable targets. Luciferase reporter assays were conducted in HEK293T cells that have high levels of miR-92a. These assays showed that the insertion of the miRNA target sequence present in the mRNA of the transcriptional silencer RE-1 (REST) produced a reduction of luciferase activity. Based on this, we propose that the mRNA of REST is a potential target of miR-92a.

Herein it is shown that miRNAs are indeed differentially modulated in response to acute (miR-134, miR-92a) and chronic (miR-92a) stress by restriction of movement. Furthermore, it was shown that miR-92a

levels are indirectly regulated by GCs through signaling mediated by the NMDA receptor. We further propose REST as a putative target of miR-92a, highlighting the fact that this transcription factor is involved in maintaining cognitive functions during aging, and therefore its reduction could be related to compensatory responses to stress commanded by miR-92a.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés y glucocorticoides

El estrés se define como una respuesta fisiológica natural y necesaria del organismo para afrontar una situación amenazante o de alta demanda, lo cual permite al individuo la adaptación y supervivencia.

El cerebro es el órgano encargado de traducir todos los estímulos provenientes del medio externo. A través de la activación de circuitos neuronales específicos comanda respuestas que pueden involucrar cambios en la activación de diversas cascadas de señalización que producen cambios epigenéticos, en la expresión génica y modificación post-traducciona de proteínas, procesos que se verán finalmente reflejados en modificaciones conductuales y/o cognitivas permitiendo la adaptación del individuo. Este proceso dinámico asociado a la preservación de la homeostasis se conoce como alostasis (McEwen, 2003).

La respuesta al estrés es comandada por diversos mediadores del estrés, principalmente la secreción de monoaminas, neuropéptidos y hormonas esteroidales, que actuarán diferencialmente en zonas específicas del cerebro determinando las diversas manifestaciones fisiológicas del estrés (Joëls y cols., 2009). Sin embargo, cuando la acción de estos mediadores es ineficiente, conlleva consecuencias adversas tales como daño de tejidos y alteraciones conductuales. El costo que realiza el organismo para producir respuestas adaptativas se conoce como carga alostática. La activación continua o crónica de las respuestas de estrés incrementa la carga alostática lo que conlleva a respuestas inadecuadas del organismo y es la responsable de los efectos patológicos del estrés (McEwen, 2003).

Existen diversos factores que determinan la respuesta al estrés, como la edad, el sexo, el contexto en que ocurre la exposición al estresor, el tipo de agente estresor y su duración (McEwen, 2003). Respecto a este último factor, pueden ocurrir respuestas rápidas ante un estímulo de corta duración (estrés agudo), o bien ocurrir respuestas más complejas y perdurables ante la exposición a un estresor en forma repetida (estrés crónico) (De Kloet y cols., 1998).

Frente la exposición a un estímulo estresor, ocurre en primera instancia una activación en paralelo del sistema nervioso simpático y del sistema endocrino. El aumento en el tono del sistema nervioso simpático desencadena una respuesta conocida como “reacción de lucha o huida”, la cual provoca una

liberación de monoaminas, principalmente de noradrenalina (NA) a nivel de las sinapsis e indirectamente de adrenalina vía activación de la médula suprarrenal (McEwen, 2003). Por otro lado, el sistema endocrino inicia su respuesta a través de la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), el cual en respuesta al estímulo, activa a los núcleos paraventriculares (PVN) en el hipotálamo aumentando la secreción de la hormona liberadora de corticotrofinas (CRH), que a su vez actuará en la adenohipófisis gatillando la liberación de adrenocorticotropina (ACTH), finalmente permitiendo la síntesis y liberación de glucocorticoides (GCs), esteroides secretados desde la corteza suprarrenal hacia el torrente sanguíneo. Los GCs una vez secretados, generan una retroalimentación negativa a nivel de la hipófisis e hipotálamo para la autorregulación del sistema endocrino logrando la homeostasis (Kellendonk y cols., 2002; Di y cols., 2003).

Los GCs, corticosterona (CORT) en rata y cortisol en humano (Panagiotakopoulos y cols., 2014), son secretados cíclicamente a través de un patrón circadiano o bien mediante una secreción episódica como ocurre en respuesta a un estímulo (Revollo y cols., 2009). Esta hormona al igual que otros mediadores del estrés como la CRH y NA poseen una amplia variedad de tejidos blancos en el organismo, y en específico en el cerebro, y dependiendo del tipo de receptor al que se unan, ejercerán su acción en forma ubicua o tejido específica (Joëls y cols., 2009). Una de las estructuras cerebrales que es blanco para los GCs es el hipocampo (Kellendonk y cols., 2002) la cual presenta una distribución ubicua y en alta densidad de los receptores de mineralocorticoides (MR) o de alta afinidad. En cambio, el receptor de GCs (GR) o de baja afinidad se encuentra fundamentalmente en el Cuerno de Ammon (CA) específicamente en el CA1 y en el Giro Dentado (GD) (De Kloet y cols., 1998; Herman). En respuesta al estrés, la activación de ambos receptores promueve la retroalimentación negativa de la secreción de GCs a nivel del eje HHA (De Kloet, 2003).

Los MR y GR al unir su hormona participan en una serie de procesos celulares, al actuar a nivel génico como factores transcripcionales, o bien uniéndose a otros factores transcripcionales produciendo efectos de represión o activación de la expresión génica, siendo este tipo de regulación conocida como vía canónica (Karst y cols., 2000; Savory y cols., 2001). Por otro lado, se ha descrito que el complejo hormona-GR es capaz de producir eventos no genómicos rápidos (vía no-canónica), ya sea a través de la interacción con algunas quinasas presentes en el citoplasma (Revollo y cols., 2009) o bien por la

activación de receptores presentes en la membrana plasmática desencadenando cambios en la excitabilidad neuronal (Groeneweg y cols., 2012).

En contraste a la respuesta de estrés agudo, se ha descrito que cuando ocurre un estímulo reiterado o persistente, el sistema se sobre-exige lo que aumenta la carga alostática y por ende produciendo un costo al organismo. El incremento en la carga alostática es el responsable de la aparición de patologías asociadas a la desregulación de los mecanismos homeostáticos que frenan el eje HHA y por ende se logran niveles elevados de CORT circulantes. Debido a la alta densidad de receptores de GCs en el hipocampo esta estructura cerebral es altamente sensible al estrés, específicamente al estrés crónico o a los niveles crónicamente altos de GCs donde se podrían observar alteraciones tanto en su funcionamiento como en su morfología (De Kloet y cols., 1998; McEwen y cols., 2001) .

1.2 Hipocampo

El hipocampo es una de las estructuras cerebrales más plásticas y susceptible a los efectos del estrés. Además, el hipocampo ha sido profusamente estudiado por dos razones principales. Primero por su estructura anatómica, compuesta por densas capas neuronales que forman parte de un circuito de tres sinapsis “trisináptico” particularmente excitador, ya que estas neuronas se estimulan y propagan potenciales eléctricos entre sí. Este circuito ha sido extensamente estudiado y caracterizado desde el punto de vista electrofisiológico.

El hipocampo está formado por el GD y por el CA, ésta última estructura se subdivide a su vez en cuatro subáreas (CA1- CA4), observándose que estas regiones hipocampales se encuentran interconectadas entre sí y además reciben información de otras regiones cerebrales. La información ingresa al hipocampo desde la corteza entorrinal, estructura que recibe la información sensorial y conecta a la neocorteza con el hipocampo, a través de axones que hacen sinapsis con las células granulares del GD. Estas neuronas proyectan sus axones denominados fibras musgosas hacia los somas de las neuronas piramidales del CA3, las cuales emiten las colaterales de Schaffer que hacen sinapsis con las neuronas piramidales del CA1 (**Fig. 1**) (Collingridge y cols., 2004; Neves y cols., 2008). Estas sinapsis tienen como neurotransmisor excitador principal al glutamato (Glu), el cual actúa sobre dos clases de receptores

denominados ionotrópicos y metabotrópicos. Los primeros se han clasificado como receptores de Kainato, de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y de N-metil-D-aspartato (NMDA) y para los segundos se han descritos a lo menos cinco receptores metabotrópicos (mGluR1-mGluR5). Además, estas sinapsis reciben aferencias inhibitorias desde interneuronas que secretan ácido γ -aminobutírico (GABA) activando al receptor de GABA_A (Wayman, 2008; Flores y cols., 2014). En segundo término, el hipocampo ha sido muy estudiado en relación a su participación en procesos cognitivos complejos como aprendizaje y memoria episódica y de largo plazo (Collingridge y cols., 2004; Conboy y cols., 2010), tanto en modelos animales como en humanos, funciones principalmente atribuidas al hipocampo dorsal (Fanselow y cols., 2010). El principal modelo estudiado en relación a la memoria de largo plazo es la potenciación sináptica de larga duración (LTP), proceso observado como respuesta al aumento en la actividad neuronal excitadora mediada por Glu, que involucra la participación de los receptores NMDA y AMPA (Bliss y cols., 1993). Además, la LTP puede perdurar horas o días; fenómeno que subyace a la plasticidad sináptica o neuroplasticidad (Bliss y cols., 1993). Por otro lado, el hipocampo ventral se ha asociado a procesos como el estrés y el condicionamiento al miedo (Fanselow y cols., 2010).

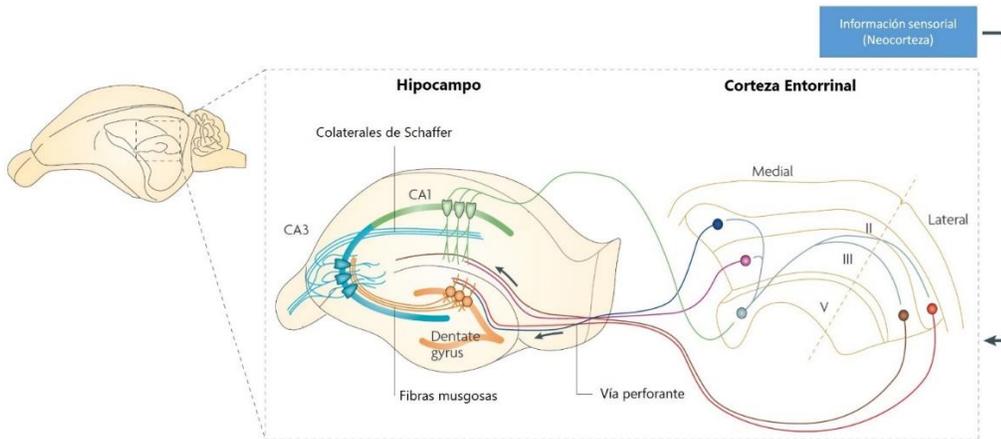


Figura 1. Anatomía y vías sinápticas del hipocampo de rata. El diagrama muestra el cerebro de rata y una magnificación del hipocampo y en color se denota la vía trisináptica. Se detalla la vía perforante formada por los axones provenientes de la capa II de la corteza entorrinal (rojo y café) que inervan al GD haciendo de nexo entre la neocorteza que recibe la información sensorial y el hipocampo. Las células granulares del GD proyectan sus axones (fibras musgosas) a las dendritas apicales proximales de las células piramidales de CA3, las cuales se conectan finalmente con las células piramidales de CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Figura obtenida de Neves y cols., 2008.

1.3 Neuroplasticidad

Cuando nos referimos a neuroplasticidad, hablamos de la habilidad cerebral de modificarse a nivel molecular, estructural y/o cognitivo como una consecuencia de las experiencias, básicamente como un modelo de estímulo-respuesta. Dentro de la versatilidad de las respuestas neuroplásticas se encuentran las modificaciones en las conexiones neuronales (fortaleciéndolas o debilitándolas), la eficiencia sináptica, la liberación de neurotransmisores, composición o número de receptores a nivel post-sináptico y remodelamiento del citoesqueleto que impacta la morfología dendrítica (formación o eliminación de espinas dendríticas) (Collingridge y cols., 2004). Los estímulos pueden ser variados y a su vez generar respuestas independientes o de forma sinérgica (Albright y cols., 2000). Los cambios neuroplásticos del sistema nervioso se han vinculado a procesos cognitivos como son la consolidación de la memoria y el aprendizaje (Bailey y cols., 2015). Adicionalmente, el estrés influye en la neuroplasticidad, y por esta razón es de suma importancia determinar cómo y en qué magnitud está ejerciendo su acción en el hipocampo.

1.4 Estrés Agudo y Crónico

El estrés agudo se define como una respuesta frente a la exposición a un estímulo específico. La aplicación de diversos tipos de estímulos en animales se utiliza como modelo de estudio para evaluar sus efectos a nivel fisiológico. A su vez, análogamente se utiliza la inyección de una dosis de GCs para determinar el efecto agudo de este mediador del estrés (Lupien y cols., 1997; Wingefeld y cols., 2014). Como un efecto rápido del estrés agudo, se ha descrito un aumento en la liberación de Glu (Popoli y cols., 2012) y también un aumento en el mRNA de algunas subunidades que conforman el receptor NMDA (Lupien y cols., 1997; Wingefeld y cols., 2014), además de cambios a nivel post-sináptico en los niveles de las subunidades de los receptores AMPA y NMDA (Yuen, 2011). Existe suficiente bibliografía que respalda la idea que el estrés agudo produce una facilitación en la adquisición y consolidación de la memoria dependiente del hipocampo (Osborne y cols., 2015). Como ejemplo, en un modelo experimental en ratas adrenalectomizadas (ADX), vale decir sin glándulas suprarrenales y por lo tanto incapaces de producir GCs, se observa una disminución en la capacidad de adquisición de memoria

espacial, la cual se recupera tras la restitución aguda de GCs (Baldi y cols., 2005).

Por otro lado, el estrés crónico se produce por una estimulación persistente y/o reiterativa afectando el tono de los nervios simpáticos y la respuesta neuroendocrina del eje HHA, aumentando considerablemente la secreción de GCs (De Kloet y cols., 1998). La evidencia a nivel preclínico como clínico muestra que niveles altos de corticoides promueven un deterioro cognitivo y contribuyen al desarrollo de neuropatologías como la depresión (Ulloa y cols., 2010). Junto con esto, se ha visto que el estrés crónico genera una disminución en el aprendizaje asociativo, aumentando la conducta de desesperanza aprendida y la anhedonia (Ulloa y cols., 2010).

La restricción de movimiento, modelo animal utilizado para generar una respuesta de estrés asociada a la activación del eje HHA, desencadena como efectos fisiológicos un aumento en la masa de la glándula adrenal y una reducción en la ganancia de peso corporal (Ulloa y cols., 2010; Castañeda y cols., 2015). Más aún, en estos modelos se han reportado cambios morfológicos vinculados a una disminución en la densidad de espinas en dendritas basales y apicales de las neuronas piramidales de la región CA1 en hipocampo de rata (Vyas, 2002; Fernandez-Guasti y cols., 2012). En resumen, se ha asociado el estrés agudo a efectos benéficos en el cerebro a diferencia del estrés crónico que se ha asociado a efectos deletéreos. Sin embargo, los efectos del estrés sobre la función cerebral no están ajenos de controversia, ya que se ha reportado que tanto el estrés agudo como el crónico provocan un detrimento tanto en la inducción y la mantención de la LTP como en la densidad de espinas lo cual afecta el aprendizaje espacial y asociativo en ratas (Chen y cols., 2010). Por todo esto, el efecto del estrés en la plasticidad sináptica sigue siendo polémico y una interrogante por dilucidar.

1.5 Estrés y glutamato

La acción canónica de los GCs se relaciona con la regulación de la transcripción génica y cuyos efectos se pueden observar luego de horas y perdurar varios días (Karst y cols., 2000). Además, se ha descrito un efecto rápido no-genómico de los GCs que induce la liberación de Glu a través de los MR y GR presentes membrana plasmática (Venero y cols., 1999; Groeneweg y cols., 2012). Se ha descrito en estrés agudo y tras la administración de GCs un aumento de la frecuencia de las corrientes post-sinápticas excitatorias en miniaturas (mEPSCs), fenómeno asociado a la rápida liberación de Glu (Lowy

y cols., 1993; Moghaddam, 1993; De Kloet y cols., 2008). Además, se ha observado que la aplicación de un estresor no induce una mayor liberación de Glu en ratas ADX, respaldando la idea de una regulación en la liberación de Glu dependiente de GCs (Lowy y cols., 1993). Más aún, la administración intraperitoneal (i.p.) de CORT (2,5 mg/Kg) tanto en ratas control como ADX, aumenta la liberación de Glu a nivel del hipocampo en la misma temporalidad en la cual se alcanza la máxima concentración de GCs en el hipocampo (Venero y cols., 1999).

Junto con esto, se determinó que la administración de los antagonistas de MR y GR, previo a la de CORT, no afecta la liberación de Glu en el hipocampo (Venero y cols., 1999), efecto que no se condice con lo descrito por otros autores (Groeneweg y cols., 2012; Popoli y cols., 2012). Esto sugiere que, adicionalmente a la señalización mediada por receptores de GCs presentes en la membrana plasmática, existen otros mecanismos a partir de los cuales los GCs regulan la exocitosis de Glu.

En resumen, los GCs y el Glu ejercen acciones a nivel del hipocampo que podrían explicar los efectos rápidos del estrés agudo y la generación de LTP por actividad neuronal excitatoria, dando cuenta del fortalecimiento de las sinapsis y por ende el incremento en las funciones cognitivas como el aprendizaje. Sin embargo, la formación de la memoria requiere del establecimiento de redes muy elaboradas, bien sintonizadas y junto con esto que sean altamente plásticas. A nivel molecular, las neuronas requieren de múltiples proteínas para llevar a cabo estos procesos. Más aún, la síntesis local de proteínas producto de la actividad neuronal, procede a través de la activación de vías de señalización que permiten la traducción de ciertos transcritos (Derkach y cols., 2007). Existe evidencia de mecanismos de regulación fina de la traducción de mARNs que en parte están asociados a la acción de ARNs no codificantes como lo son los micro-ARN (miARNs).

1.6 MiARNs y su rol en la neuroplasticidad

Los miARNs son una clase una clase de ARNs pequeños no codificantes de entre 20-25 nucleótidos (nt) que regulan principalmente la síntesis de proteínas ya sea por represión traduccional al unirse a la región no codificante 3' (3'UTR) de los mARNs blanco (inhibiendo la iniciación o elongación de la traducción), o promoviendo la degradación del mARN blanco o su desadenilación (Flores y cols., 2014).

La síntesis de los miARNs se origina a partir de un miARN primario largo (pri-miARNs) en el núcleo, el cual es procesado a una estructura de horquilla de aproximadamente 70 nt denominada pre-miARN. Este procesamiento es comandado por la enzima Drosha (ARNsa tipo III), junto con la proteína de unión a ARN de doble hebra, DGCR8, siendo el transcrito luego exportado hacia el citoplasma por la proteína Exportina 5. En el citosol, el pre-miARN es procesado por la exonucleasa Dicer a pequeños miARN de doble hebra. Una de las dos hebras del miARN maduro entra al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que contiene a la proteína Argonauta-2, la que facilita la unión a la región 3'UTR de los mRNA blancos (He y cols., 2004). Los miARNs poseen en su extremo 5' una secuencia de 6-8 nt denominada secuencia semilla, que está energéticamente favorecida para la interacción miARN-mARN. Si la complementariedad es perfecta, el RISC producirá la degradación del blanco; sin embargo si la unión es imperfecta RISC producirá la represión traduccional (He y cols., 2004; Dweep y cols., 2013). Además de su rol a nivel post-transcripcional, los miARNs han sido implicados en el silenciamiento de genes al tener como blanco regiones promotoras (Cullen, 2004). Por otro lado, la otra hebra denominada miARN* puede ser degradada aunque existe evidencia de que también puede regular el proceso traduccional (He y cols., 2004) **(Fig.2)**.

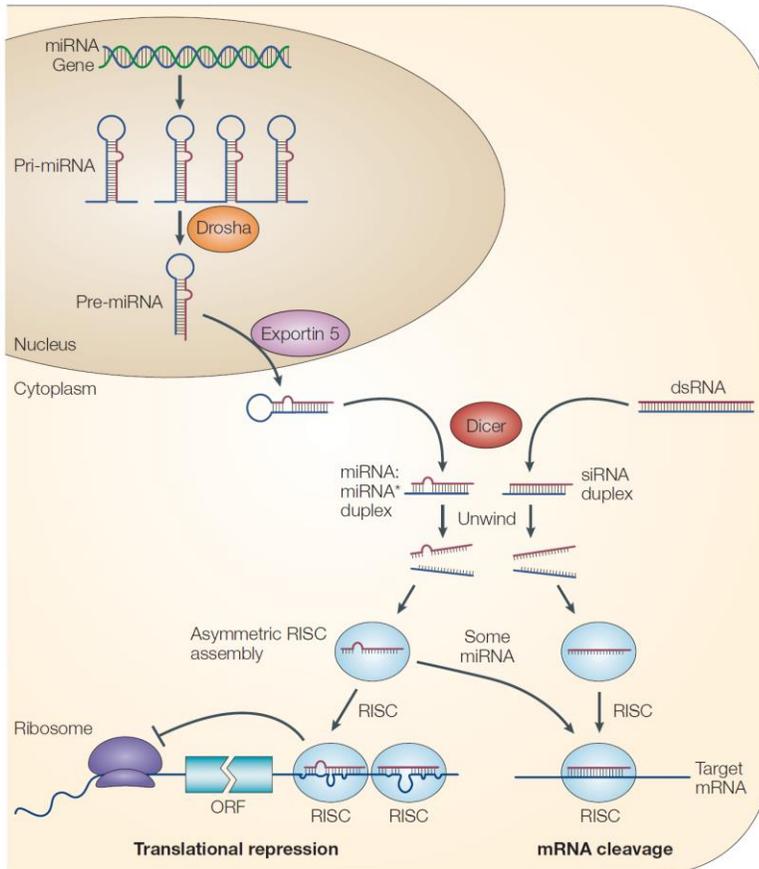


Figura 2. Síntesis y procesamiento de los miARNs. Los miARNs son transcritos por la ARN polimerasa II a pri-miARNs, siendo transcritos muy largos y con estructura de horquilla. Estos son escindidos por la endonucleasa Drosha a pre-miARNs (60-70 nt). Luego son exportados al citoplasma por la Exportina 5 y procesados por Dicer a ARN de doble hebra. Una hebra puede ser degradada mientras que la otra se unirá al complejo RISC interactuando con el mRNA blanco para su represión traduccional o para ser destinada a degradación. También se muestra la acción de un siARNs sobre la regulación traduccional. Figura obtenida de He y cols., 2004.

Los miARNs tienen un rol relevante en la traducción de proteínas claves que participan en la formación y mantenimiento de las sinapsis. Se observan variaciones en los niveles de éstos durante el desarrollo del sistema nervioso, también pueden contribuir a la formación y/o consolidación de la memoria a largo plazo y además han sido vinculados a desórdenes cognitivos y neurodegenerativos (Follert y cols., 2014; Saab y cols., 2014).

Existen antecedentes que postulan a los miARNs como los responsables de la regulación de la plasticidad sináptica, como el crecimiento de espinas hasta procesos tan complejos como el aprendizaje

(Lugli y cols., 2008). Existen numerosos componentes de la maquinaria de procesamiento de los miARNs presentes en dendritas y están altamente enriquecidos en las densidades post-sinápticas. Entre éstos, se encuentran Dicer, Drosha y la proteína Argonauta-1 que forma parte del complejo RISC responsable de silenciar el mRNA (Lugli y cols., 2005). Conjuntamente, se ha sugerido que el aumento localizado de Ca^{2+} , producto de la activación de receptores NMDA, media la proteólisis de Dicer, a su conformación activa, por las calpaínas que son proteasas dependientes de Ca^{2+} (Lugli y cols., 2005; Lugli y cols., 2008). Además, también se ha demostrado que estímulos de alta frecuencia que inducen LTP causarían el movimiento de polirribosomas hacia las espinas dendríticas, ubicándose muy cerca de sinapsis activas (Ostroff y cols., 2002; Bourne y cols., 2007). Junto con esto, se ha detectado la presencia de factores tanto de iniciación como de elongación de la traducción en la espina dendrítica (Asaki y cols., 2003). Todos estos antecedentes sustentan la idea de la traducción local de transcritos esenciales para la mantención de la sinapsis en la espina dendrítica.

Se ha descrito que el miR-124 se expresa abundantemente en neuronas del sistema nervioso central de ratón (Lagos-Quintana y cols., 2002), y su sobreexpresión en el hipocampo produce un deterioro en la memoria espacial y en la generación de la LTP en hipocampo (Yang y cols., 2012). Además, el incremento en los niveles de este miARN en la amígdala lateral se ha vinculado con el condicionamiento al miedo (Griggs y cols., 2013). Otro ejemplo es el miR-132, altamente enriquecido en cerebro adulto de mamíferos (He y cols., 2004), que al ser sobreexpresado en el hipocampo aumenta el volumen de las espinas dendríticas. Su blanco es el mRNA de la proteína estimuladora de la actividad GTPasa (p250GAP) que regula negativamente la actividad de la proteína G pequeña Rac involucrada en la polimerización de actina del citoesqueleto de la espina dendrítica (Impey y cols., 2010). Adicionalmente, mediante el uso de “*antagomirs*”, que son oligonucleótidos sintéticos que silencian la actividad de los miARNs endógenos, se determinó que la reducción en el miR-132 induce un cambio en la forma de las espinas tipo hongos (funcional) a una forma alargada denominadas filodios (no funcional) (Mellios y cols., 2011). Concordantemente, la sobreexpresión del miR-132 aumenta la densidad de espinas dendríticas en la subregión CA1 del hipocampo (Hansen y cols., 2010) y en contraste un aumento de este miARN en CA3 promueve la muerte neuronal en respuesta a un episodio epiléptico inducido (Jimenez-Mateos, 2011). Por otro lado, el miR-134 es expresado específicamente en el cerebro y se ha implicado en la formación

de la memoria. El miR-134 es un importante regulador de la diferenciación neuronal y del desarrollo de espinas al reprimir la traducción del mRNA de la proteína LIM quinasa-1 (LimK1) (Schratt y cols., 2006; Gaughwin y cols., 2011). Otro ARN no codificante implicado en la regulación de la morfología de las espinas es el miR-138, el cual está altamente enriquecido en dendritas. Participa como un regulador negativo del tamaño de las espinas dendríticas en hipocampo de rata, al tener como blanco el transcrito de la proteína acil-tioesterasa-1 (APT1). Esta enzima es la encargada de remover la acilación de las subunidades 12 y 13 de la proteína Gα (Gα12/13) (Bhattacharyya y cols., 2000) y consecuentemente reduce la actividad de la GTPasa pequeña RhoA, promoviendo el crecimiento de las espinas (Siegel y cols., 2009) (Fig. 3). Con estos ejemplos, queda de manifiesto el rol relevante de los miARNs en la neuroplasticidad.

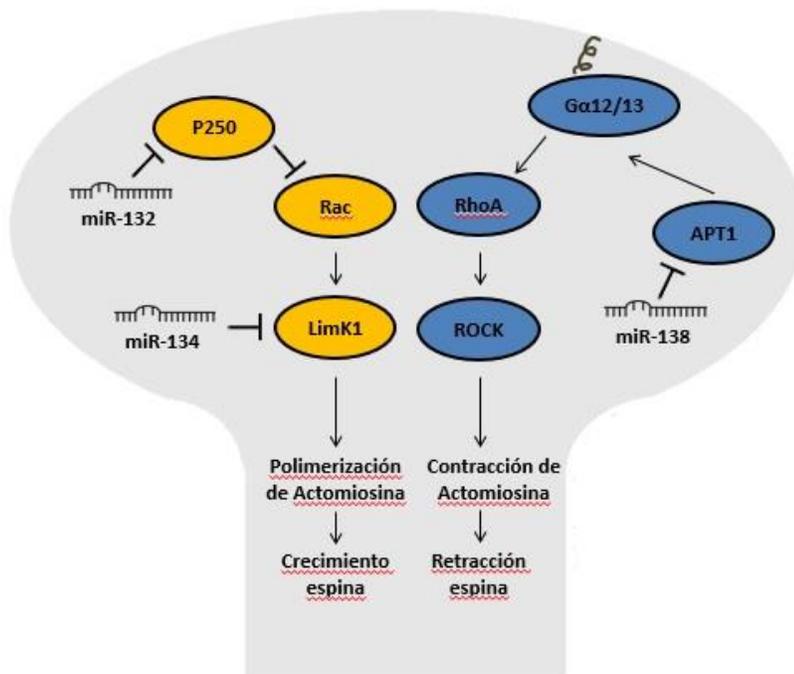


Figura 3. Representación del modelo descrito entre la relación de miR-132, miR-134 y miR-138 con morfología de la espina dendrítica. El modelo ilustra la relación de los miARNs con la morfología de la espina dendrítica. MiR-132 reduce los niveles de p250GAP, activando la vía Rac y por ende el remodelado de actina y el crecimiento de las espinas. Por otro lado, el miR-134 tiene como blanco a LimK1 (vía abajo de Rac), lo que permite un aumento de la actividad de factor despolimerizante de actina, cofilina, produciendo la reducción del tamaño de la espina. El miR-138 reprime a APT1, produciendo un aumento de Gα12/13 palmitoilado en membrana, activando la vía RhoA-ROCK y promoviendo la retracción de la espina. Modificado de (Castañeda y cols., 2015).

En nuestro laboratorio, se evaluó recientemente el efecto del estrés agudo y crónico sobre los niveles de miARNs en hipocampo dorsal mediante microarreglos y qPCR. Sin embargo, no se observó una correlación entre los cambios determinados por el microarreglo y la invariación cuantificada por qPCR. A partir de estos resultados, se decidió nuevamente evaluar los miARNs que mostraron cambios en el microarreglo en el hipocampo completo para determinar el efecto global del estrés sobre esta estructura cerebral.

De particular interés fueron los miR-15b y miR-152 cuyos niveles mostraron una reducción en el microarreglo, en contraste al incremento en el miR-219 en respuesta a estrés agudo. Se ha descrito que el miR-15b reduce los niveles de proteínas importantes en la señalización sináptica glutamatérgica al modular la expresión de la subunidad GRIN3A del receptor NMDA y de la proteína de la densidad post-sináptica 95 (PSD95), asociada al anclaje de receptores NMDA y AMPA (Beveridge y cols., 2010). A su vez, este miARN tiene un impacto indirecto en la vía fosfatidilinositol-3 quinasa/proteína quinasa B al tener como blanco al mRNA de la proteína homóloga de fosfatasa y tensina implicada en mediar la inducción de LTP y efectos de neuroprotección asociados al factor neurotrófico derivado del cerebro (Walker y cols., 2015). Se determinó, durante la ejecución de esta memoria, que el nivel del miR-15b no cambió en el hipocampo completo durante el estrés agudo, ni en el período de recuperación del estrés (**Ver Anexo Fig. Ia**). Por otro lado, se ha descrito que una reducción en los niveles de miR-152 se asocia a la sobreexpresión de proteínas involucradas en la guía axonal como la proteína de atracción, homólogo de Roundabout-1 (Liu y cols., 2012); sin embargo el rol de esta proteína en hipocampo adulto es desconocida. Mediante qPCR se determinó en hipocampo completo que el nivel del miR-152 no se modificó durante la restricción de movimiento realizada durante 0,5 y 2,5 h o durante el período de recuperación post-estrés (6 y 24 h), indicando que este miARN al igual que el miR-15 b es insensible al aumento de los GCs (**Ver Anexo Fig. Ib**).

Por otro lado, se ha reportado que el miR-219 está altamente enriquecido en cerebro adulto de mamíferos (He y cols., 2004) y más aún, se ha descrito que el antagonismo farmacológico del NMDAR reduce sus niveles (Beveridge y cols., 2010). Además, el miR-219 interviene en la señalización del NMDA al controlar los niveles de la proteína quinasa II gamma dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII γ), enzima involucrada tanto en la regulación de la actividad como en el tráfico del receptor NMDA hacia la

membrana plasmática (Kocerha, 2009). Durante la ejecución de esta memoria se determinó que los niveles de miR-219 no variaron en hipocampo completo en respuesta al estrés agudo ni durante el periodo de recuperación del estrés (hasta las 24 h) (**Ver Anexo Fig. 1c**). Queda por precisar si esta insensibilidad al estrés es homogénea o se centra en un área específica del hipocampo. Es importante mencionar que es probable que estos miARNs cumplan roles claves en la función neuronal y que existan mecanismos que preserven su expresión manteniendo la homeostasis neuronal. Esta idea se apoya en el hecho de que se ha observado una disminución en el nivel del miR-152 y un aumento tanto del miR-15b como del miR-219 en neuropatologías tales como esquizofrenia, Alzheimer y desorden bipolar (Beveridge y cols., 2010; Henshall, 2014; Mukhopadhyay y cols., 2014; Walker y cols., 2015), las cuales se han asociado a trastornos durante el desarrollo.

Por otra parte, otros miARNs que mostraron cambios significativos en el microarreglo ante estrés crónico fueron miR-92a y miR-485. Aunque el miR-485, ha sido poco estudiado, recientemente se ha descrito un rol en la liberación de neurotransmisores al poseer como blanco a la proteína 2A de vesículas pre-sináptica (Cohen y cols., 2011). Además, el miR-485 disminuye la densidad de espinas, la formación de agregados de PSD95 y la expresión en la superficie de la subunidad GluR2 del receptor AMPA (Cohen y cols., 2011). Adicionalmente, se han asociado variaciones en sus niveles a numerosas enfermedades neurológicas y/o neurodegenerativas (Cohen y cols., 2014).

De especial interés fue el miR-92a, ya que se expresa en múltiples tipos celulares, atribuyéndole un rol de oncogén y además en angiogénesis (Concepcion y cols., 2012). Se ha observado que se expresa preferencialmente en neuronas glutamatérgicas (He y cols., 2012) y además se detecta en altos niveles en el axón lo que plantea una regulación de la traducción de mARNs blancos en esta región (Natera-Naranjo y cols., 2010). También se ha descrito como regulador de la neurogénesis en la neocorteza durante el desarrollo (Bian y cols., 2013) y por otro lado se ha observado una reducción en sus niveles durante el envejecimiento (Inukai y cols., 2012). Se le han atribuido como blancos el 3'UTR del cotransportador de K^+/Cl^- (KCC2) (Barbato y cols., 2010), y la región 3'UTR de la proteína de unión al elemento de poliadenilación citoplasmático isoforma 3 (CPEB3), un represor de la traducción de importantes transcritos neuronales (Vetere y cols., 2014). Adicionalmente, se ha descrito como blanco al 3'UTR del mARN del factor potenciador específico de miocitos isoforma 2D (MEF2D), un factor transcripcional

que modula procesos de plasticidad estructural inducidos por la memoria (Vetere y cols., 2014). A su vez, miR-92a regula los niveles de la subunidad GluR1 del receptor AMPA, es decir una de las subunidades más preponderantes en el hipocampo (Letellier y cols., 2014). Más aún, el gen del miR-92 forma parte de tres clúster altamente conservados en vertebrados e invertebrados que incluye los genes de miR-17~92 (cromosoma 13, miR-92-1) y el miR-106a~363 (cromosoma X, miR-92a-2) con secuencia idéntica, y adicionalmente comparte la secuencia semilla con el miARN del clúster miR-106b~25 (cromosoma 7, miR-25) (Concepcion y cols., 2012) **(Ver Anexo Fig. II)**.

De acuerdo a estos antecedentes, es relevante dilucidar si los miARNs miR-132, 134, 138, miR-485 y en particular el miR-92a, cambian sus niveles en respuesta a estrés agudo y/o crónico en hipocampo, y, de ser así, determinar si estarían modulando mecanismos neuroplásticos al tener como blanco los mARNs de proteínas relevantes que participan en dicho proceso **(Fig. 4)**. Este estudio, no sólo es novedoso sino que es relevante para entender cómo se modulan diferencialmente los miARNs *in vivo* en respuesta al estrés en el hipocampo de la rata. Este conocimiento aportará en la comprensión de la misteriosa maquinaria cerebral y específicamente cómo se beneficia o afecta por el estrés, afección tan frecuente del siglo XXI.

En resumen:

- ✓ El estrés modula procesos de neuroplasticidad a través de un alza en los niveles de GCs
- ✓ Los GCs median procesos de neuroplasticidad mediante acciones genómicas y/o no genómicas comandadas por sus receptores
- ✓ El hipocampo es la estructura cerebral más plástica y sensible al estrés debido a su alta expresión de GR y MR
- ✓ Los procesos neuroplásticos a nivel hipocampal están asociados a procesos cognitivos como memoria y aprendizaje.
- ✓ La LTP inducida por Glu podría explicar el proceso de formación y mantención de memoria
- ✓ Para mantener las sinapsis excitadoras es necesario la síntesis de proteínas a nivel local
- ✓ Los miARNs tienen como función silenciar el mRNA y regular la expresión génica al modular la traducción de transcritos de forma rápida y dinámica.
- ✓ Los miARNs han sido ampliamente reportados por su rol en importantes procesos de neuroplasticidad asociados a formación de memoria y en neuropatologías.
- ✓ MiR-92a, altamente conservado, tiene un rol relevante en sistema nervioso, específicamente en el hipocampo. Además posee destacados blancos asociados a procesos de aprendizaje, memoria y remodelamiento sináptico.

2.0 HIPÓTESIS

“Los miR-132, 134 y 138 asociados a plasticidad estructural y los miR-92a y 485 que regulan la sinapsis excitadoras, cambian diferencialmente sus niveles en el hipocampo de rata en respuesta a estrés por restricción de movimiento”.

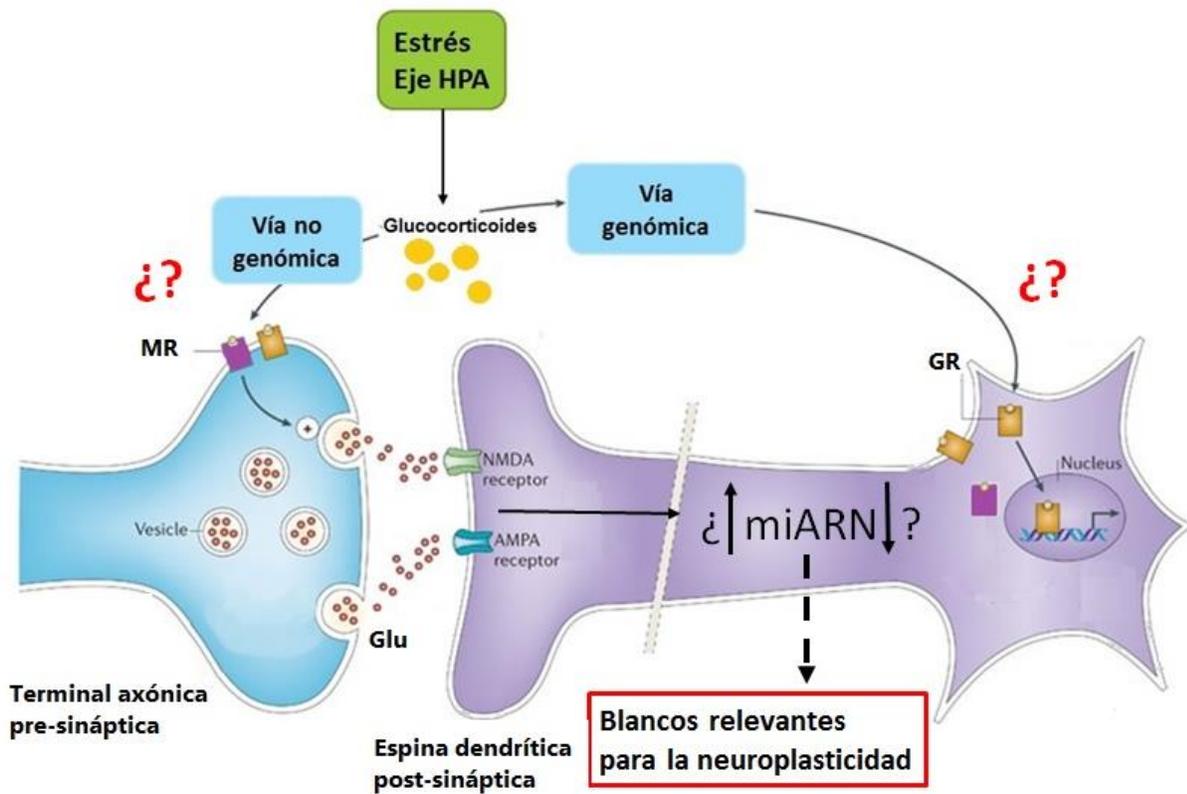


Figura 4. Diagrama modelo propuesto: Regulación de los niveles de miARNs por la acción de GCs. De izquierda a derecha, se ilustra la vía no genómica, donde los GCs (mediador del estrés) se unen a sus receptores de membrana pre-sinápticos MR (morado) o GR (café) estimulando la exocitosis de Glu, lo cual podría modular indirectamente la transcripción y/o procesamiento de los miARNs. Por otro lado, también se ilustra la acción clásica de GCs (genómica), los cuales al unirse a sus receptores citosólicos MR y GR ingresan al núcleo reprimiendo o activando la transcripción de ciertos genes. De este modo, podrían estar modulando directa o indirectamente los niveles de ciertos miARNs y de transcritos de relevancia en procesos de neuroplasticidad que a su vez pueden ser inhibidos traduccionalmente por la acción de estos miARNs. Modificado de Popoli y cols., 2012.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar *in vivo* si el estrés por restricción de movimiento, mediado por CORT, promueve cambios en los niveles de miR-132, miR-134 y miR-138 asociados a plasticidad estructural y, particularmente de los miR-92a y miR-485 relacionados a la funcionalidad de las sinapsis excitadoras en el hipocampo de rata.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar si el estrés agudo y crónico produce cambios diferenciales en los niveles de los miR-132, miR-134, miR-138 , miR-92a y miR-485 en hipocampo de rata mediante qPCR.
2. Determinar si existe una relación de causalidad entre las variaciones de los miR-92a y miR-485 con los niveles de CORT.
3. Determinar blancos putativos de miR-92a mediante un estudio *in silico*.
4. Evaluar el efecto de miR-92a sobre sus blancos putativos mediante ensayos de reportero de luciferasa en células que expresan altos niveles de este miARN.

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 REACTIVOS, SOFTWARE Y EQUIPOS

4.1.1 Reactivos Generales

Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE.UU): SYBR Green QPCR Master Mix

Biotium (Hayward, CA, EE.UU): GelRed

Maestrogene (Las Vegas, NV, EE.UU): MaestroSafe

Merck (Darmstadt, Alemania): CaCl₂, KCl, KOH, MnCl₂, MOPS, NaCl, etanol absoluto (p.a), glicerol, isopropanol (p.a), Tween 20

Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE.UU): HEPES

Winkler (Santiago, Chile): Agua libre de nucleasas

4.1.2 Soluciones y medios de cultivo

Gibco (Carlsbad, CA, EE.UU): Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (DMEM), medio Luria-Bertani (LB), penicilina, estreptomycin, agarosa ultra pura

Hyclone (Cramlington, ND, UK): Suero bovino fetal (10%)

US Biological (Salem, MA, EE.UU): Ampicilina

4.1.3 Sistemas comerciales y oligonucleótidos

Enzo Life Science (Farmingdale, NY, EE.UU): Ensayo inmunoenzimático para CORT

IDT (Coralville, IA, EE.UU): Oligonucleótidos

Macheny-Nagel (Bethlehem, PA, EE.UU): NucleoBond® Xtra Midi

New England Biolabs (Ipswich, MA, EE.UU): Enzima de restricción HindIII, T4 polinucleótido quinasa,

ADN ligasa del fago T4

Promega (Madison, WI, EE.UU): Tampón de lisis, Kit Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System, plasmidio pmirGLO

Qiagen (Venlo, Limburg, Países Bajos): QIAzol Lysis Reagent, RNeasy MinElute Cleanup Kit, RNeasy Mini Kit, Kit miScript II RT, partidor universal 10x, partidores específicos 10x

Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU): Enzimas de restricción SacI, XbaI, NotI, estándar de carga 100bp y 1 kb

4.1.4 Equipamiento

Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE.UU): Termociclador Stratagene Mx3000P

Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU): Nanodrop

MJ Research Inc. (St. Bruno, QC, Canada): PTC-100

NuAire (Plymouth, MN, EE.UU): Incubador de flujo continuo de CO₂ AutoFlow 8500 Water Jacket

Promega (Madison, WI, EE.UU): Equipo de luminiscencia Glomax 96 Microplate Luminometer

4.1.5 Software

Ingenuity Systems (Redwood City, CA, USA): Ingenuity Pathway Analysis software

GraphPad Software Incorporated (La Jolla, CA, EE.UU): GraphPadPrisma versión 6.0

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Düsseldorf, Alemania): G-Power 3.1

4.2 Animales: manejo y modelos experimentales

Se trabajó con ratas *Sprague Dawley* macho adultas de 2 meses de edad, con un peso cercano a los 300 g para iniciar los experimentos. Las ratas fueron criadas en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile en condiciones estandarizadas de ciclo luz-oscuridad de 12 h, para no alterar su ciclo circadiano normal, a una temperatura de $\pm 22^{\circ}\text{C}$ y con una humedad de 45%. Los animales tuvieron libre disponibilidad de agua y alimentos. Fueron pesados

diariamente por una semana previa al comienzo de la experimentación, para habituarlos a la manipulación humana.

Las sesiones de restricción de movimiento se realizaron durante la mañana (entre 9:00 AM y 12:00 PM) para trabajar en un periodo en que se secretan mínimos niveles de CORT (Atkinson y cols., 1997). El procedimiento fue aprobado por el comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

4.3 Estrés Agudo

Los animales se dividieron en dos grupos experimentales: grupo control y estrés agudo. Como modelo de estrés agudo se utilizó el procedimiento de restricción de movimiento, el cual consiste en mantener a los animales en tubos de Plexiglas (25 x 8 cm) para restringir su capacidad de movimiento, sin inmovilizarlos completamente. Este procedimiento se realizó de acuerdo a lo estandarizado previamente en el laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética (Ulloa y cols., 2010), correspondiente a una sola sesión de 0,5 y/o 2,5 h, tiempo durante el cual los animales no tuvieron acceso a agua ni a comida. Posteriormente, los animales se eutanasiaron por guillotina a distintos tiempos durante y después del protocolo de estrés: a 0,5 h (E 0,5) y 2,5 h (E 2,5) de haberlos introducidos al tubo; y 6 h (PE 6) y 24 h (PE 24) posterior al término de la sesión de estrés para evaluar los efectos del estrés agudo a corto plazo (**Fig. 5**).

Durante este procedimiento, se realizó la cuantificación de ciertos parámetros fisiológicos para verificar el estrés en dichos animales. Para esto, se cuantificó el número de heces defecados por los animales durante la sesión de estrés a modo de verificar la activación vagal producto del estrés (Nakade y cols., 2007; Nakade y cols., 2007). Al momento de la decapitación, se recolectó una muestra de sangre en un tubo falcón sin anticoagulante para obtener una fracción de suero para la determinación de CORT. Por otro lado, se disecó rápidamente en condiciones estériles y libres de nucleasas el hipocampo del cerebro del animal y se congeló en nitrógeno líquido para almacenarlo a -80°C hasta su utilización.

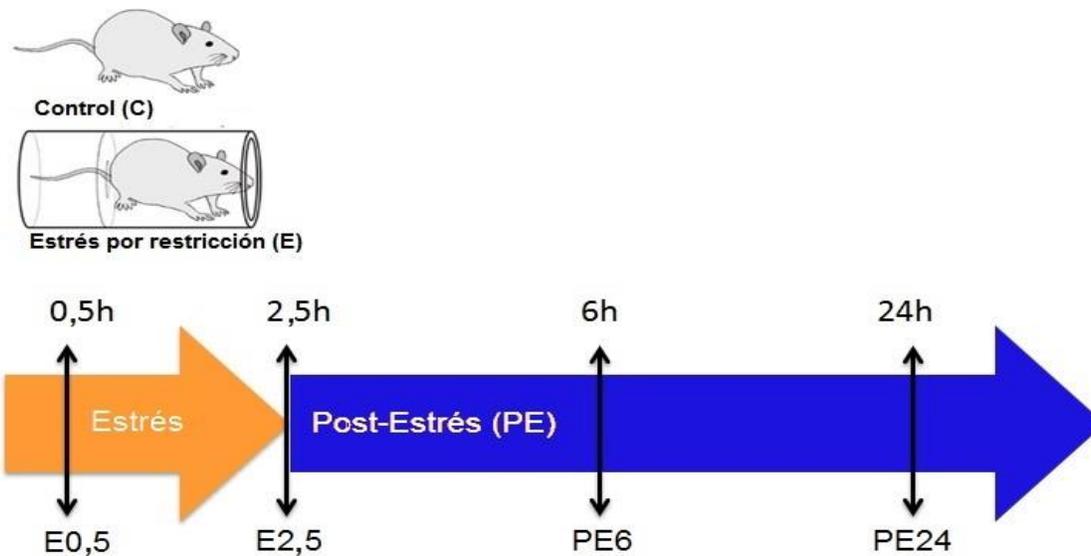


Figura 5. Modelo experimental de estrés agudo por restricción de movimiento. Se trabajó con ratas macho adultas (2 meses) Sprague Dawley. Se establecieron distintos grupos experimentales: grupo control (**C**) que corresponde a animales que no fueron sometido a estrés; (**E 0,5**) grupo que fue sometido a estrés por restricción de movimiento durante 0,5 h; y (**E 2,5**) grupo sometido a estrés durante 2,5 h. (**E 0,5**) y (**E 2,5**) fueron sacrificados inmediatamente finalizado el período de estrés. Para evaluar variaciones a corto plazo en respuesta al estrés agudo, se adicionó el grupo (**PE 6**) donde los animales fueron estresados durante 2,5 h, siendo sacrificados 6 h y (**PE 24**) 24h posteriores al evento de estrés. El grupo control fue sacrificado de forma independiente y aislada.

4.4 Determinación de los niveles séricos de corticosterona

La muestra de sangre se centrifugó a 4000 x g durante 15 minutos. El suero obtenido se almacenó en un refrigerador a -20° C para la determinación cuantitativa de los niveles séricos de CORT mediante un ensayo inmunoenzimático (Enzo Life Science) con un rango de detección de 32 - 20,000 pg/mL. Se realizó la dilución de los estándares de la hormona (32, 160, 800, 4000, 20000 pg/mL) y de las muestras (1:40) en el amortiguador proporcionado por el fabricante. A continuación, se agregó 100 µL de las diluciones en una placa de 96 pocillos, recubierta con un anticuerpo (anti oveja Ig G) que reconoce al anticuerpo que une específicamente a la CORT (preparado en cabra). A continuación, se agregaron 50 µL de CORT conjugada a fosfatasa alcalina, la cual compite con la hormona presente tanto en las muestras como en los estándares por la unión al anticuerpo que reconoce a la CORT presente en la placa. Posteriormente, se adicionaron a todos los pocillos, excepto al blanco y al que determina la unión

no específica, 50 μL de un anticuerpo policlonal que reacciona contra la CORT libre (conjugada y no conjugada). Se incubó durante dos h a temperatura ambiente con agitación suave y luego de tres lavados con 400 μL de un amortiguador provisto por el fabricante, se agregó el sustrato de la fosfatasa alcalina (p-nitrofenilfosfato) el cual genera un producto de color amarillo (p-nitrofenol). Luego de una hora se detuvo la reacción mediante la adición de una solución provista por el fabricante y se determinó la absorbancia del producto coloreado a 405 nm en un lector de placa (Expert 96, Asys Hitech, Augendorf, Austria). La lectura de la absorbancia de la curva estándar se usó para calcular la concentración de CORT en los sueros de los animales.

4.5 Estrés crónico

En este modelo, los animales son sometidos a estrés por restricción de movimiento diariamente por 14 días, el cual ha sido validado en nuestro laboratorio (Ulloa y cols., 2010). Este protocolo consiste en introducir a la rata en un tubo de Plexiglas (25 x 8 cm) 2,5 h al día, durante 14 días consecutivos, siendo eutanasiados 24 h posterior a la última sesión de estrés (**Fig. 6**). Los animales estresados crónicamente muestran una baja en la tasa de ganancia de peso y un aumento en la masa de las glándulas adrenales por hiperactivación del eje HHA (Dhabhar y cols., 1997; Ulloa y cols., 2010), por lo que estos parámetros fueron evaluados como indicadores de estrés (**Ver Anexo Fig. III**).

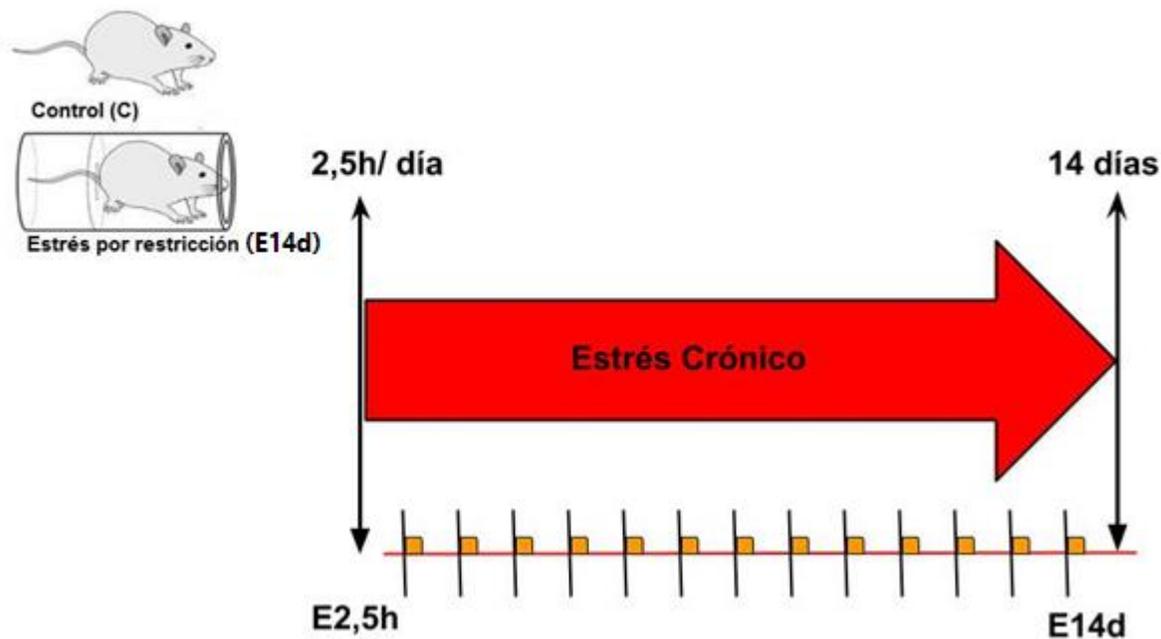


Figura 6. Modelo experimental de estrés crónico por restricción de movimiento. Se trabajó con ratas macho adultas (2 meses) Sprague Dawley. Se establecieron dos grupos experimentales: grupo control **(C)** que no fue sometido a estrés, y **(E14d)** grupo de estrés crónico, el cual fue sometido a 2,5 h de estrés por restricción de movimiento diariamente durante 14 días. Luego de 24 h de la última sesión de estrés, los animales fueron sacrificados. El grupo control, no estresado, fue sacrificado de forma independiente y aislada.

4.6 Adrenalectomía

Este modelo consta de un procedimiento quirúrgico, el cual requiere que los animales sean anestesiados para llevarse a cabo. Se utilizó isofluorano al 2,5% v/v, con flujo de aire de 0,5 L/min durante 4 min. Una vez verificado que el animal se encontrase anestesiado, se bajó el flujo a 2% v/v y se procedió a realizar la extirpación de ambas glándulas suprarrenales por abordaje dorsal (Bravo y cols., 2006). La anestesia se mantuvo en un 2% v/v hasta el inicio de la sutura y luego se bajó a un flujo de 1,5% v/v hasta el final de la operación. Estos animales ADX se mantuvieron con alimento y agua a libre disposición; sin embargo, se les dispuso como agua de bebida una solución salina de cloruro de sodio 0,9% (NaCl 0,9%), para reponer el sodio debido a que con la remoción de las glándulas adrenales se pierde la secreción de la hormona aldosterona. Como control de los efectos pre y post-operatorios se procedió a realizar operaciones simuladas al grupo control *sham* (S), procediendo de igual forma que en los otros animales,

pero sin remover las glándulas adrenales. Tras la operación a todos los animales se les administró naproxeno (0,1 mL 1%/Kg). Luego de 24 h post-ADX, se inyectó CORT (10 mg/Kg, vía i.p.) o vehículo, y los animales se sacrificaron a distintos tiempos post-inyección: 0,5 h (ADX-CORT 30 min); 2,5 h (ADX-CORT 2,5h); 6 h (ADX-CORT 6h) y 24 h (ADX-CORT 24h) posteriores a la administración de CORT. A otro grupo de animales ADX se les inyectó el antagonista de los receptores NMDA de Glu (MK801) (0,1 mg/Kg) y luego de 30 min se les inyectó CORT (10 mg/Kg) (ADX-CORT-MK801). Estos animales se sacrificaron inmediatamente después de transcurridos los 30 min luego de la administración de CORT (**Fig. 7**).

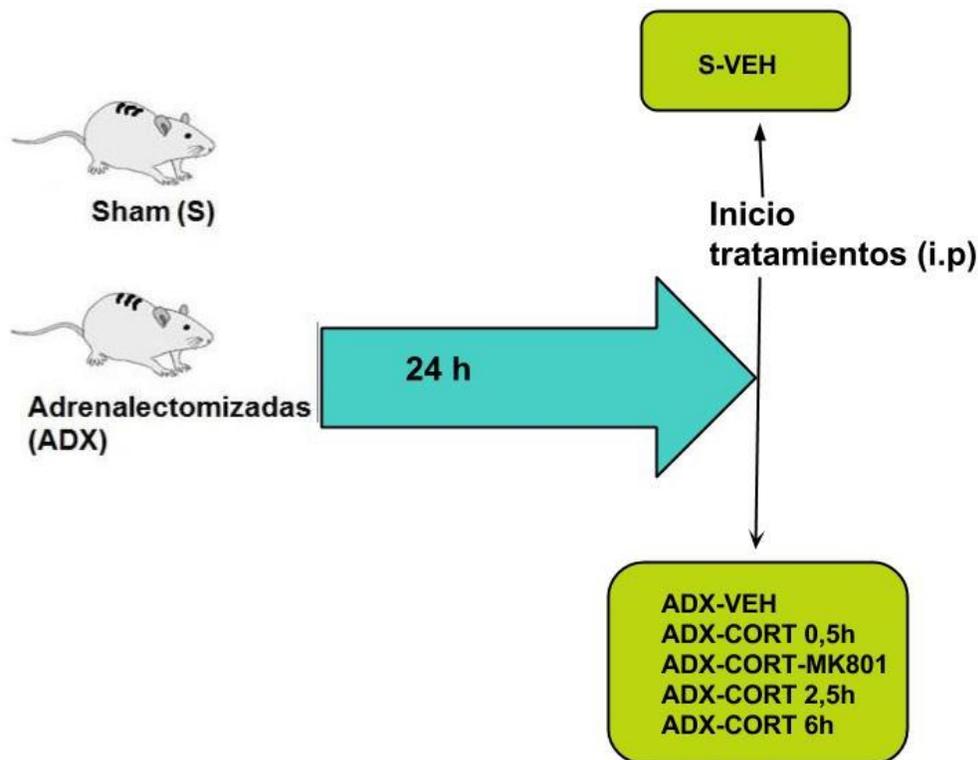


Figura 7. Modelo experimental de adrenalectomía. Se trabajó con ratas machos adultos (2 meses) Sprague Dawley. Se establecieron dos grupos experimentales: grupo *sham* (**S**) en el cual se simuló la operación de remoción de las glándulas adrenales y el grupo (**ADX**) al cual luego de 24 h se le realizaron tres tratamientos vía i.p. i) Inyección de vehículo (**ADX-VEH**), ii) Inyección de CORT (10 mg/Kg) sacrificándose los animales a las 0,5 h (**ADX-CORT 0,5h**), 2,5 h (**ADX-CORT 2,5h**) y 6 h posterior a su administración (**ADX-CORT 6h**). iii) Inyección de el antagonista no competitivo de NMDA (MK801 0,1 mg/Kg) (**ADX-CORT-MK801**) y transcurrido 0,5h se administró CORT (10 mg/Kg.) para finalmente ser sacrificados 0,5 h después. Al grupo (S) solamente se le administró solución salina (S-VEH).

4.7 Extracción de ARN y PCR cuantitativo

4.71 Extracción ARN menores a 200 nt

Para la obtención de ARN, el tejido hipocampal fue inmerso en una solución comercial QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) la cual se utilizó para homogeneizar y lisar el tejido mediante Ultraturax en hielo. Con el fin de optimizar el análisis de los miARNs, se obtuvieron por separado fracciones enriquecidas de ARN mayores y menores a 200 nt. Para esto se utilizaron dos sistemas comerciales en base a unión selectiva del ARN a una membrana de sílice. El primero permite la concentración de ARNs menores de 200 nt (RNeasy MinElute Cleanup Kit, Qiagen) y el segundo concentra aquellos ARNs mayores a 200 nt (RNeasy Mini Kit, Qiagen,). La extracción de cada fracción se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La integridad de ambas fracciones enriquecidas de ARN (mayores y menores a 200 nt) fue evaluada mediante un gel desnaturante de agarosa en tampón MOPS y su cuantificación se realizó mediante el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific). Se procedió de igual forma para realizar la extracción de ARN de células humanas embrionarias de riñón 293T (HEK293T).

4.72 Transcripción inversa de ARNs menores a 200 nt

Se realizó una transcripción inversa de la fracción enriquecida de ARN menores a 200 nt, con 100 ng de ARN, empleando el sistema comercial miScript II RT (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la retrotranscripción de los miARNs se realizó una poliadenilación del ARN en forma paralela a la transcripción inversa donde se utilizó como partidador un oligo dT adherido a un adaptador universal el cual se unirá al extremo 3' poliadenilado para generar el cADN y facilitar su posterior amplificación por qPCR. El perfil térmico de la RT-PCR para los ARNs menores de 200 nt fue de 37°C durante 1 h, 95°C durante 5 min y 4°C durante 5 min. La RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., St), obteniendo una concentración de 5000 pg/ μ L por muestra de las cuales se guardaron alícuotas de 1 μ L a -80°C hasta su utilización.

4.73 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Se diluyó la alícuota de cADN (5000 pg/ μ L) en H₂O libre de nucleasas a una concentración final de 26,7 pg/ μ L, de la cual se tomaron 7,5 μ L (200 pg de cADN), 12,5 μ L de Brilliant II ultra rápido SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies); 2,5 μ L de partidor universal 10X (Qiagen); 2,5 μ L de partidor específico 1X (Qiagen) (**Tabla 1**) en un volumen final de 25 μ L. A continuación se procedió a realizar la qPCR en el termociclador Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies). Cada reacción se realizó en duplicado de acuerdo al siguiente programa: 95° C 15 min, seguido de 40 ciclos a 94° C 15 seg. 55° C 15 seg. y 70° C 15 seg. La curva de disociación se realizó inmediatamente después, según el programa: 95° C 15 seg., 25° C 1 seg., 70° C 15 seg., y 95° C 1 seg.

La abundancia relativa de estos miARNs fue normalizada contra los niveles de los ARN pequeños nucleolares (SNOARNs) con los partidores SNORD95, SNORD96A y U6 (Qiagen). Se realizaron curvas de calibración de todos los partidores utilizados a partir de diluciones seriadas de una mezcla de cADN con el objeto de determinar la linealidad de la amplificación y además determinar la eficiencia de la amplificación que se utiliza para corregir los datos (**Ver Anexo Fig. IV**). No obstante, se trabajó solo con SNORD95 ya que mostró una mejor correlación lineal entre la concentración del cADN con el Ct en comparación a SNORD96 y U6 en el modelo utilizado. Una vez terminada cada qPCR se realizó una curva de disociación, donde se observó la aparición de un solo amplicón. Los niveles relativos del miARN del gen se calcularon con el $\Delta\Delta$ CT para cada miARN, normalizados con el mARN del gen de los SNOARNs.

Todas las reacciones incluyeron el uso de agua en vez de templado como control negativo. Todas las cuantificaciones se realizaron en duplicado técnico. Los productos de qPCR fueron evaluados por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed (Biotium), una tinción para ácidos nucleicos.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la cuantificación de miARNs.

Partidor	Secuencia 5'->3'	Código nº	Eficiencia
miR-132-3p	UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG	MS00000357	95.1%
miR-134-5p	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	MS00000364	90.1%
miR-138-5p	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	MS00005628	83.4%
miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUG	MS00033656	89,5%
miR-485-5p	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC	MS00001127	86,8%
SNORD95	Desconocida	MS00033726	91.7%
SNORD96A	Desconocida	MS00033733	93.8%
U6 (RNU6-2)	Desconocida	218193	89,9%

4.8 Predicción de blancos 3'UTR para miR-92a

Los blancos fueron predichos por diferentes herramientas bioinformáticas, tales como Target Scan 4.2 (<http://www.targetscan.org/>, publicado en abril 2008) (Lewis y cols., 2005), miRanda (<http://www.microARN.org/microARN/home.do>, publicado en septiembre 2008)(John y cols., 2004), miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>, publicado en octubre 2011) (Dweep y cols., 2011), miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>, publicado en 2010)(Hsu y cols., 2014) y Starbase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>, publicado en 2010) (Yang y cols., 2011; Li y cols., 2014). De todos los blancos encontrados para miR-92a, se filtraron 20 a partir de los siguientes criterios: promedio bioinformático de características a favor o “*context score*”, coincidencia entre bases de datos, especificidad de tejido (cerebro, específicamente hipocampo) y relevancia de la proteína codificada en procesos de neuroplasticidad (Dweep y cols., 2013). De estos, finalmente se seleccionaron los 4 mejores para ser evaluados por ensayo de reportero de luciferasa.

Para los análisis de función/ categoría en el organismo completo y en vías de señalización específicas del sistema nervioso asociadas a miR-92a, se utilizó el programa comercial Ingenuity Pathway Analysis software (Ingenuity Systems), para generar un análisis integral de la transcriptómica y proteómica disponible en bases de datos. Estos análisis fueron realizados con el asesoramiento bioinformático de Xiaojiang Xu, asociado al grupo del Dr. Cidlowski (NIH/NIEHS).

4.9 Clonación en plásmido pmirGLO

4.91 Hibridación de oligonucleótidos que contienen secuencia semilla

Se diseñaron oligonucleótidos (IDT) a partir de la secuencia 3'UTR de mRNA de *Rattus norvegicus* (NCBI) para los 20 blancos. A partir de cada blanco se sintetizaron tanto la hebra sentido como la hebra antisentido, de los cuales se evaluaron blancos, correspondientes a KCC2, MEF2D, el factor transcripcional silenciador de RE-1 (REST) y la acetiltransferasa K isoforma 2B (KAT2B) para proceder a la clonación (**Tabla 2**). Cada oligonucleótido consta de la secuencia semilla exacta (8pb) para el miR-92a, flanqueado por aproximadamente 20 pb adicionales en cada sentido respectivo a cada mRNA. Para dirigir la orientación durante la clonación, se incluyeron los sitios de corte para las enzimas SacI y XbaI (Thermo Scientific). Adicionalmente, como sitio de control interno de clonación se incorporó el sitio de corte para NotI (Thermo Scientific). Estos oligonucleótidos se resuspendieron en agua libre de nucleasas (Winkler). Se realizó el protocolo de hibridación entre los oligonucleótidos sentido y antisentido, se diluyeron a 0,1 nmol/ μ L (100 μ M), de los cuales se tomaron 5 μ L de cada uno y 40 μ L de tampón de hibridación (Hepes 50mM, KOH 50mM, NaCl 100mM a pH 7,4), el cual fue preparado con antelación. La solución se colocó en un baño termoregulado con agua a 90°C y se dejó enfriar hasta 40°C.

4.92 Fosforilación de ADN doble hebra

Se procedió a fosforilar los oligonucleótidos hibridados tomando 5 μ L de éstos, 2 μ L de tampón de la T4 ligasa (New England Biolabs), 1 μ L de T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs) y 2 μ L de agua

libre de nucleasas (Winkler). Se incubó 30 min a 37°C y la reacción se finalizó por inactivación de la enzima durante 20 min a 70°C.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la generación de sitios blanco de miR-92 en vector pmirGLO.

mARN blanco	Secuencia 5'→3'	Orientación
KCC2	CCTGCGGCCGCGTGCTCCAT GTGCAATA TTTGTTATGAAT	Sentido
KCC2	CTAGATTCATAACAAATATTGCACATGGAGCACGCGGCCGCAGGAGCT	Antisentido
REST: X2,X3	CAAGCGGCCGCACCTTTACA GTGCAATA TGTGTTACTTTT	Sentido
REST: X2,X3	CTAGAAAAGTAACACATATTGCACTGTAAAGGTGCGGCCGCTTGAGCT	Antisentido
KAT2B: X1	CCTGCGGCCGCTATAGATATT GTGCAATA AAGCAGAAGTT	Sentido
KAT2B: X1	CTAGAACTTCTGCTTTATTGCACAATATCTATAGCGGCCGCAGGAGCT	Antisentido
MEF2D: X2	CTAGCGGCCGCAGATGTACA GTGCAATA AGCGCCCCATCCT	Sentido
MEF2D: X2	CTAGAGGATGGGGCGCTATTGCACTGTACATCTGCGGCCGCTAGAGCT	Antisentido

Detalle del mARN blanco para miR-92a y sus variantes de *splicing* que contengan el sitio semilla (rojo) para este miARN. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la clonación en el vector pmirGLO. Se muestra en rojo en la hebra sentido la secuencia semilla de 8 pb de miR-92a respectivamente.

Para la ligación, se utilizaron 100 ng de vector pmirGLO (Promega) (**Ver Anexo Fig. V**) doblemente digerido con las enzimas *SacI* y *XbaI* (Thermo Scientific). Se tomaron 5 µL de oligonucleótidos doble hebra fosforilados, 2 µL del tampón de la ADN ligasa del fago T4 (New England Biolabs), 1µL de ADN ligasa del fago T4 (New England Biolabs) y 1 µL de agua libre de nucleasas (Winkler) y se incubó toda la noche a 4°C y luego 1 h a temperatura ambiente.

4.93 Preparación de bacterias competentes

Se seleccionaron varias colonias de bacterias *Escherichia coli* DH5α y se inocularon en 100 mL de LB. Se incubaron a 37°C con agitación, hasta llegar a una OD₆₀₀ de entre 0,6-0,8 (donde se encuentra la fase

exponencial de crecimiento de las bacterias). Se tomaron 100 μ L de este cultivo y se inocularon nuevamente en 100 mL de LB, hasta alcanzar nuevamente una OD_{600} entre 0,6-0,8, se distribuyó en dos tubos falcon estériles de 50 mL y se centrifugó a 10 min a 1800 xg a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 2 mL de la solución TFBI (acetato de potasio 30 mM, $MnCl_2 \times 4H_2O$ 50 mM, $CaCl_2$ 10 mM, KCl 100 mM, glicerol (87%) 15%, pH 5,8) y se dejó en hielo por 10 min. A continuación, se centrifugó nuevamente a 1800 xg durante 10 min a 4°C y se resuspendió en 1 mL de TBFII (MOPS 10 mM, $CaCl_2$ 75 mM, KCl 10 mM y glicerol (87%) 15%, pH 7,0). Las bacterias se separaron en alícuotas de 100 μ L en tubos Eppendorf, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

4.94 Transformación de bacterias

Las bacterias DH5 α quimiocompetentes (facilitadas por el laboratorio de Virología, Facultad de Medicina) se descongelaron a 4°C y se tomaron 50 μ L de bacterias que se mezclaron con 10 μ L de la reacción de ligación. La mezcla se incubó durante 30 min a 4°C, luego durante 45 seg a 43°C y finalmente 2 min a 4°C. Posteriormente, las bacterias se sembraron en placas de 100 mm con agar/medio Luria-Bertani (LB) (Gibco) con antibiótico ampicilina (US Biological) 0,1mg/mL y se dejó toda la noche en un incubador a 37°C.

4.96 Purificación del ADN plasmidial

Se seleccionaron y picaron las colonias positivas en 3 mL de medio LB en tubos falcon de 15 mL y se mantuvieron a 37°C durante la noche con agitación. A partir de este inóculo, se tomaron 2 mL de cada clon para purificar el ADN plasmidial por medio de lisis alcalina utilizando un protocolo adaptado del sistema comercial NucleoBond® Xtra Midi (Macheney-Nagel) donde no se utilizó la columna de purificación sino solamente las soluciones. El lisado se centrifugó a 2370 x g 10 min y el sedimento obtenido fue resuspendido utilizando 200 μ L del tampón de resuspensión RES en presencia de ARNasa (1mg/reacción), posteriormente se agregó 200 μ L del tampón LYS y se dejó actuar durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se añadieron 200 μ L de tampón de neutralización NEU y se mezcló por

inversión diez veces para finalmente centrifugar 10 min a 9500 xg. Paralelamente, se agregaron 300 μ L de isopropanol en tubos eppendorf de 1,7 mL, para luego adicionar 600 μ L de sobrenadante de las muestras, se mezcló por vortex y se centrifugó a 16060 xg por 20 min. Una vez transcurrido el tiempo, se descartó el sobrenadante y se agregó 500 μ L de etanol al 70%, se volvió a centrifugar a 16060 xg 5 min. Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas, obteniendo los plasmidios purificados. Para confirmar la presencia del inserto en el plasmidio, se realizó una digestión con la enzima NotI (Thermo Scientific) de acuerdo al protocolo del proveedor para producir la liberación del inserto. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con 0,5 μ L de ribonucleasa A de páncreas bovino (Sigma) y se analizaron directamente en un gel al 1% de agarosa en tampón TAE 1X pH 8,0. A su vez, se cargaron 5 μ L de los estándares de 100 y 1000 pb (Thermo Scientific) en el gel y las bandas se resolvieron mediante electroforesis a 90 volt 45 min. Como tinción del ADN se utilizó el agente intercalante MaestroSafe (Maestrogen). El inserto liberado de aproximadamente 140 pb fue visualizado mediante un transiluminador UV. Se realizaron controles negativos (agua) en cada etapa, además se utilizaron como controles del plasmidio el vector pmirGLO comercial como se visualiza en la Fig. 8 en el tercer carril, el vector pmirGLO linealizado con la enzima NotI, en el cuarto carril (Thermo Scientific) y doblemente digerido con HindIII, en el quinto carril (New England Biolabs) (Fig. 8).

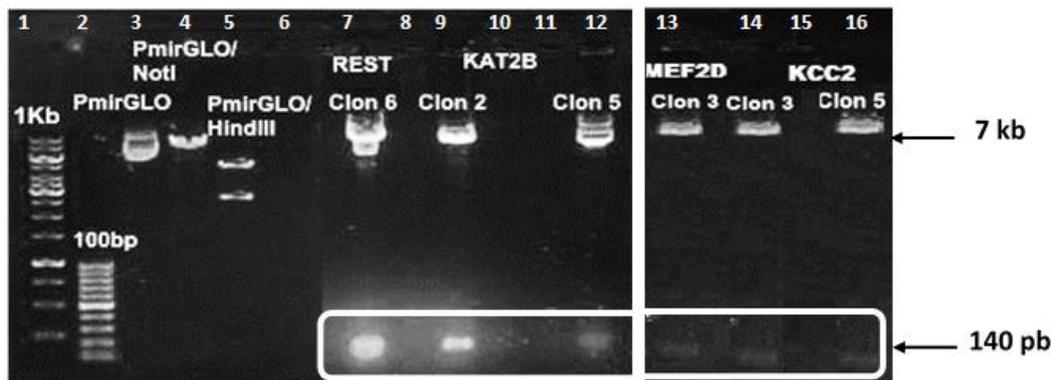


Figura 8. Verificación de sitio interno de clonamiento (Not I) en reportero de luciferasa para determinar actividad de miARNs. Plasmidios clonados con los sitios semilla del mRNA de: REST, KAT2B, MEF2D y KCC2 en gel de agarosa al 1%. Carril 1: Ladder 1 Kb, carril 2: Ladder 100 bp, carril 3: Vector pmirGLO, carril 4: Vector pmirGLO digerido con la enzima NotI (un sitio de corte), Carril 5: Vector pmirGLO digerido con la enzima HindIII (dos sitios de corte). En los siguientes carriles se evaluaron las respectivas colonias positivas para: REST (carril 7), KAT2B (carril 9 y 12), MEF2D (carril 13) y KCC2 (carril 14 y 16) Se observó la liberación del fragmento esperado de aproximadamente 140 pb, producto del inserto que poseía un sitio adicional NotI como control interno de clonación.

Secuenciación

Con el propósito de verificar los resultados de la clonación de los oligonucleótidos, se secuenciaron los plasmidios purificados obtenidos de la transformación de las bacterias quimiocompetentes. Los plasmidios fueron purificados con el sistema comercial NucleoBond® Xtra Midi (Macheny-Nagel) como se describió anteriormente, pero esta vez incluyendo la purificación por columna de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se prepararon alícuotas de 40 µL (50 ng/µL) de cada clon, se resuspendieron los partidores diseñados específicamente para el vector pmirGLO (10 µM) en agua libre de nucleasas (Winkler) (Sentido 5'->3' CCG CGA GAT TCT CAT TAA GGC y Antisentido 5'->3' GCT TCC TTT CGG GCT TTG T) y se enviaron a la Unidad Secuenciación Automática de ADN, Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. En la Fig. 9 se muestra el detalle del electroferograma 5'->3' para el plasmidio con el inserto del mRNA de REST y la comparación entre las secuencias del inserto diseñado y del inserto clonado en el plasmidio pmirGLO (**Fig. 9**).

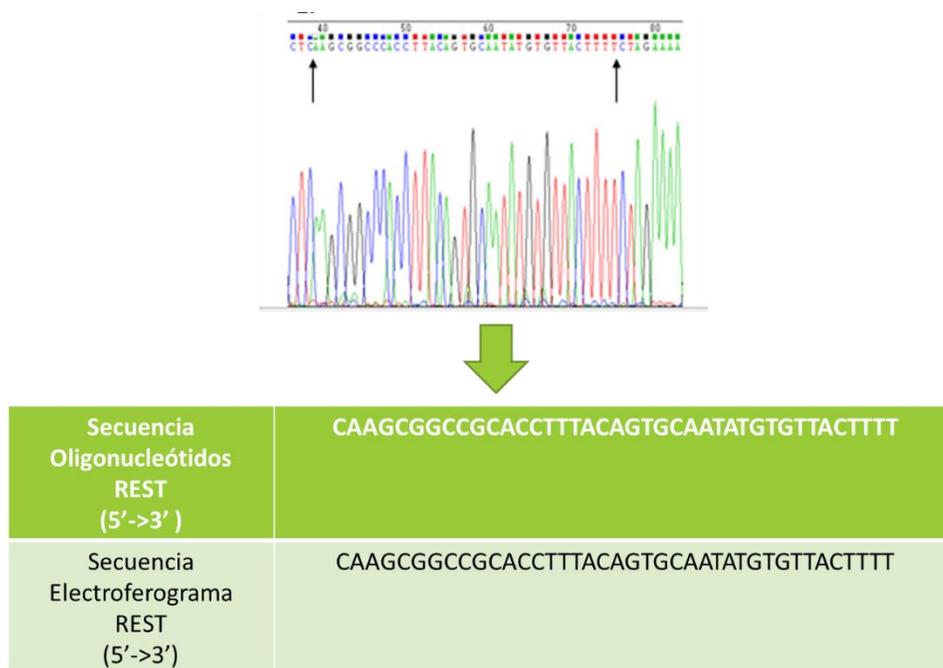


Figura 9. Confirmación de los clones seleccionados por secuenciación. Se muestra el electroferograma de la secuenciación de la hebra sentido del mRNA de REST. La secuencia oligonucleotídica exacta del inserto se delimitó por flechas (negro). A continuación se muestra la comparación entre las secuencias esperada y obtenida tras la clonación. Se secuenciaron tanto la hebra sentido como la antisentido a partir de los partidores descritos en la sección de metodología para todos los plasmidios (KCC2, KAT2B, MEF2D y REST). No se muestran los demás electroferogramas.

5.1 Cultivo de células HEK-293T

Las células HEK293T se mantuvieron en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (DMEM) (Gibco), el cual fue suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Hyclone), 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Gibco) a 37°C y 5% CO₂ en un incubador de flujo continuo (NuAire). Las células se sembraron en placas para cultivo celular recubiertas de 12 pocillos (Thermo Scientific). Se sembró 1 mL a una concentración de 150.000 células/mL y se incubaron hasta que llegarán a confluencia 80-90% ($0,4 \times 10^6$ células adherentes) para posteriormente realizar ensayos de reportero de luciferasa.

5.11 Transfección celular y ensayos de reportero

Con el objeto de realizar la transfección en células HEK293T, en primera instancia se realizó el cultivo de las colonias positivas. Para ello se tomaron 100 µL del cultivo bacteriano anteriormente guardado a 4°C en 100 mL de LB/Amp (0,1mg/mL), y se dejaron creciendo las bacterias durante la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, se centrifugó las bacterias a 1800 xg por 10 min separándolas en dos tubos falcon de 50 mL obteniendo el sedimento que posteriormente fue utilizado para realizar las purificaciones mediante columna de sílice de los plásmidos con el sistema comercial NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel) de acuerdo al protocolo del proveedor. A continuación, se cuantificó la concentración de ADN de las muestras en Nanodrop (Thermo Scientific) y se diluyeron a una concentración de 1000 ng/µL para almacenarlo como stock. Una vez realizado esto, se procedió a transfectar las células HEK293T con Lipofectamine 3000 (Thermo Scientific), de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor. Se estandarizó la curva de luminiscencia a partir de células HEK293T transfectadas con diluciones seriadas del plasmidio pmirGLO (0, 10, 47, 190 y 380 ng) **(Ver Anexo Fig. VI)**. De acuerdo a esto, se optimizó el protocolo para utilizar 25 ng de plasmidio pmirGLO vacío y con el inserto en cada pocillo y las células HEK293T se incubaron por 24 h a 37°C en una incubadora con 5% CO₂ (NuAire).

5.12 Cuantificación de la actividad luciferasa de luciérnaga y renilla

Luego de 24 h post-transfección, se removió el medio de cultivo a las células para luego adicionar 150 μL de tampón de lisis (Promega), el cual se dejó actuar por 3 min, las células se rompieron mecánicamente y el lisado se transfirió a tubos Eppendorff. Para asegurar la lisis, se procedió a mezclar por vórtex y se dispusieron 20 μL de cada muestra en placas blancas de poliestireno (Thermo Scientific) para realizar la cuantificación de la actividad luciferasa y renilla con el sistema comercial Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System (Promega) de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Cada transfección se realizó en cuadruplicado, con $n=3$. Se procedió de forma automatizada utilizando el equipo de luminiscencia Glomax (Promega).

5.2 Análisis Estadístico

Para el análisis, se utilizó el programa computacional estadístico GraphPadPrisma versión 6.0 (GraphPad Software Incorporated). Las muestras se analizaron por el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de comparación múltiple de Dunn's, el test no paramétrico de Mann Whitney y el T-test pareado, todos con un intervalo de confianza del 95%.

El análisis del tamaño muestral y poder estadístico en el caso de los resultados a los cuales no se les pudieron realizar pruebas estadísticas por bajo número experimental. Se procedió mediante el programa G-Power 3.1, efectuando simulaciones de Mann-Whitney de una cola (para datos independientes) al comparar los promedios \pm EEM entre los grupos involucrados, con un poder estadístico del 95% en todos los casos.

6.0 RESULTADOS

En esta memoria se utilizaron tres modelos experimentales donde se determinó si el estrés agudo y crónico modifican diferencialmente los niveles miARNs relevantes en mecanismos neuroplásticos, y si estas modificaciones se producen como consecuencia de la variación en los niveles de GCs.

6.1 PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

6.1.1 Niveles de corticosterona plasmática aumentan en respuesta a estrés agudo

El estímulo de restricción de movimiento activa el eje neuroendocrino HHA, produciendo un rápido aumento en los niveles de las hormonas CRH y ACTH que inducen la liberación de CORT en la corteza suprarrenal, hormona que media la respuesta fisiológica del estrés (Kellendonk y cols., 2002; Di y cols., 2003). Al analizar los valores séricos de CORT mediante test de Kruskal Wallis ($P=0,0028$) se observa que durante la sesión de estrés agudo se produjo un aumento significativo tanto en animales E 0,5 (casi 40 veces mayor) y E 2,5 (sobre 30 veces mayor) en relación al grupo control (**Figura 10A**). Estos niveles se reestablecieron al valor del control a las 6 y 24 h posterior a la sesión de estrés producto de la inhibición del eje HHA que ejerce el ciclo circadiano a esas temporalidades (**Ver Anexo Fig. VII**).

6.1.2 Número de heces aumenta en respuesta a estrés agudo

Se ha documentado que el estrés por restricción de movimiento produce un aumento en la cantidad de heces defecadas por las ratas, debido a la liberación central de CRH, estimulando la vía vagal que inerva el colón, aumentando su motilidad (Nakade y cols., 2007; Nakade y cols., 2007). Es por esto, que la cuantificación de las heces durante la sesión de estrés representa una aproximación no invasiva que permite evaluar el estado de estrés del animal. Se observó que durante la sesión de estrés todas las ratas defecan 4 a 5 veces más, en comparación a las ratas del grupo control. Se observó mediante test de Kruskal Wallis ($P=0,0063$) un aumento significativo en animales E0,5 y más aún en el grupo experimental E2,5 (**Figura 10B**).

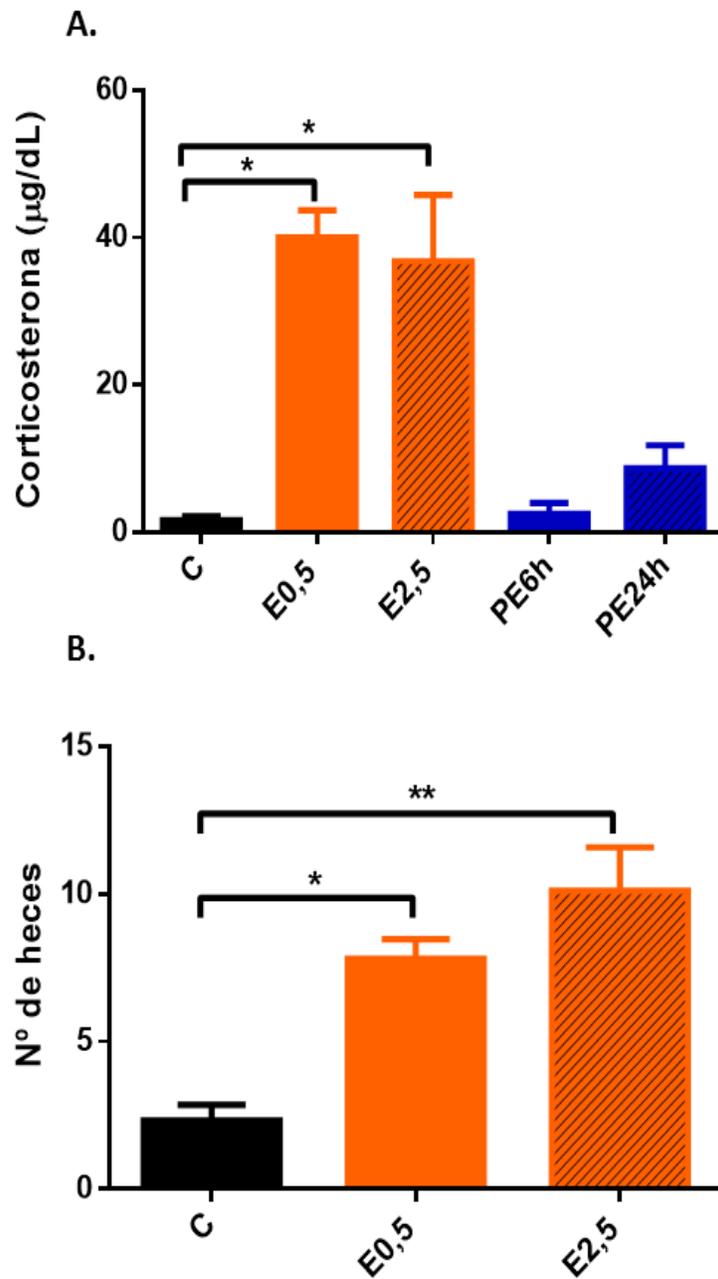


Figura 10. Durante el estrés agudo hay incremento en los niveles séricos de corticosterona y del número de heces. (A) Niveles de CORT sérico inmediatamente posterior a la restricción de 0,5 (E0,5) h y 2,5 h (E2,5) o luego de una recuperación post estrés de 6h (PE6h) y 24 h (PE24h) determinados mediante EIA. Los niveles de CORT aumentan significativamente en E0,5 y E2,5; (n=5, P=0,0028). **(B)** Número de heces cuantificadas durante el período de estrés de E0,5 y E2,5 aumentaron significativamente respecto al control; (n=5, P= 0,0063). Los datos representan el promedio \pm EEM de animales, se analizaron por el test no paramétrico de Kruskal Wallis, con post test de Dunn. *p<0,05; **p<0,01.

6.2 ESTRÉS AGUDO Y CRÓNICO

6.2.1 Efectos del estrés agudo y crónico sobre miARNs que modulan la morfología de espinas dendríticas

Los miR-132, 134 y 138 fueron evaluados debido a su relevancia en procesos de regulación del sistema nervioso reportado por literatura, específicamente implicados en la formación, reducción y/o aumento de espinas dendríticas. Se cuantificaron tanto en estrés agudo como en estrés crónico, de modo de observar cambios a corto y largo plazo en el hipocampo completo de rata. Los animales estresados crónicamente pertenecen a un estudio independiente realizado en el laboratorio donde se comprobó que estos animales evidenciaron cambios asociados a la aplicación de un estresor crónico (aumento tamaño de la glándula adrenal y una reducción en la ganancia del peso) (**Ver Anexo Fig. IIIA y B**).

No se observaron cambios significativos para miR-132 y miR-138 durante el estrés agudo o durante la recuperación del estrés (**Fig. 11 A, C**). Más aún, los niveles de estos miARNs no se modificaron luego de 24 h de la última sesión de estrés crónico para ninguno de estos miARNs (**Fig.11**). Sin embargo, para miR-134 (**Fig. 11B**) se observó mediante test de Kruskal Wallis ($P=0,0298$) un incremento significativo entre las temporalidades de E0,5 y PE24 de estrés agudo.

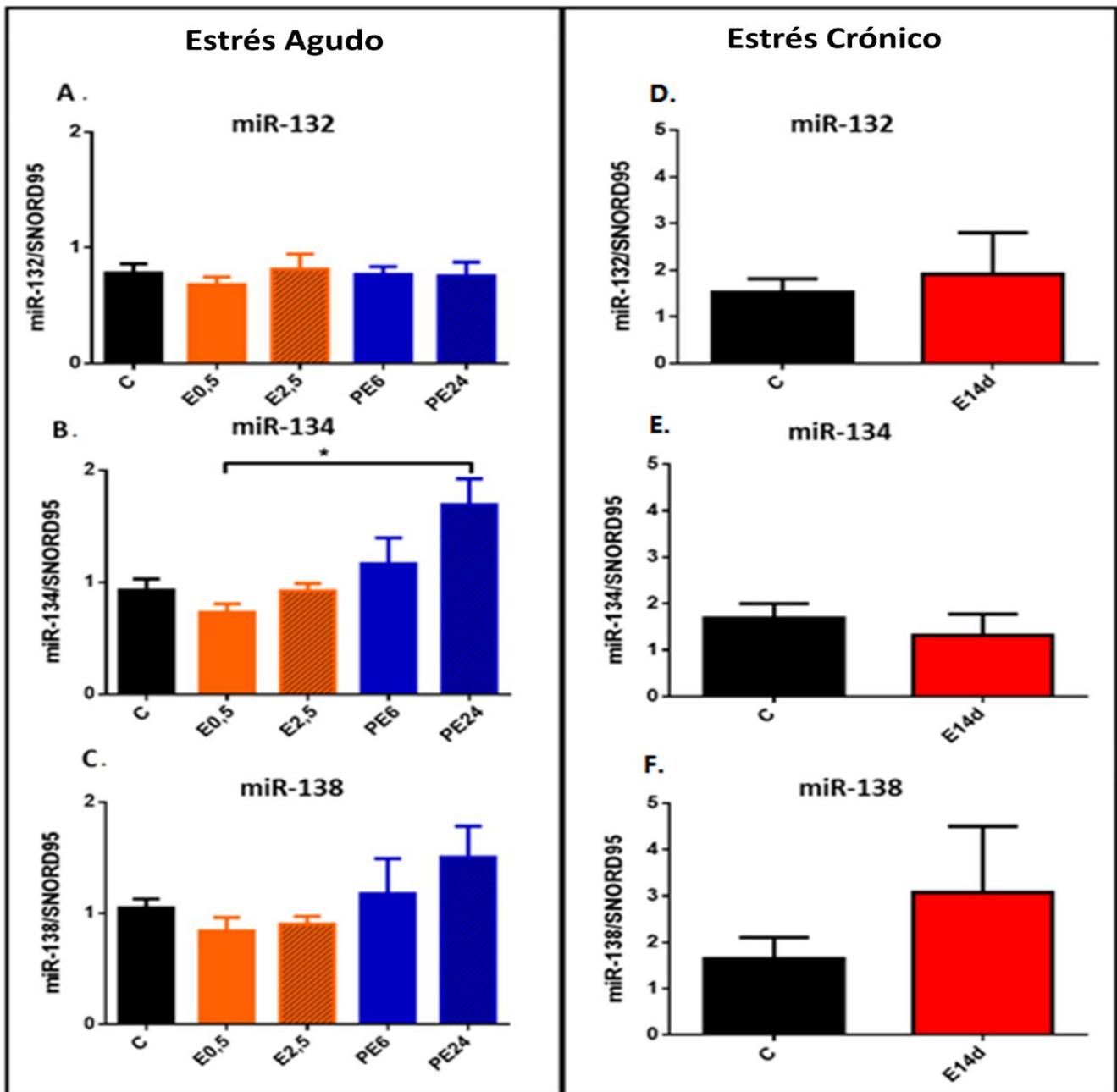


Figura 11. Cambios en los niveles de miR-134 inmediatamente posterior al período de estrés agudo. Se utilizó 200 pg de cADN para todas las cuantificaciones. Los niveles de los miARNs fueron normalizados por *SNORD95* y calibrados por un animal control. Los resultados representan el promedio \pm EEM. **(A)** efecto del estrés agudo y período de recuperación sobre los niveles de miR-132 ($n=4$, $P= 0,8190$), **(B)** miR-134 ($n=5$, $P= 0,0298$) y **(C)** miR-138 ($n=5$, $P= 0,5061$), y los efectos del estrés crónico para **(D)** miR-132 ($n=4$, $P=0,3286$), **(E)** 134 ($n=4$, $P=0,2429$) y **(F)** 138 ($n=4$, $P=0,1000$), respectivamente. Los datos se analizaron por análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, con post test de Dunn y por análisis t-test no paramétrico de Mann Whitney, análisis de una cola, * $p<0,05$.

6.2.2 El estrés agudo y crónico afecta diferencialmente los niveles del miR-92a a nivel del hipocampo

De acuerdo a los resultados del microarreglo observados a nivel del hipocampo dorsal en respuesta a estrés crónico y debido a la relevancia en su rol en la plasticidad sináptica excitatoria, se evaluaron las variaciones en los miR-92a y miR-485, tanto en estrés agudo como crónico en hipocampo completo. Se determinó mediante test de Kruskal Wallis ($P=0,001$) un aumento significativo de miR-92a durante el estrés (2,5 h) y a 6 h posteriores al estrés **A** respecto al control (**Fig. 12A**). A las 24 h post-estrés agudo, se observó una reducción, pero no se recupera al nivel control. Interesantemente, 24 h posterior a la aplicación del último procedimiento de estrés crónico se observó mediante test de Mann Whitney ($P=0,0500$) una reducción en el nivel del miR-92a (**Fig. 12B**).

Por otro lado, a diferencia de lo visualizado para miR-92a, se determinó que los niveles de miR-485 no se modificaron frente a estrés agudo (**Fig.12C**) ni crónico (**Fig.12D**).

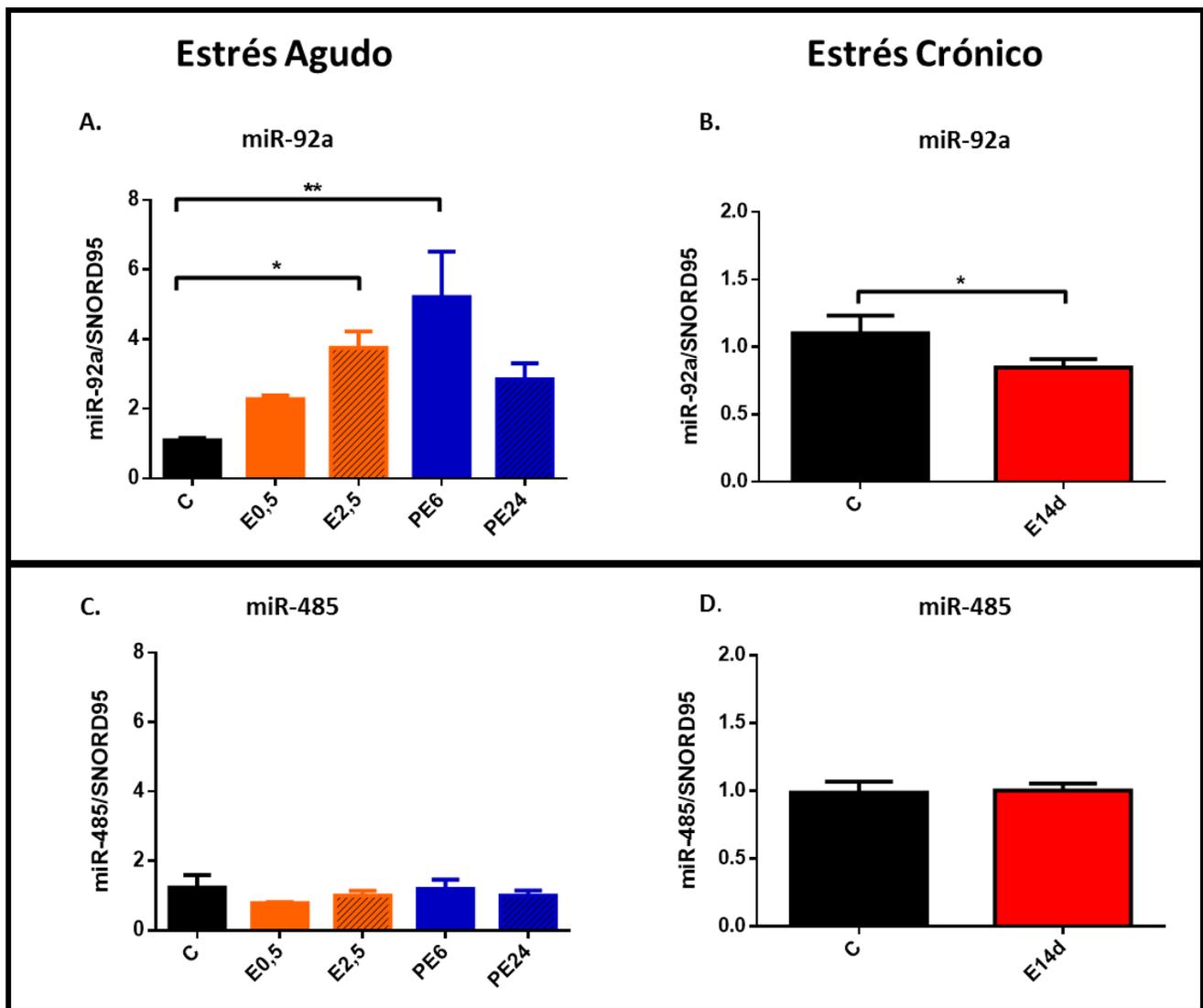


Figura 12. Niveles de miR-92a aumentan inmediatamente posterior al período de estrés agudo y disminuyen tras el estrés crónico. Se utilizó un *input* de 200 pg de cADN para todas las cuantificaciones. Los niveles de los miARNs fueron normalizados respecto a *SNORD95* y calibrados por un animal control. Los resultados representan el promedio \pm EEM. En **(A)** se utilizó un $n=3$ para los controles, y $n=4$ para las otras condiciones experimentales, y se observó un aumento en los niveles de miR-92a ($P= 0,001$) en las temporalidades E2,5 y PE6. **(B)** Efectos del estrés crónico sobre miR-92a, se observó una disminución significativa respecto al control ($n=4$, $P= 0,05$). En **(C)** no se observaron cambios sobre los niveles de miR-485 por el estrés agudo ($n=4$, $P= 0,4493$). En **(D)** se muestra el efecto del estrés crónico sobre los niveles de miR-485, donde no se vieron cambios ($n=4$, $P= > 0,9999$). Los datos de estrés agudo se analizaron por análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, con post test de Dunn's * $p<0,05$; ** $p<0,01$. Los datos de estrés crónico se analizaron mediante el t-test no paramétrico de Mann Whitney, análisis de una cola. * $p<0,05$.

6.2.3 Regulación de los niveles de miARNs por corticosterona y actividad glutamatérgica

De modo de precisar si el aumento en respuesta al estrés en los niveles de miARNs es debido al aumento en los niveles circulantes de GCs producidos por la activación del eje HHA (Dhabhar y cols., 1997), se determinó el efecto de la administración aguda de CORT en ratas previamente ADX sobre los niveles de miR-92a y miR-485. Como se muestra en la Fig.13 a la ADX no produjo cambios significativos respecto al control aunque su nivel fue inferior. Sin embargo, luego de 0,5 h post-administración de CORT se observó un incremento del miARN a valores cercanos al control (Análisis de poder estadístico G-Power), niveles que tornaron al control luego de 6 h post-administración de CORT (**Fig. 13A**).

Aunque estos resultados no son concluyentes, existen antecedentes que los GCs a través del MR incrementan la liberación de Glu (Groeneweg y cols., 2012) y quizás este neurotransmisor al activar sus receptores NMDA, pueda inducir cambios en los miARNs maduros. Por ello se evaluó si la variación en el nivel de miR-92a inducida por CORT involucraba la actividad del NMDA. Para ello los animales ADX se les administró un antagonista no competitivo del NMDA (MK801; 0,1 mg/Kg, i.p.) y luego de 0,5 h, se inyectaron con CORT (10 mg/Kg, i.p.). En la Fig. 13B se observó mediante test de Kruskal Wallis ($P=0,0025$) que el aumento de miR-92a inducido por CORT se inhibe en presencia de MK801 (**Fig. 13B**).

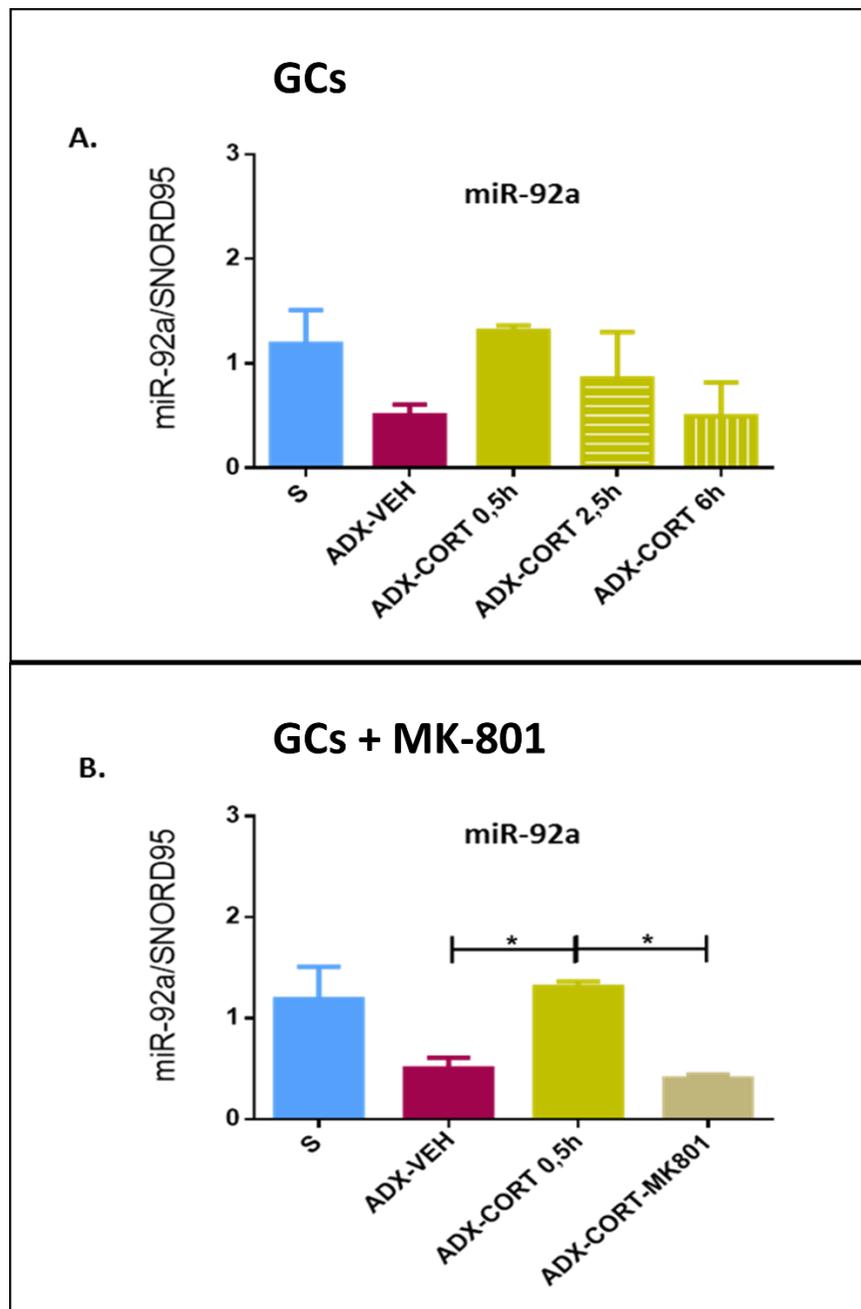


Figura 13. El aumento en los niveles del miR-92a inducido por la administración aguda de CORT en ratas ADX se previene por la administración del antagonista NMDAR MK-801. Se utilizó un *input* de 200 pg de cADN para todas las cuantificaciones. Los niveles de los miARNs fueron normalizados por *SNORD95* y calibrados por un animal control *sham*. Los resultados representan el promedio \pm EEM. **(A)** representa la acción de GCs en los niveles de miR-92a, donde S y ADX-VEH (n=5), ADX-CORT 0,5h, ADX-CORT 2,5h y ADX-CORT 6h (n=3); $P=0,08$. En **(B)** se representa el efecto del antagonista MK801 sobre ADX-CORT 0,5h sobre los niveles de miR-92a donde ADX-CORT-MK801 (n=3); $P=0,0025$. Los datos se analizaron por análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, con post test de Dunn. * $p<0,05$.

A modo de determinar si esta respuesta es específica para este miARN, se determinaron los niveles del miR-485 en el modelo ADX. En la Fig. 14 se muestra que la administración de CORT no promueve cambios en los niveles de miR-485 en los tiempos ensayados (**Fig. 14A**). Sin embargo, mediante el análisis de poder estadístico (G-Power 3.1) se observó una tendencia al aumento entre los grupos ADX-VEH y ADX-CORT 0,5 h. En el segundo experimento, tampoco se observan cambios significativos ni tendencias (G-Power 3.1) en respuesta al fármaco MK801 (**Fig. 14B**). A pesar de esto, no es posible descartar completamente una relación en ambos casos debido al pequeño tamaño muestral para el análisis de miR-485 (n=3).

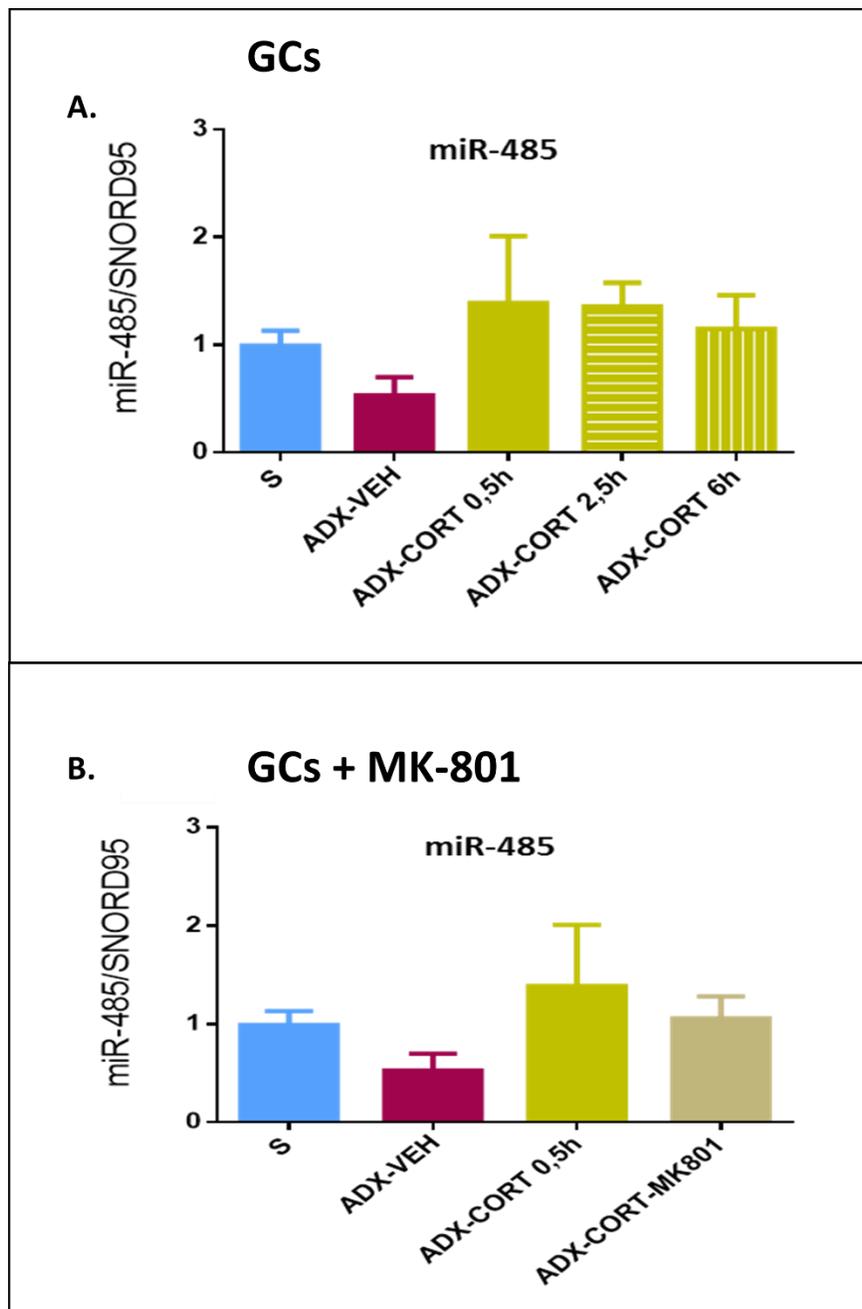


Figura 14. Los niveles de miR-485 no cambian en respuesta a CORT o al antagonista NMDAR MK-801 en ratas ADX. Se utilizó un *input* de 200 pg de cADN para todas las cuantificaciones. Los niveles de este miARN fueron normalizados por *SNORD95* y calibrados por un animal control *sham*. Los resultados representan el promedio \pm EEM. **(A)** Efecto de los GCs sobre los niveles de miR-485 ($n=3$, $P=0,3073$). **(B)** Efecto de MK-801 sobre los niveles de miR-485 ($n=3$, $P=0,3994$). Los datos se analizaron por análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, con post test de Dunn.

6.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Con el fin de determinar el rol del miR-92a en el sistema nervioso, se utilizó la herramienta bioinformática Ingenuity Pathway Analysis (IPA) de Qiagen, la cual establece relaciones causales entre genes, vías de señalización y patologías, entre otros. Se compone de una amplia base curada (revistas científicas y bases de datos tanto públicas como privadas) a partir de la cual es posible asignar una puntuación a las vías con mayor probabilidad de estar vinculadas al gen, proteína y/o miARN en cuestión. Para este análisis, se realizó una búsqueda de potenciales blancos de miR-92a en todos los órganos y en un análisis más fino se evaluaron los posibles blancos putativos en vías del sistema nervioso.

6.3.1 MiR-92a posee relevantes blancos en sistema nervioso, específicamente en señalización y guía axonal

A partir de este análisis se determinó la existencia de vías preponderantes asociadas a miR-92a tales como desarrollo embrionario y funcionamiento del sistema nervioso, desarrollo de tejido u órganos y vías vinculadas a funciones cognitivas como el comportamiento (**Fig.15A**). En el análisis específico de rutas canónicas en el sistema nervioso, se encontró que las vías potenciales con mayor puntuación estaban relacionadas a la señalización de guías axonales, a la LTP y a la señalización por Ca^{2+} , siendo todas estas vías relevantes en el proceso de neuroplasticidad (**Fig.15B**).

Los análisis de diversas bases de datos arrojaron 20 blancos con las mejores características de predicción bioinformática: de éstos se escogieron los cuatro mejores, según los parámetros mencionados en la sección de metodología (**Ver Anexo, Tabla I**). Estos son: KCC2, MEF2D, KAT2B (un activador transcripcional de regulación circadiana) y REST, el cual regula específicamente la expresión de genes neuronales. Los primeros dos ya habían sido reportados como blancos para miR-92a (Vetere y cols., 2014), siendo KAT2B y REST blancos putativos totalmente novedosos.

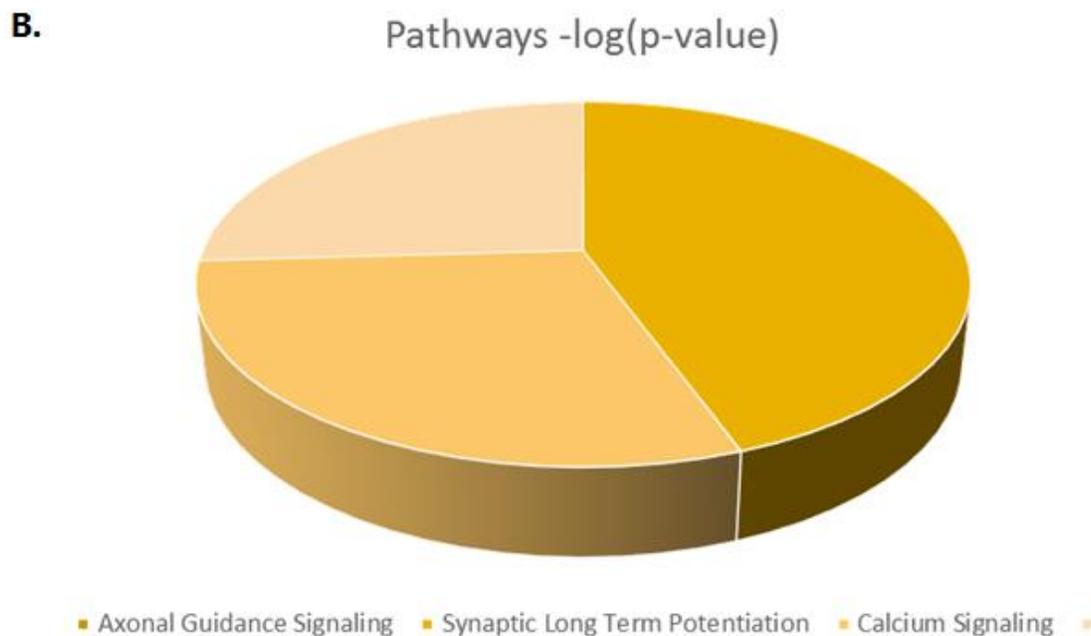
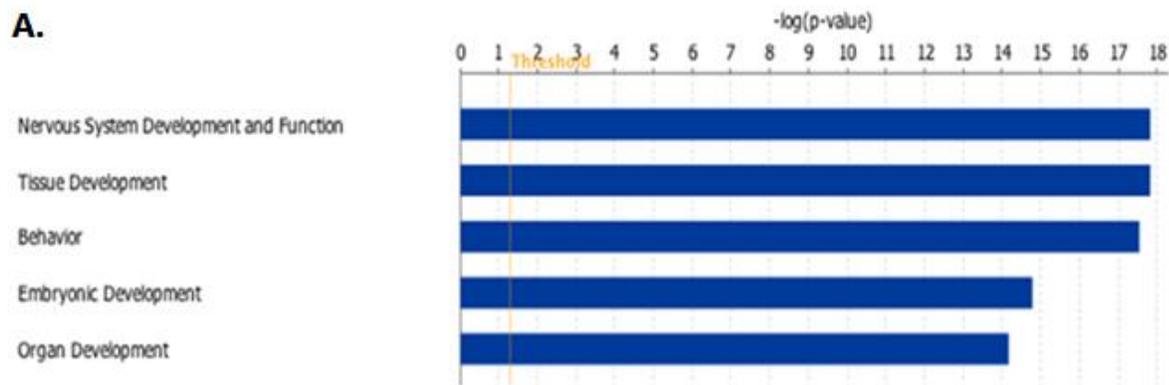


Figura 15. MiR-92a posee blancos relevantes en el sistema nervioso, específicamente en señalización y guía axonal. En (A) se pueden observar ciertas rutas relacionadas al desarrollo fisiológico que poseen el más alto valor de correlación ($-\log(p\text{-value})$) con el miR-92a, donde se observa entre las tres más destacadas: Vías relacionadas a desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, desarrollo de tejido y comportamiento. En (B) se muestran las tres rutas canónicas que poseen el más alto valor de correlación ($-\log(p\text{-value})$) con el miR-92a. Entre las tres más destacadas se encuentran la señalización de guías axonales, LTP y señalización por Ca^{2+} .

6.4 Ensayo de reportero de luciferasa para determinar función de miARNs

Se ha reportado que la línea celular HEK293T poseen niveles altos de miR-92a por lo cual es un excelente modelo preliminar para estudiar blancos putativos sin la necesidad de agregar “mimics” (Ji y cols., 2011). De hecho se comprobó experimentalmente por qPCR que la línea HEK293T manejada en el laboratorio presentaba altos niveles del miR-92a en comparación a otros miARNs, como por ejemplo miR-485. También se observó que los niveles del SNORD95 comúnmente utilizados como normalizador en el qPCR fueron altos en comparación a lo observado en el hipocampo de rata, por lo que en este caso se usó el SNORD96 como normalizador el cual poseía niveles bajos (Fig. 16).

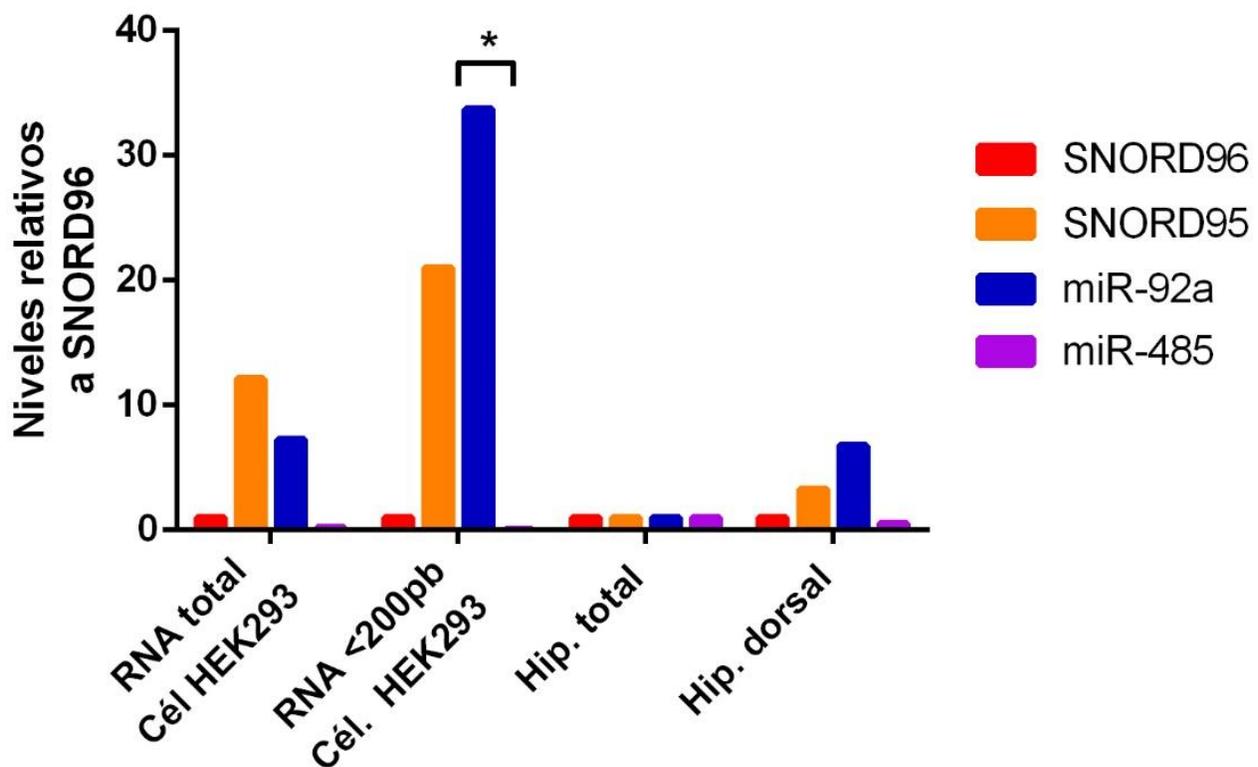


Figura 16. La línea celular HEK293T posee altos niveles de miR-92a y SNORD95 en comparación al hipocampo de rata. Se utilizó un *input* de 200 pg de cADN para todas las condiciones. Los niveles de los miARNs fueron normalizados por *SNORD96* y calibrados por un animal control de hipocampo completo. Los resultados representan el promedio \pm EEM. Las condiciones fueron ARN total de la línea HEK293T, ARN < 200 pb de la línea HEK293T, hipocampo completo e hipocampo dorsal. Se observó una diferencia significativa entre miR-485 y miR-92a; $P = 0,0329$. Análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, con post test de Dunn. * $p < 0,05$.

Para evaluar si los blancos putativos obtenidos a partir de los análisis *in silico* efectivamente son modulados por miR-92a, se realizaron ensayos de reportero de luciferasa en la línea celular HEK293T donde se determinaron previamente altos niveles de éste miARN.

Todos los blancos seleccionados fueron de relevancia en sistema nervioso y específicamente para el hipocampo, al estar asociados a procesos neuroplásticos tanto funcionales como morfológicos en la sinapsis. Además, las variaciones en la expresión de estos blancos han sido vinculadas tanto con la mantención como con alteraciones cognitivas tales como aprendizaje y memoria.

Se transfectaron las células HEK293T con cada uno de los plasmidios que contenían la secuencia semilla de los blancos putativos de miR-92a (REST, KAT2B, MEF2D y KCC2). Se utilizó como controles una región acotada de los mARN blancos del miR-92^a correspondientes a MEF2D y KCC2. Estos blancos previamente descritos por literatura fueron evaluados en su región 3'UTR completa (Vetere y cols., 2014). Cada transfección se realizó tres veces en cuadruplicado.

En estos ensayos se observó mediante test de Mann Whitney ($P= 0,0139$) una disminución significativa en la actividad luciferasa del plasmidio que contenía la secuencia semilla para miR-92a en el mARN del represor transcripcional REST en comparación al control plasmidio vacío (**Fig. 17A**). Por otro lado, no se observaron cambios significativos en la actividad enzimática derivada de plasmidios con la secuencia blanco para el gen KAT2B, que al igual que REST es otro potencial blanco no descrito previamente para miR-92a.

No se observaron cambios en la actividad de la luciferasa para la sección de mARN evaluada de los controles KCC2 y MEF2D (Vetere y cols., 2014).

Estos experimentos se realizaron como una evaluación preliminar de estos blancos, sin embargo, es importante destacar que se requiere la confirmación de estos resultados mediante el uso de *mimics* y *antagomirs*. Todos estos resultados contribuyen a responder cómo el estrés modifica los niveles de miARNs y por ende, afecta a posibles blancos involucrados en procesos de neuroplasticidad en el hipocampo de rata.

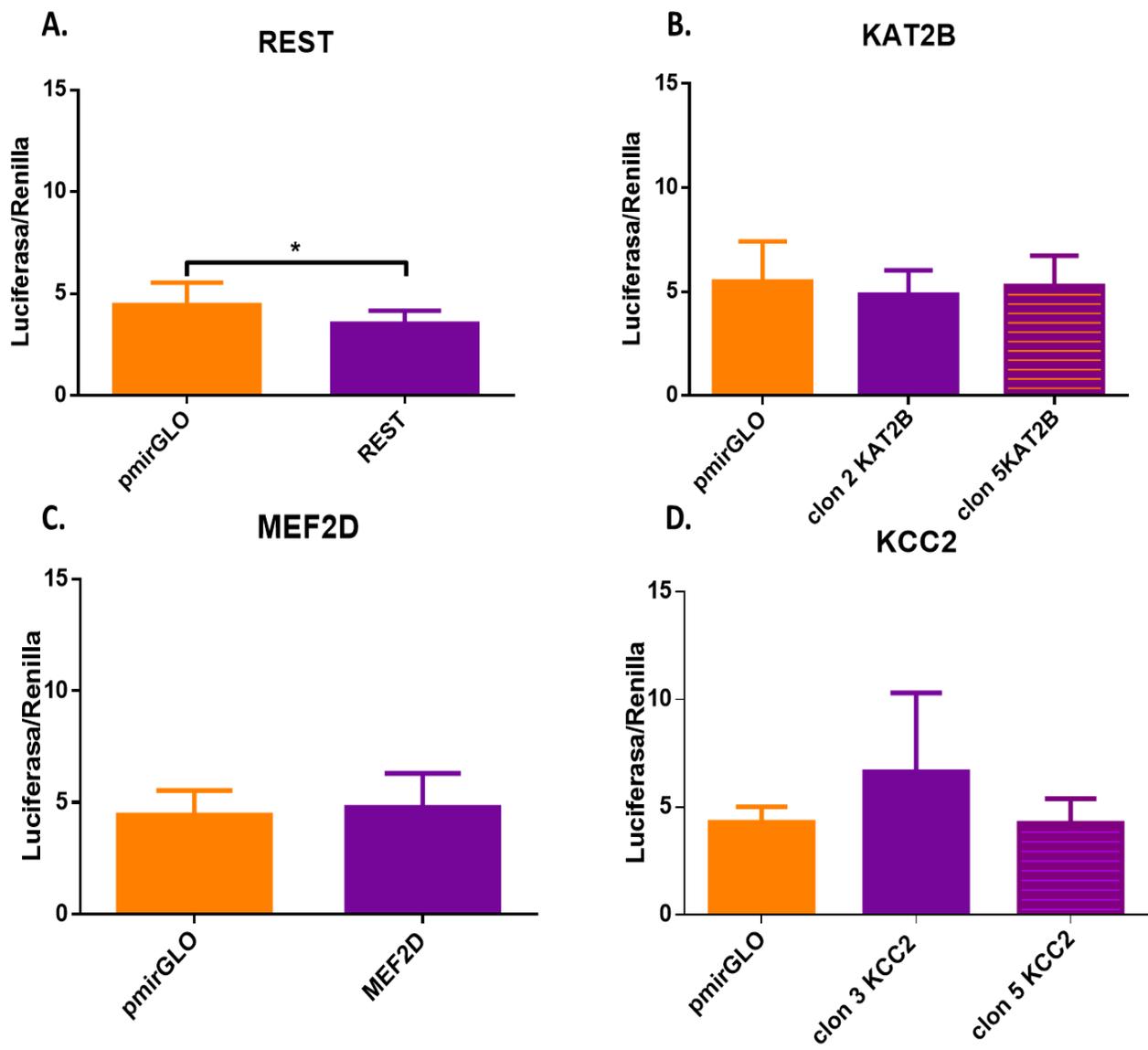


Figura 17. El mRNA de REST posiblemente es modulado post-transcripcionalmente por miR-92a. Los constructos constaron de la secuencia semilla exacta para miR-92a y 20 pares de bases adicionales en ambas direcciones, incluyendo los sitios de corte de las enzimas SacI, XbaI y NotI para los mRNA de REST (A), KAT2B (B), MEF2D (C) y KCC2 (D). A las 24 h posterior a la transfección se procedió a medir actividad de luciferasa. Se cuantificó la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga, normalizada por la luminiscencia de luciferasa de renilla (luciferasa/renilla), en comparación con el control vector pmirGLO sin inserto. No se observaron cambios significativos en (B), (C) y (D), sin embargo en (A) se vio una disminución significativa para REST ($P= 0,0139$). Cada medición se realizó tres veces, en cuadruplicado técnico. Los resultados representan el promedio \pm EEM y éstos se analizaron por análisis t-test no paramétrico de Mann Whitney, análisis de una cola. * $p<0,05$.

7.0 DISCUSIÓN

En los últimos años, los miARNs han mostrado tener un rol significativo en diversos procesos en las células nerviosas, tales como la regulación fina de la expresión génica esencial para el ajuste de procesos dinámicos que éstas requieren (Lugli y cols., 2008). En esta memoria, se demostró que los miARNs son regulados diferencialmente por efectos del estrés agudo por restricción de movimiento, específicamente el miR-134 y el miR-92a, los cuales poseen blancos involucrados en procesos de neuroplasticidad sináptica en hipocampo de rata. Más aún, el miR-92a varió sus niveles ante estrés agudo y crónico indirectamente por la acción de CORT. Además, el ensayo de reportero de luciferasa para la secuencia semilla en el mRNA de REST, produjo una reducción en la actividad enzimática en células con alta expresión del miR-92a postulándolo como posible blanco.

MiR-134 aumentó significativamente sus niveles 24 h posteriores a un evento de estrés agudo en hipocampo.

Diversos estudios han implicado variaciones en el nivel de miARNs que dan cuenta de procesos tan complejos como la memoria y la respuesta al miedo. Entre éstos, el miR-134 es de alta expresión a nivel cerebral y define la morfología dendrítica (Meng y cols., 2002; Schratt y cols., 2004; Schratt y cols., 2006; Castañeda y cols., 2015). Este miARN aumentó posterior a la exposición a estrés agudo a nivel hipocampal, cambio que se condice con lo reportado en un modelo de estrés agudo (restricción 4h) en la amígdala de rata (Meerson y cols., 2010). Sin embargo, en el mismo estudio se reporta que el estrés crónico (restricción 4h/14 días) promueve una disminución en los niveles de miR-134 tanto en la amígdala como en el CA1 (Meerson y cols., 2010). Adicionalmente, en otro estudio se evaluó que los niveles del miR-134 fueron insensibles al estrés crónico en hipocampo dorsal (Castañeda y cols., 2015). Estos antecedentes permiten reafirmar que la estructura cerebral, la duración y la intensidad del estrés, son factores claves en determinar las variaciones en los niveles miARNs, pudiendo modificarse su expresión, procesamiento y/o degradación. De acuerdo a esto, es importante comparar los efectos del estrés agudo sobre este miARN en el hipocampo dorsal y ventral para establecer si existe una modulación dependiente de estas áreas hipocampales.

Hay que destacar que el aumento en los niveles de miR-134 no coincide con el incremento de CORT circulante tras la exposición al estresor, sin embargo, no se puede descartar un efecto a largo plazo de esta hormona u otro mediador del estrés. De acuerdo esto, sería importante dilucidar en primera instancia si CORT a través de acciones genómicas es responsable de dicho cambio, o por otro lado, si producto de la activación del NMDA se estaría gatillando un procesamiento que dé cuenta del aumento de este miARN. Finalmente, sería interesante evaluar variaciones en los niveles de sus proteínas blancos como LimK1 por inmunowesternblot, asimismo su participación en cambios rápidos en la morfología de espinas dendríticas en hipocampo, como los ya descritos en GD y CA1 por (Sebastian y cols., 2013).

Es importante destacar que no se observaron cambios en los niveles del miR-134 ante estrés crónico, sugiriendo una regulación diferencial dependiente de la duración del estrés sobre este miARN. Del mismo modo, se evaluaron otros dos miARNs involucrados en plasticidad estructural (miR-132 y miR-138) los cuales no mostraron cambios en sus niveles ante estrés por restricción de movimiento agudo ni crónico en hipocampo completo. Hay que destacar que existen antecedentes que indican que el miR-138 aumenta en las neuronas del CA1 ante estrés agudo (4h, inmovilización) (Meerson y cols., 2010), lo que puede plantear la posibilidad de respuestas específicas en distintas regiones del hipocampo. Recientemente en nuestro laboratorio, se publicó un artículo donde se determinó que los niveles de miR-132 y miR-134 no se modificaron por el estrés crónico en hipocampo dorsal en contraposición al aumento observado en el miR-138 (Castañeda y cols., 2015). De acuerdo a esto, como una proyección de este trabajo sería interesante evaluar si los cambios observados para miR-138 en hipocampo dorsal son específicos de dicha área o si existiría un efecto compensatorio a nivel de hipocampo completo. Por esto, una proyección de este trabajo es corroborar los resultados del estrés crónico sobre miR-138; para ello es preciso evaluar este miARN en hipocampo ventral, además de aumentar el número experimental para esta condición en hipocampo completo. Por otro lado, Meerson y cols. demostraron en un modelo de estrés crónico en rata (restricción 4h/14 días), que los niveles del miR-132 y miR-138 aumentan y disminuyen, respectivamente en la amígdala (Meerson y cols., 2010). Estos efectos diferenciales pueden deberse en parte a diferencias en la función de la región cerebral evaluada y en la intensidad del modelo de estrés utilizado.

Los niveles de miR-92a aumentan en el hipocampo durante y después de estrés agudo por restricción de movimiento

En esta memoria se demostró un incremento en el miR-92a cuya variación fue relativamente rápida, es decir cambio observado en forma significativa a las 2,5 h de estrés. Previamente en nuestro laboratorio se determinó que el estrés agudo no promovió cambios en los niveles del miR-92a en la región dorsal del hipocampo (datos no publicados). Esto podría explicarse en parte porque el estrés comanda cambios principalmente en la porción ventral del hipocampo. De hecho, este resultado concuerda con el aumento observado en los niveles de miR-92a en amígdala de ratón en un modelo de restricción de movimiento de 1,5 h (Haramati y cols., 2011). La amígdala es una estructura que al igual que el hipocampo forma parte del sistema límbico, y participa en la formación y procesamiento de memorias asociadas a las emociones de forma similar a lo descrito para el hipocampo ventral (Fanselow y cols., 2010; Desmedt y cols., 2015). En la misma línea, en ratones entrenados para generar memoria asociada al miedo, se reportó un aumento en los niveles de miR-92a en hipocampo 1,5 h posteriores al entrenamiento. Por otro lado, cabe destacar que la variación en este miARN siguió el perfil de variación en los niveles de CORT, por lo tanto fue de particular importancia determinar una relación de causalidad entre la variación de los niveles hormonales con el del miARN. Por ello, en esta memoria se estudió *in vivo* la acción de la CORT sobre los niveles del miR-92a, determinándose que frente a la ADX hubo una reducción del miARN maduro, aunque ésta no fue significativa. En contraste, la administración de CORT indujo un aumento en los niveles de miR-92a, efecto prevenido por la acción de un antagonista no competitivo del NMDA. En resumen, estos datos sugieren que los CORT inducen cambios en el miR-92a a través de una acción indirecta mediada por Glu. De hecho, se ha reportado una acción rápida no-genómica e indirecta de los GCs liberados por el estrés con la liberación del Glu (De Kloet y cols., 2008). Más aún, la activación de receptores de Glu podrían mediar ya sea el procesamiento, degradación y/o expresión de los miARNs. Este vínculo entre los miARNs y Glu se ha descrito previamente donde se ha observado que la inyección i.p. (0,5 mg/Kg) de MK-801 reduce significativamente los niveles de miR-219 en corteza prefrontal (PFC) de ratón y además mutaciones inactivantes en GRIN1 producen una disminución en los niveles de ciertos miARNs en hipocampo y en la PFC de ratón (Kocerha, 2009). Además, los cultivos de neuronas hipocampales de rata en que se ha bloqueado la transmisión sináptica con tetrodotoxina y además antagonizado el receptor NMDA con AP5, presentan una disminución en

los niveles de miR-92a (Letellier y cols., 2014). De acuerdo a los antecedentes, se podría postular entonces que el cambio en los niveles de miR-92a, producido por el estrés, podría atribuirse a un efecto indirecto de CORT, al aumentar la transmisión glutamatérgica que promueve la activación de Dicer mediada por calpaínas, favoreciendo el procesamiento del miARN maduro a nivel de la espina (Lugli y cols., 2005; Popoli y cols., 2012). Adicionalmente, se reconoce que el estrés agudo (restricción de 2h) favorece la transmisión glutamatérgica y la memoria de trabajo en la PFC (Yuen, 2011 y 2012). Además, el bloqueo de los NMDA aumenta la expresión de GluR1 en neuronas hipocampales mediante la traducción local de su mRNA presente en dendritas. Junto con esto, hay una reducción en los niveles del miR-92a (Letellier y cols., 2014), sugiriendo su participación en el control local de la traducción del mRNA del GluR1.

Todos estos antecedentes proponen una relación entre los niveles de miARNs y la señalización de Glu a través del NMDA, quedando por dilucidar el mecanismo específico responsable del aumento del miR-92a en estrés agudo. Por otra parte, se debe precisar mediante enfoques farmacológicos si la relación entre CORT y Glu está mediada por la participación del GR y MR. Por otro lado, considerando que el miR-92a maduro puede provenir de la actividad de diferentes clúster, se podría evaluar por ejemplo las variaciones en los pri-miARNs específicos de cada clúster (cromosoma 13 y X), lo que permitiría determinar la regulación transcripcional mediada por Glu.

Adicionalmente en esta memoria se evaluó cómo el estrés modula al miR-485, donde no se observaron cambios significativos ante estrés agudo ni crónico en los niveles de este miARN. Actualmente, no hay reportes que vinculen variaciones en los niveles del miR-485 con estrés agudo o crónico en hipocampo u otra estructura cerebral. A pesar de las asociaciones de este miARN con el sistema nervioso, específicamente en relación a la modulación sináptica asociada a Glu y neuropatologías, al parecer no se estaría modulando por un aumento de CORT, producto de la activación del eje HHA (Panagiotakopoulos y cols., 2014). Esto se condice con los estudios previos realizados en nuestro laboratorio donde se reportó que miR-485 fue invariable ante estrés agudo y crónico en hipocampo dorsal (datos no publicados).

Además, no se observaron cambios significativos en los niveles del miR-485 en respuesta a la administración de CORT aunque por análisis de poder estadístico (G-Power) se observó una tendencia

al aumento posterior a 0,5 h de la restitución los niveles de CORT en comparación a los animales ADX-VEH. A su vez, se vio que el bloqueo del receptor NNMDA por MK-801 no produce modificación en los niveles del miR-485 en hipocampo, a diferencia de lo visto para miR-92a. No obstante, a futuro será interesante evaluar los niveles del miR-485 en otras estructuras cerebrales donde pudiese verse regulado por los efectos del estrés.

Blancos del miR-92a

Diversos estudios han demostrado que el estrés agudo y crónico puede afectar la actividad neural, no solo a corto plazo sino también a largo plazo, reflejado fundamentalmente en cambios morfológicos (Rinaldi y cols., 2010). El estrés crónico, produce la atrofia de dendritas en la región CA3, suprime la neurogénesis en el GD y altera las funciones cognitivas dependientes de hipocampo (McEwen y cols., 2001). Además, se ha descrito que los altos niveles de CORT serían los responsables de interferir en la mantención de LTP, favoreciendo la depresión a largo plazo, fenómeno asociado al olvido (Kim y cols., 2002).

En esta memoria, uno de los blancos putativos del miR-92a que fue evaluado por ensayo de reportero de luciferasa, y que mostró una disminución significativa fue REST. Este factor transcripcional ha sido descrito como un represor de genes neuronales durante el desarrollo embrionario y cuya expresión disminuye tras la diferenciación neuronal (Lu y cols., 2014). También se ha descrito que es inducido durante el envejecimiento y regula múltiples genes relacionados con muerte celular, resistencia a estrés celular y Alzheimer (Lu y cols., 2014). A su vez, los niveles altos de REST están asociados con la preservación de las funciones cognitivas (neuroprotección) y longevidad, inclusive en condición de Alzheimer (Lu y cols., 2014). Interesantemente, se ha reportado que miR-92a disminuye sus niveles en cerebro de ratón al envejecer (Inukai y cols., 2012), sugiriendo un vínculo previamente no reportado entre este miARN y este blanco. Recientemente se ha asociado a REST con la maduración del receptor NMDA mediante un control epigenético (Tamminga, 2015), lo cual podría estar indicando un “loop” de regulación entre el miARN, su blanco y la neurotransmisión glutamatérgica en respuesta al estrés agudo. De ser efectiva la represión de la traducción de REST en un sistema *in vitro*, se debería demostrar que

el estrés produce variaciones en los niveles de la proteína en extracto de hipocampo. Adicionalmente, en este trabajo se pudo analizar que entre la amplia gama de blancos putativos para miR-92a gracias a las herramientas bioinformáticas disponibles, destacándose los relacionados a sistema nervioso y comportamiento, específicamente en las vías asociadas a guía axonal, LTP y señalización por Ca²⁺. En este contexto, los niveles de REST encontrados son coherentes con los resultados bioinformática obtenidos. Sin embargo, es necesario evaluar blancos putativos de miR-92a adicionales que tengan una relación más estrecha con estas vías preponderantes. Además, es importante destacar que hay otros miARNs que poseen secuencias semillas idénticas a las de miR-92a. En el caso de REST, hay dos miARNs que pertenecen a los clúster asociados al miR-92a (miR-25 y miR-363) (**Ver Anexo Fig. II**) y otros dos codificados en otras regiones genómicas. Por lo tanto, las proyecciones indispensables de este trabajo son la confirmación de este blanco mediante el uso de “*mimics*” y “*antagomirs*”, además del uso de mutaciones sitio dirigidas a la secuencia semilla. Más aún, debido al plegamiento de los mARNs pudiese ser fundamental la evaluación de la región 3’UTR completa para estos cuatro blancos.

Por otro lado, se ha reportado previamente una disminución en blancos del miR-92a como el MEF2D y CPEB3 luego de 1,5 h de condicionamiento al miedo asociado a una disminución del KCC2 6 h post-entrenamiento. Más aún, estos cambios se previnieron al administrar un plasmidio lentiviral esponja en CA1, el cual emula el efecto de un “*antagomir*” (Vetere y cols., 2014). A su vez, Hewitt y cols. reportaron que el estrés durante 0,5 h produce una disminución en la expresión de KCC2 en células del PVN de rata, proteína que está asociada a la regulación negativa de la actividad inhibitoria de GABA, y por ende genera una sensibilización a la señalización glutamatérgica (Hewitt y cols., 2009). A diferencia de estos estudios, Mackenzie y cols. demostraron que el estrés durante 0,5 h (restricción de movimiento) no produce cambios en la expresión del KCC2 en hipocampo completo de ratón (MacKenzie y cols., 2015). Estos antecedentes sugieren también que la regulación de miR-92a sobre su blanco KCC2 es dependiente de la duración del estresor y del área cerebral evaluada.

De acuerdo a Mackenzie y Maguire (2015), el estrés crónico por restricción de movimiento y el aumento en los niveles de CORT sérico provocan la desfosforilación del residuo S940 de KCC2, afectando tanto la expresión en membrana como la funcionalidad de esta proteína en hipocampo de ratón (MacKenzie y cols., 2015). Además, esta disminución en los niveles del KCC2 altera no solo la homeostasis de Cl⁻,

interfiriendo en la acción del receptor de GABA_A asociado a movimientos de este ión, sino también la morfología de la espina dendrítica responsable de mantener la sinapsis glutamatérgica (Chamma y cols., 2012). Concordantemente, esta desregulación en la inhibición de GABA_A está asociada a la mantención de LTP (Caillard y cols., 1999). A su vez, se ha descrito que la reducción en KCC2 producto del estrés crónico podría dar cuenta del aumento en la excitabilidad neural en neuronas piramidales de CA1 asociado a una mayor predisposición a convulsiones epilépticas (MacKenzie y cols., 2015). A diferencia de lo esperado en estrés crónico, al parecer no hay relación entre los niveles del miR-92 con los de KCC2. No obstante, la disminución de KCC2 está vinculada al deterioro de la LTP (Chamma y cols., 2012) y por ende de la memoria observada en animales crónicamente estresados.

Todo estos antecedentes sugieren que probablemente existe una regulación más compleja en el estrés crónico, donde la modulación de miR-92a al menos sobre KCC2 pareciera ser indirecta, mediada por otros mecanismos de señalización probablemente asociados a la CORT, que al igual que para estrés agudo están circunscritos a una región cerebral específica. Una proyección de este estudio sería evaluar la expresión de KCC2 en hipocampo completo por inmunowesternblot tras la exposición a estrés crónico y a la vez evaluar también otras proteínas blanco de este miARN que pudieran ser los responsables más directos de los efectos deletéreos del estrés crónico. No se ha descrito previamente una modulación de miR-92a por estrés crónico, por lo que una proyección atractiva sería evaluar *in vitro e in vivo* cambios morfológicos y funcionales a nivel de la sinapsis glutamatérgica mediante el uso de “*antagomirs*”. Cabe destacar que este miARN también fue evaluado en hipocampo dorsal sin ver cambios significativos (datos no publicados), por lo que nuevamente la región ventral del hipocampo podría ser la responsable de los cambios duales observados tanto para estrés agudo como crónico.

En esta memoria, no se observaron cambios significativos en la actividad luciferasa de los plasmidios que contenían una sección del mRNA que incluía la secuencia semilla de los transcritos confirmados experimentalmente por literatura, MEF2 y KCC2 (Vetere y cols., 2014). Tampoco se observaron cambios para el otro blanco no reportado previamente de miR-92a, KAT2B, una proteína involucrada en la regulación transcripcional de diversos genes incluyendo a la proteína supresora de tumores (Pichiorri, 2008). Esto podría deberse al contexto en el cual fueron evaluados estos blancos, ya que a diferencia del estudio de Barbato y cols. (2010) no se clonó toda la secuencia 3'UTR, lo cual podría incidir en gran

medida en la interacción miARN-mARN, en especial para aquellos blancos que poseen más de un sitio de unión como es el caso de KCC2. Además, al igual que para el transcrito de REST existen otros miARNs presentes en las células HEK293T utilizada que poseen como blancos a los mARNs de KCC2, KAT2B y MEF2D. Junto con esto, se observaron elevados niveles de miR-92a en la línea celular utilizada (HEK293T) a diferencia de la línea PC12 (derivada de feocromocitoma) utilizada por Barbato y cols. donde se reportaron como blancos KCC2 y MEF2D. En resumen, los miARNs que posean a éstos transcritos como blancos podrían estar compitiendo por la maquinaria de silenciamiento, saturando a RISC y por ende enmascarando los cambios esperados. Por todo esto, es imperativo verificar todos estos plasmidios en otra línea celular que no presente niveles tan elevados de miR-92a utilizando “*mimics*” y “*antagomirs*”, además de evaluar sus secuencias 3’UTR completas mediante ensayos de reportero de luciferasa.

En resumen, este trabajo demuestra que los miARNs son modulados diferencialmente en respuesta a estrés por restricción por movimiento tanto agudo (miR-134, morfología espina) como crónico. Más aún, que los niveles de miR-92a (funcionalidad sináptica) son regulados de forma dual en respuesta al estrés agudo (aumentando) y crónico (disminuyendo). Adicionalmente, miR-92a es regulado indirectamente por CORT, a través de la señalización por el receptor NMDA. Además, si efectivamente REST fuese un blanco de miR-92a, se esperaría que ante el estrés agudo disminuyera su expresión, por ende afectando las funciones cognitivas. Este efecto sería contrario a lo que ocurriría ante estrés crónico, debido a la modulación inversa en los niveles de miR-92a por la duración del estrés. Esto podría explicarse por un mecanismo compensatorio gatillado por REST ante el estrés crónico asociado con el rol neuroprotector de este factor transcripcional, que podría dar cuenta de las alteraciones cognitivas asociadas al estrés **(Fig. 18 A y B)**. A pesar de la contribución de esta memoria en estudiar el posible rol de los miARNs en la modulación de proteínas neuroplásticas responsables de los cambios morfológicos y conductuales observados ante el estrés, falta mucho por investigar. Sin duda, este aporte abre puertas hacia nuevas preguntas y nuevos estudios que puedan explicar de forma más específica la modulación dinámica cerebral ante los estímulos del medio ambiente como el estrés.

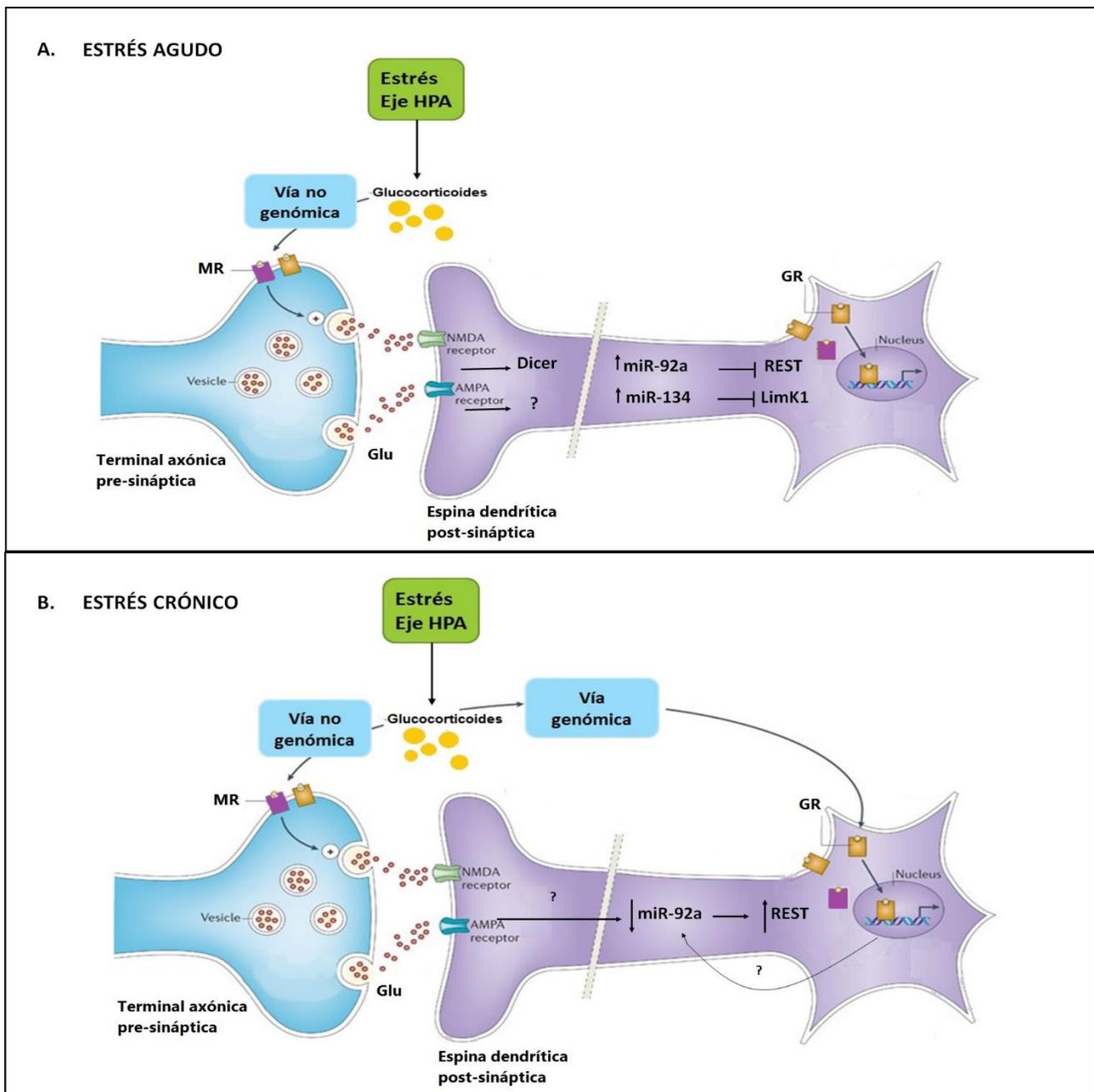


Figura 18. Modelo propuesto de regulación de miARNs en estrés agudo y crónico. (A) Efecto del estrés agudo (rápido) modulado por receptores de membrana de GCs que producen la exocitosis de vesículas con Glu hacia el espacio sináptico, el cual al unirse a sus receptores ionotrópicos NMDA y AMPA producirá la activación de Dicer mediada por calpaínas y por ende el aumento en los niveles de miR-92a maduro, regulando la traducción de su blanco REST. A su vez, el aumento de miR-134 en consecuencia del estrés agudo podría modular los niveles del mRNA de su proteína blanco LimK1. **(B)** Por otra parte, el estrés crónico (lento) podría modular la disminución en los niveles de miR-92a mediante la acción de GCs, ya sea por la vía canónica o la vía no canónica, provocando el cese en la represión traduccional de REST. Modificado de Popoli y cols., 2012.

8.0 CONCLUSIONES

- ✓ El estrés no produce cambios en los niveles miR-132, miR-138 y miR-485 en hipocampo de rata.
- ✓ MiR-134 aumenta sus niveles 24 h posterior a un evento de estrés agudo en hipocampo.
- ✓ MiR-92a aumenta sus niveles significativamente en respuesta a estrés agudo de 2,5h por restricción de movimiento, con un pico 6 h posterior al evento de estrés y retornando a los niveles basales 24 h post-estrés en hipocampo.
- ✓ MiR-92a disminuye sus niveles en respuesta a estrés crónico por restricción de movimiento (2,5h/14 días) en hipocampo.
- ✓ Los niveles de miR-134 y miR-92a no se correlacionan proporcionalmente con la concentración de CORT sérica.
- ✓ MiR-92a es regulado indirectamente por CORT, vía señalización glutamatérgica mediante su receptor NMDA.
- ✓ MiR-92a posiblemente tiene como blanco al mRNA de la proteína REST.
- ✓ La mayor proporción de blancos de miR-92a pertenece a sistema nervioso central y comportamiento, destacando vías relacionadas con guía axonal, LTP y señalización porCa²⁺.
- ✓ MiR-92a podría ser utilizado como un marcador de estrés.
- ✓ Al igual que el efecto dual entre estrés agudo (benéfico) y crónico (deletéreo) en la conducta y aprendizaje, miR-92a se comporta de forma diferente en cada condición aumentando en estrés agudo y disminuyendo en estrés crónico.

9.0 BIBLIOGRAFÍA

- Albright, T., Kandel, E. y Posner, M. I. (2000). "Cognitive neuroscience." Curr Opin Neurobiol **10**: 612–624.
- Asaki, C., Usuda, N., Nakazawa, A., Kametani, K. y Suzuki, T. (2003). "Localization of translational components at the ultramicroscopic level at postsynaptic sites of the rat brain." Brain Res **972**(1-2): 168-176.
- Atkinson, H. C. y Waddell, B. J. (1997). "Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: sexual dimorphism and changes across the estrous cycle." Endocrinology **138**(9): 3842-3848.
- Bailey, C., Kandel, E. y Harris, K. (2015). "Structural Components of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(7).
- Baldi, E. y Bucherelli, C. (2005). "The inverted "u-shaped" dose-effect relationships in learning and memory: modulation of arousal and consolidation." Nonlinearity Biol Toxicol Med **3**(1): 9-21.
- Barbato, C., Ruberti, F., Pieri, M., Vilardo, E., Costanzo, M., Ciotti, M. T., Zona, C. y Cogoni, C. (2010). "MicroRNA-92 modulates K(+) Cl(-) co-transporter KCC2 expression in cerebellar granule neurons." J Neurochem **113**(3): 591-600.
- Beveridge, N. J., Gardiner, E., Carroll, A. P., Tooney, P. A. y Cairns, M. J. (2010). "Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis." Mol Psychiatry **15**(12): 1176-1189.
- Bhattacharyya, R. y Wedegaertner, P. B. (2000). "Galpha 13 requires palmitoylation for plasma membrane localization, Rho-dependent signaling, and promotion of p115-RhoGEF membrane binding." J Biol Chem **275**(20): 14992-14999.
- Bian, S., Hong, J., Li, Q., Schebelle, L., Pollock, A., Knauss, J. L., Garg, V. y Sun, T. (2013). "MicroRNA cluster miR-17-92 regulates neural stem cell expansion and transition to intermediate progenitors in the developing mouse neocortex." Cell Rep **3**(5): 1398-1406.
- Bliss, T. V. y Collingridge, G. L. (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature. **361**(6407): 31-39.
- Bourne, J. N., Sorra, K. E., Hurlburt, J. y Harris, K. M. (2007). "Polyribosomes are increased in spines of CA1 dendrites 2 h after the induction of LTP in mature rat hippocampal slices." Hippocampus **17**(1): 1-4.
- Bravo, J. A., Parra, C. S., Arancibia, S., S., A., Morales, P., Herrera-Marschitz, M., Herrera, L., Lara, H. E. y Fiedler, J. L. (2006). "Adrenalectomy promotes a permanent decrease of plasma corticoid levels and a transient increase of apoptosis and the expression of Transforming Growth Factor beta1 (TGF-beta1) in hippocampus: effect of a TGF-beta1 oligo-antisense." BMC Neurosci **7**: 40.
- Caillard, O., Ben-Ari, Y. y Gaiarsa, J. (1999). "Long-term potentiation of GABAergic synaptic transmission in neonatal rat hippocampus." J Physiol **518**(1): 109-119.
- Castañeda, P., Muñoz, M., García-Rojo, G., Ulloa, J., Bravo, J., Márquez, R., García-Pérez, M., Arancibia, D., Araneda, K., Rojas, P., Mondaca-Ruff, D., Díaz-Véliz, G., Mora, S., Aliaga, E. y Fiedler, J. (2015). "Association of N-Cadherin Levels and Downstream Effectors of Rho GTPases With Dendritic Spine Loss Induced by Chronic Stress in Rat Hippocampal Neurons." J Neurosci Res **93**(10): Spc1.
- Cohen, J. E., Lee, P. R., Chen, S., Li, W. y Fields, R. D. (2011). "MicroRNA regulation of homeostatic synaptic plasticity." Proc Natl Acad Sci U S A. **108**(28): 11650-11655.
- Cohen, J. E., Lee, P. R. y Fields, R. D. (2014). "Systematic identification of 3'-UTR regulatory elements in activity-dependent mRNA stability in hippocampal neurons." Philos Trans R Soc Lond B Biol

Sci **369**(1652).

Collingridge, G. L., Isaac, J. T. y Wang, Y. T. (2004). "Receptor trafficking and synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **5**(12): 952-962.

Conboy, L. y Sandi, C. (2010). "Stress at learning facilitates memory formation by regulating AMPA receptor trafficking through a glucocorticoid action." Neuropsychopharmacology **35**(3): 674-685.

Concepcion, C. P., Bonetti, C. y Ventura, A. (2012). "The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease." Cancer J **18**(3): 262-267.

Croce, C. M. (2009). "Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer." Nat Rev Genet **10**(10): 704-714.

Cullen, B. R. (2004). "Transcription and processing of human microRNA precursors." Mol Cell **16**(6): 861-865.

Chamma, I., Chevy, Q., Poncer, J. C. y Levi, S. (2012). "Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission." Front Cell Neurosci **6**: 5.

Chen, C. C., Yang, C. H., Huang, C. C. y Hsu, K. S. (2010). "Acute Stress Impairs Hippocampal Mossy Fiber-CA3 Long-Term Potentiation by Enhancing cAMP-Specific Phosphodiesterase 4 Activity." Neuropsychopharmacology **35**(7): 1605-1617.

De Kloet, E. (2003). "Hormones, brain and stress." Endocr Regul. **37**(2): 51-68.

De Kloet, E. R., Karst, H. y Joels, M. (2008). "Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow." Front Neuroendocrinol **29**(2): 268-272.

De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S. y Joëls, M. (1998). "Brain corticosteroid receptor balance in health and disease." Endocr Rev. **19**(3): 269-301.

Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S. y Soderling, T. R. (2007). "Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **8**(2): 101-113.

Desmedt, A., Marighetto, A., Richter-Levin, G. y Calandreau, L. (2015). "Adaptive emotional memory: the key hippocampal-amygdalar interaction." Stress: 1-12.

Dhabhar, F. S., McEwen, B. S. y Spencer, R. L. (1997). "Adaptation to prolonged or repeated stress comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress." Neuroendocrinology **65**(5): 360-368.

Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K. C. y Tasker, J. G. (2003). "Nongenomic Glucocorticoid Inhibition via Endocannabinoid Release in the Hypothalamus: A Fast Feedback Mechanism." J Neurosci. **23**(12): 4850-4857.

Dweep, H., Sticht, C. y Gretz, N. (2013). "In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions " Current Genomics **14**: 127-136

Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P. y Gretz, N. (2011). "miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes." J Biomed Inform **44**(5): 839-847.

Fanselow, M. S. y Dong, H. W. (2010). "Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?" Neuron **65**(1): 7-19.

Fernandez-Guasti, A., Fiedler, J. L., Herrera, L. y Handa, R. J. (2012). "Sex, stress, and mood disorders: at the intersection of adrenal and gonadal hormones." Horm Metab Res **44**(8): 607-618.

Flores, C. E. y Mendez, P. (2014). "Shaping inhibition: activity dependent structural plasticity of GABAergic synapses." Front Cell Neurosci **8**: 327.

Follert, P., Cremer, H. y Beclin, C. (2014). "MicroRNAs in brain development and function: a matter of flexibility and stability." Front Mol Neurosci **7**: 5.

Gaughwin, P. M., Ciesla, M., Lahiri, N., Tabrizi, S. J., Brundin, P. y Bjorkqvist, M. (2011). "Hsa-miR-

34b is a plasma-stable microRNA that is elevated in pre-manifest Huntington's disease." Hum Mol Genet **20**(11): 2225-2237.

Griggs, E. M., Young, E. J., Rumbaugh, G. y Miller, C. A. (2013). "MicroRNA-182 regulates amygdala-dependent memory formation." J Neurosci **33**(4): 1734-1740.

Groeneweg, F. L., Karst, H., de Kloet, E. R. y Joels, M. (2012). "Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling." Mol Cell Endocrinol **350**(2): 299-309.

Hansen, K. F., Sakamoto, K., Wayman, G. A., Impey, S. y Obrietan, K. (2010). "Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory." PLoS One **5**(11): e15497.

Haramati, S., Navon, I., Issler, O., Ezra-Nevo, G., Gil, S., Zwang, R., Hornstein, E. y Chen, A. (2011). "MicroRNA as repressors of stress-induced anxiety: the case of amygdalar miR-34." J Neurosci **31**(40): 14191-14203.

He, L. y Hannon, G. J. (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet **5**(7): 522-531.

He, M., Liu, Y., Wang, X., Zhang, M. Q., Hannon, G. J. y Huang, Z. J. (2012). "Cell-type-based analysis of microRNA profiles in the mouse brain." Neuron **73**(1): 35-48.

Henshall, D. C. (2014). "MicroRNA and epilepsy: profiling, functions and potential clinical applications." Curr Opin Neurol **27**(2): 199-205.

Herman, J. P., Spencer, R. (1998). "Regulation of Hippocampal Glucocorticoid Receptor Gene Transcription and Protein Expression In Vivo." J Neurosci. **18**(18): 7462-7473

Hewitt, S. A., Wamsteeker, J. I., Kurz, E. U. y Bains, J. S. (2009). "Altered chloride homeostasis removes synaptic inhibitory constraint of the stress axis." Nat Neurosci **12**(4): 438-443.

Hsu, S. D., Tseng, Y. T., Shrestha, S., Lin, Y. L., Khaleel, A., Chou, C. H., Chu, C. F., Huang, H. Y., Lin, C. M., Ho, S. Y., Jian, T. Y., Lin, F. M., Chang, T. H., Weng, S. L., Liao, K. W., Liao, I. E., Liu, C. C. y Huang, H. D. (2014). "miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D78-85.

Impey, S., Davare, M., Lesiak, A., Fortin, D., Ando, H., Varlamova, O., Obrietan, K., Soderling, T. R., Goodman, R. H. y Wayman, G. A. (2010). "An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling." Mol Cell Neurosci **43**(1): 146-156.

Inukai, S., De Lencastre, A., Turner, M. y Slack, F. (2012). "Novel microRNAs differentially expressed during aging in the mouse brain." PLoS One **7**(7): e40028.

Ji, M., Rao, E., Ramachandrareddy, H., Shen, Y., Jiang, C., Chen, J., Hu, Y., Rizzino, A., Chan, W. C., Fu, K. y McKeithan, T. W. (2011). "The miR-17-92 microRNA cluster is regulated by multiple mechanisms in B-cell malignancies." Am J Pathol **179**(4): 1645-1656.

Jimenez-Mateos, E. M., Bray, I., Sanz-Rodriguez, A., Engel, T., McKiernan, R. C., Mouri, G., Tanaka, K., Sano, T., Saugstad, J. A., Simon, R. P., Stallings, R. L., Henshall, D. C. (2011). "miRNA Expression profile after status epilepticus and hippocampal neuroprotection by targeting miR-132." Am J Pathol **179**(5): 2519-2532.

Joëls, M. y Baram, T. (2009). "The neuro-symphony of stress." Nat Rev Neurosci **10**: 459-466
John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C. y Marks, D. S. (2004). "Human MicroRNA targets." PLoS Biol **2**(11): e363.

Karst, H., Karten, Y. J., Reichardt, H. M., de Kloet, E. R., Schütz, G. y Joëls, M. (2000). "Corticosteroid actions in hippocampus require DNA binding of glucocorticoid receptor homodimers."

Nat Neurosci. **3**(10): 977-978.

Kellendonk, C., Gass, P., Kretz, O., Schütz, G. y Tronche, F. (2002). "Corticosteroid receptors in the brain: gene targeting studies." Brain Res Bull. **57**(1): 73-83.

Kim, J. J. y Diamond, D. M. (2002). "The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories." Nat Rev Neurosci **3**(6): 453-462.

Kocerha, J., Faghihi, M. A., Lopez-Toledano, M. A., Huang, J., Ramsey, A. J., Caron, M. G., Sales, N., Willoughby, D., Elmen, J., Hansen, H. F., Orum, H., Kauppinen, S., Kenny, P. J., Wahlestedt, C. (2009). "MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(9): 3507-3512.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. y Tuschl, T. (2002). "Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse." Current Biology **12**: 735-739.

Letellier, M., Elramah, S., Mondin, M., Soula, A., Penn, A., Choquet, D., Landry, M., Thoumine, O. y Favereaux, A. (2014). "miR-92a regulates expression of synaptic GluA1-containing AMPA receptors during homeostatic scaling." Nat Neurosci **17**(8): 1040-1042.

Lewis, B. P., Burge, C. B. y Bartel, D. P. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.

Li, J. H., Liu, S., Zhou, H., Qu, L. H. y Yang, J. H. (2014). "starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D92-97.

Liu, D. Z., Ander, B. P., Tian, Y., Stamova, B., Jickling, G. C., Davis, R. R. y Sharp, F. R. (2012). "Integrated analysis of mRNA and microRNA expression in mature neurons, neural progenitor cells and neuroblastoma cells." Gene **495**(2): 120-127.

Lowy, M. T., Gault, L. y Yamamoto, B. K. (1993). "Adrenalectomy Attenuates Stress-Induced Elevations in Extracellular Glutamate Concentrations in the Hippocampus." J Neurochem. **61**(5): 1957-1960.

Lu, T., Aron, L., Zullo, J., Pan, Y., Kim, H., Chen, Y., Yang, T. H., Kim, H. M., Drake, D., Liu, X. S., Bennett, D. A., Colaiacovo, M. P. y Yankner, B. A. (2014). "REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease." Nature **507**(7493): 448-454.

Lugli, G., Larson, J., Martone, M. E., Jones, Y. y Smalheiser, N. R. (2005). "Dicer and eIF2c are enriched at postsynaptic densities in adult mouse brain and are modified by neuronal activity in a calpain-dependent manner." J Neurochem **94**(4): 896-905.

Lugli, G., Torvik, V. I., Larson, J. y Smalheiser, N. R. (2008). "Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain." J Neurochem **106**(2): 650-661.

Lupien, S. J. y McEwen, B. S. (1997). "The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies." Brain Res Brain Res Rev **24**(1): 1-27.

MacKenzie, G. y Maguire, J. (2015). "Chronic stress shifts the GABA reversal potential in the hippocampus and increases seizure susceptibility." Epilepsy Res **109**: 13-27.

McEwen, B. S. (2003). "Interacting mediators of allostasis and allostatic load: towards an understanding of resilience in aging." Metabolism **52**(10 Suppl 2): 10-16.

McEwen, B. S. y Magarinos, A. M. (2001). "Stress and hippocampal plasticity: implications for the pathophysiology of affective disorders." Hum Psychopharmacol. **16**(S1): S7-S19.

Meerson, A., Cacheaux, L., Goosens, K. A., Sapolsky, R. M., Soreq, H. y Kaufer, D. (2010). "Changes in brain MicroRNAs contribute to cholinergic stress reactions." J Mol Neurosci **40**(1-2): 47-55.

Mellios, N., Sugihara, H., Castro, J., Banerjee, A., Le, C., Kumar, A., Crawford, B., Strathmann, J.,

Tropea, D., Levine, S. S., Edbauer, D. y Sur, M. (2011). "miR-132, an experience-dependent microRNA, is essential for visual cortex plasticity." Nat Neurosci **14**(10): 1240-1242.

Meng, Y., Zhang, Y., Vitali, T., Janus, C., Cruz, L., Jackson, W. Y., MacDonald, J. F., Wang, J. Y., Falls, D. L. y Jiacorrespondence, Z. (2002). "Abnormal Spine Morphology and Enhanced LTP in LIMK-1 Knockout Mice." Neuron **35**: 121-133.

Moghaddam, B. (1993). "Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia." J Neurochem. **60**(5): 1650-1657.

Mukhopadhyay, P., Smalheiser, N. R., Lugli, G., Zhang, H., Rizavi, H., Cook, E. H. y Dwivedi, Y. (2014). "Expression of microRNAs and Other Small RNAs in Prefrontal Cortex in Schizophrenia, Bipolar Disorder and Depressed Subjects." PLoS ONE **9**(1): e86469.

Nakade, Y., Fukuda, H., Iwa, M., Tsukamoto, K., Yanagi, H., Yamamura, T., Mantyh, C., Pappas, T. N. y Takahashi, T. (2007). "Restraint stress stimulates colonic motility via central corticotropin-releasing factor and peripheral 5-HT₃ receptors in conscious rats." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. **292**(4): 1037-1044.

Nakade, Y., Mantyh, C., Pappas, T. N. y Takahashi, T. (2007). "Fecal pellet output does not always correlate with colonic transit in response to restraint stress and corticotropin-releasing factor in rats." J Gastroenterol **42**(4): 279-282.

Natera-Naranjo, O., Aschrafi, A., Gioio, A. E. y Kaplan, B. B. (2010). "Identification and quantitative analyses of microRNAs located in the distal axons of sympathetic neurons." RNA **16**(8): 1516-1529.

Neves, G., Cooke, S. F. y Bliss, T. V. (2008). "Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality." Nat Rev Neurosci **9**(1): 65-75.

Osborne, D. M., Pearson-Leary, J. y McNay, E. C. (2015). "The neuroenergetics of stress hormones in the hippocampus and implications for memory." Front Neurosci. **9**(164).

Ostroff, L. E., Fiala, J. C., Allwardt, B. y Harris, K. M. (2002). "Polyribosomes Redistribute from Dendritic Shafts into Spines with Enlarged Synapses during LTP in Developing Rat Hippocampal Slices." Neuron **35**: 535-545.

Panagiotakopoulos, L. y Neigh, G. N. (2014). "Development of the HPA axis: where and when do sex differences manifest?" Front Neuroendocrinol **35**(3): 285-302.

Pichiorri, F. (2008). "MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 12885-12890.

Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S. y Sanacora, G. (2012). "The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission." Nat Rev Neurosci **13**(1): 22-37.

Revollo, J. R. y Cidlowski, J. A. (2009). "Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling." Ann N Y Acad Sci **1179**: 167-178.

Rinaldi, A., Vincenti, S., De Vito, F., Bozzoni, I., Oliverio, A., Presutti, C., Fragapane, P. y Mele, A. (2010). "Stress induces region specific alterations in microRNAs expression in mice." Behav Brain Res **208**(1): 265-269.

Saab, B. J. y Mansuy, I. M. (2014). "Neuroepigenetics of memory formation and impairment: The role of microRNAs." Neuropharmacology **80C**: 61-69.

Savory, J. G., Prefontaine, G. G., Lamprecht, C., Liao, M., Walther, R. F., Lefebvre, Y. A. y Hache, R. J. (2001). "Glucocorticoid Receptor Homodimers and Glucocorticoid-Mineralocorticoid Receptor Heterodimers Form in the Cytoplasm through Alternative Dimerization Interfaces." Mol Cell Biol **21**(3):

781-793.

Schratt, G. M., Nigh, E. A., Chen, W. G., Hu, L. y Greenberg, M. E. (2004). "BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development." J Neurosci **24**(33): 7366-7377.

Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M. y Greenberg, M. E. (2006). "A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development." Nature **439**(7074): 283-289.

Sebastian, V., Estil, J. B., Chen, D., Schrott, L. M. y Serrano, P. A. (2013). "Acute physiological stress promotes clustering of synaptic markers and alters spine morphology in the hippocampus." PLoS One **8**(10): e79077.

Siegel, G., Obernosterer, G., Fiore, R., Oehmen, M., Bicker, S., Christensen, M., Khudayberdiev, S., Leuschner, P. F., Busch, C. J., Kane, C., Hübel, K., Dekker, F., Hedberg, C., Rengarajan, B., Drepper, C., Waldmann, H., Kauppinen, S., Greenberg, M. E., Draguhn, A., Rehmsmeier, M., Martinez, J. y Schratt, G. M. (2009). "A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the depalmitoylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis." Nat Cell Biol. **11**(6): 705-716.

Tamminga, C. A., Zukin, R.S. (2015). "Schizophrenia: Evidence implicating hippocampal GluN2B protein and REST epigenetics in psychosis pathophysiology." Neuroscience. pii: S0306-4522(15)00652-1.

Ulloa, J. L., Castañeda, P., Berrios, C., Diaz-Veliz, G., Mora, S., Bravo, J. A., Araneda, K., Menares, C., Morales, P. y Fiedler, J. L. (2010). "Comparison of the antidepressant sertraline on differential depression-like behaviors elicited by restraint stress and repeated corticosterone administration." Pharmacol Biochem Behav **97**(2): 213-221.

Venero, C. y Borrell, J. (1999). "Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats." Eur J Neurosci **11**(7): 2465-2473.

Vetere, G., Barbato, C., Pezzola, S., Frisone, P., Aceti, M., Ciotti, M., Cogoni, C., Ammassari-Teule, M. y Ruberti, F. (2014). "Selective inhibition of miR-92 in hippocampal neurons alters contextual fear memory." Hippocampus **24**(12): 1458-1465.

Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana, Rao, BS., Chattarji, S. (2002). "Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons." J Neurosci **22**(15): 6810-6818.

Walker, R. M., Rybka, J., Anderson, S. M., Torrance, H. S., Boxall, R., Sussmann, J. E., Porteous, D. J., McIntosh, A. M. y Evans, K. L. (2015). "Preliminary investigation of miRNA expression in individuals at high familial risk of bipolar disorder." J Psychiatr Res **62**: 48-55.

Wayman, G. A., Davare, M., Ando, H., Fortin, D., Varlamova, O., Cheng, H. Y., Marks, D., Obrietan, K., Soderling, T. R., Goodman, R. H., Impey, S. (2008). "An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(26): 9093-9098.

Wingenfeld, K. y Wolf, O. T. (2014). "Stress, memory, and the hippocampus." Front Neurol Neurosci **34**: 109-120.

Yang, J. H., Li, J. H., Shao, P., Zhou, H., Chen, Y. Q. y Qu, L. H. (2011). "starBase: a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data." Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D202-209.

Yang, Y., Shu, X., Liu, D., Shang, Y., Wu, Y., Pei, L., Xu, X., Tian, Q., Zhang, J., Qian, K., Wang, Y. X., Petralia, R. S., Tu, W., Zhu, L. Q., Wang, J. Z. y Lu, Y. (2012). "EPAC null mutation impairs learning and social interactions via aberrant regulation of miR-124 and Zif268 translation." Neuron **73**(4): 774-788.

Yuen, E. Y., Liu, W., Karatsoreos, I. N., Ren, Y., Feng, J., McEwen, B. S., Yan, Z. (2011). "Mechanisms

for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory." Mol Psychiatry **16**(2): 156-170.

Yuen, E. Y., Wei, J., Liu, W., Zhong, P., Li, X., Yan, Z. (2012). "Repeated Stress Causes Cognitive Impairment by Suppressing Glutamate Receptor Expression and Function in Prefrontal Cortex." Neuron **73**(5): 962–977.

10. ANEXO

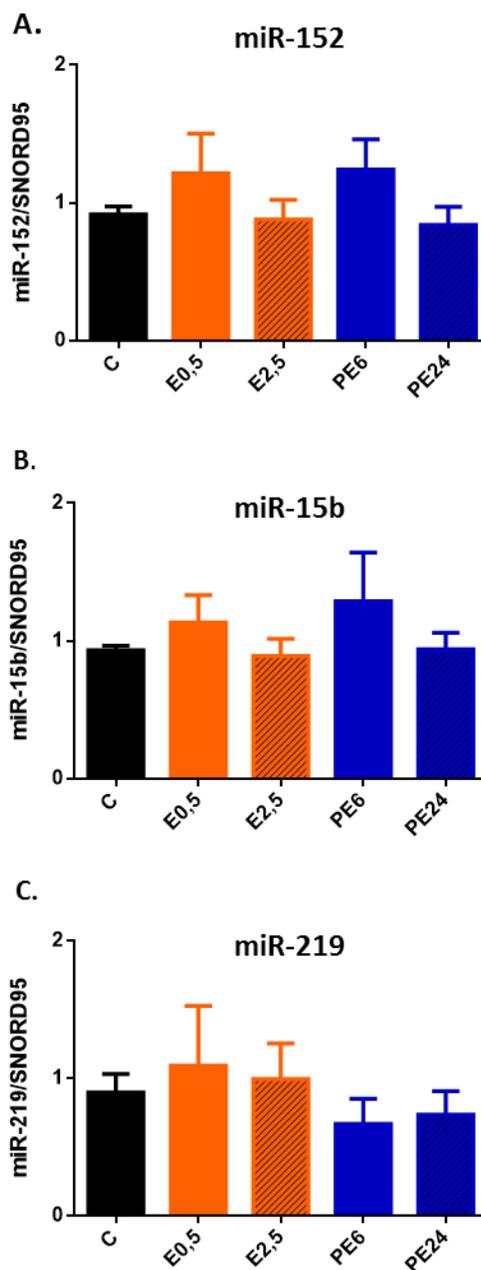


Figura I. Los niveles de miR-152, miR-15b y miR-219 no cambian durante y posterior al período de estrés agudo. Se utilizó un input de 200 pg de cADN para todas las cuantificaciones del qPCR. Los niveles de miARNs fueron normalizados por *SNORD95* y calibradas por un animal control. Los resultados representan el promedio \pm EEM. Control (C) $n=3$ para todas las condiciones, $n=4$ para todas las otras condiciones. (A) $P=0,6937$; (B) $P= 0,8632$ y (C) $P=0,7145$ respectivamente. No se observó cambios significativos a ninguna temporalidad de estrés y post-estrés. Estos datos se analizaron por análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, con post test de Dunn.

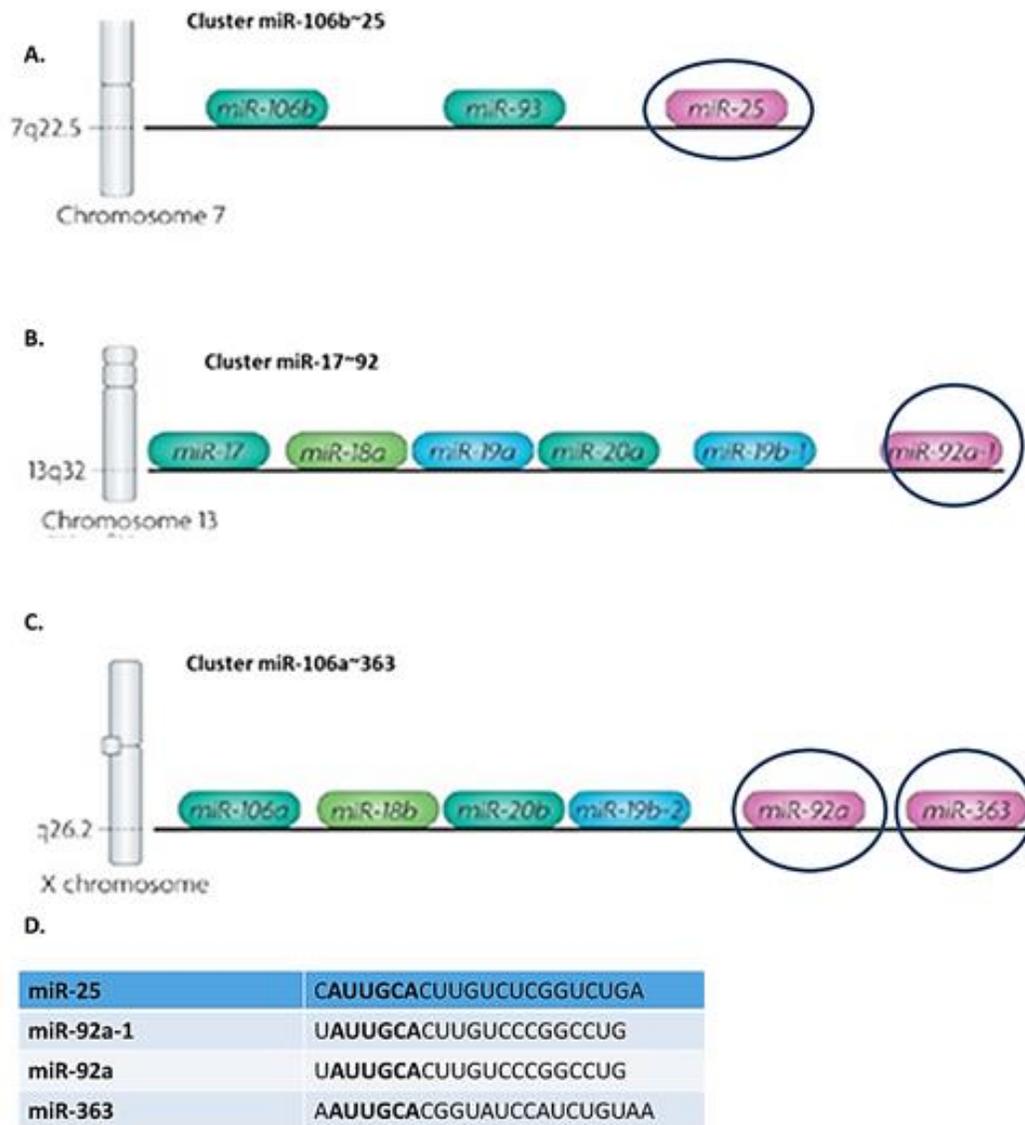


Figura II. Organización genómica de los tres clúster parálogos de miR-92a. En las figuras se muestran los clúster que tienen en común la secuencia semilla de miR-92a. **(A)** clúster miR-106b~25 (cromosoma 7), **(B)** miR-106a~363 (cromosoma X) y **(C)** miR-17~92 (cromosoma 13). En **(D)** se detallan las secuencias respectivamente y se resaltan en negro las secuencias semillas, siendo la de miR-92a idéntica entre el clúster miR-106a~363 y miR-17~92, vale decir, entre miR-92a y miR-92a-1. A su vez, comparte secuencia semilla con miembros de estos clúster, miR-25 y miR-363. Modificada de (Croce, 2009; Concepcion y cols., 2012).

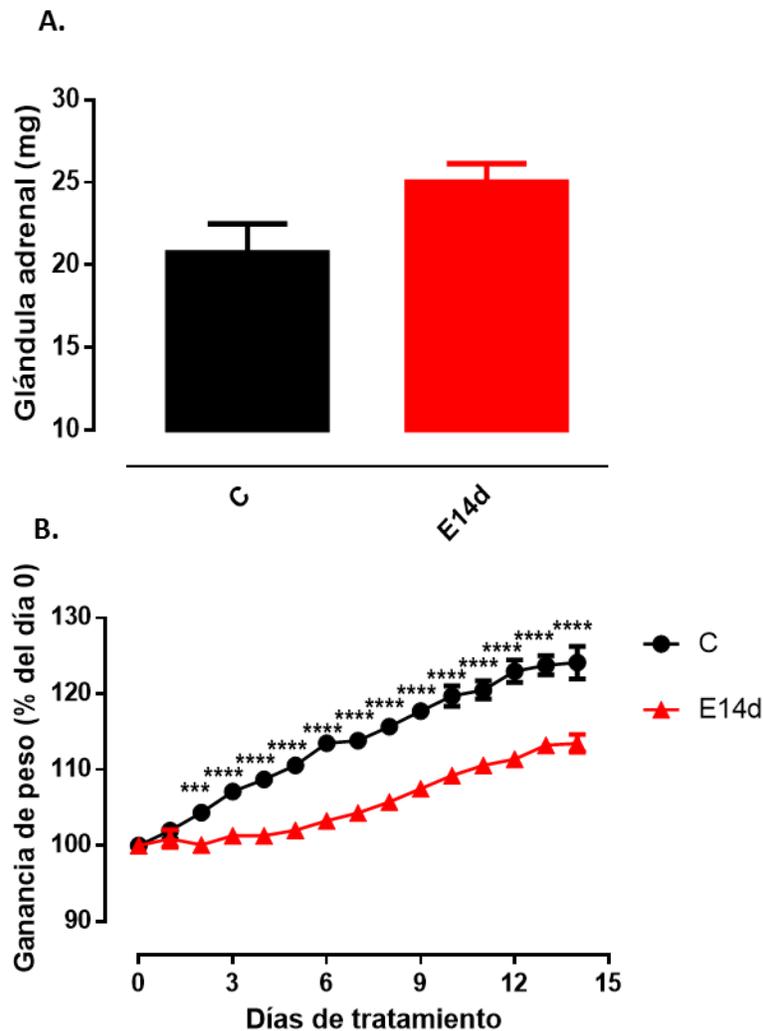


Figura III. El estrés crónico promueve una disminución en la ganancia de peso y aumento de las glándulas adrenales. (A) Peso de las glándulas adrenales; (n=4, P= 0,1000). (B) Ganancia de peso desde el día 0 al 15 del tratamiento de estrés crónico por restricción de movimiento. Se observa una disminución significativa en la ganancia de peso entre E14d respecto al control a pesar de constar con comida y agua ad libitum; (n=4, P= < 0,0001). Los datos representan el promedio \pm EEM de animales. Se analizaron (A) T-test no paramétrico de Mann Whitney, análisis de una cola y (B) Two-way ANOVA, Sidak test de múltiple comparación. *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001, ****p < 0,0001.**

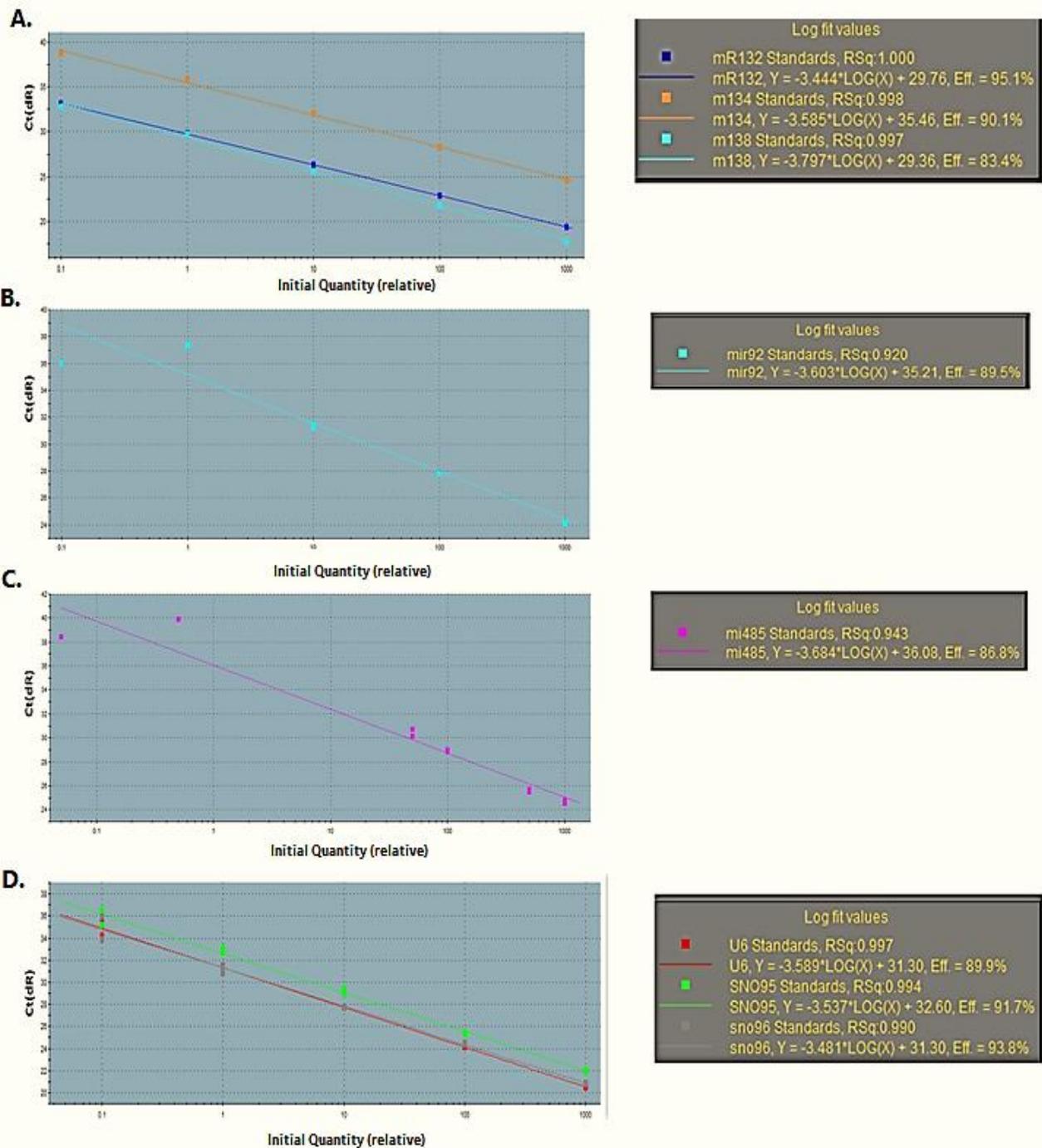


Figura IV. Curvas de calibración de los partidores utilizados. (A) Curva para los partidores miR-132, miR-134, miR-138 **(B)** miR-92a; **(C)** miR-485; **(D)** U6, SNORD95, SNORD96. Todas las curvas se realizaron a partir de diluciones seriadas de una mezcla de cADN, en A y D se utilizaron tres diluciones (10-1000 pg) para realizar la curva, para B y C se utilizaron cinco diluciones (0,1-1000 pg). Todas las cuantificaciones se realizaron en duplicado, y se utilizó agua como control.

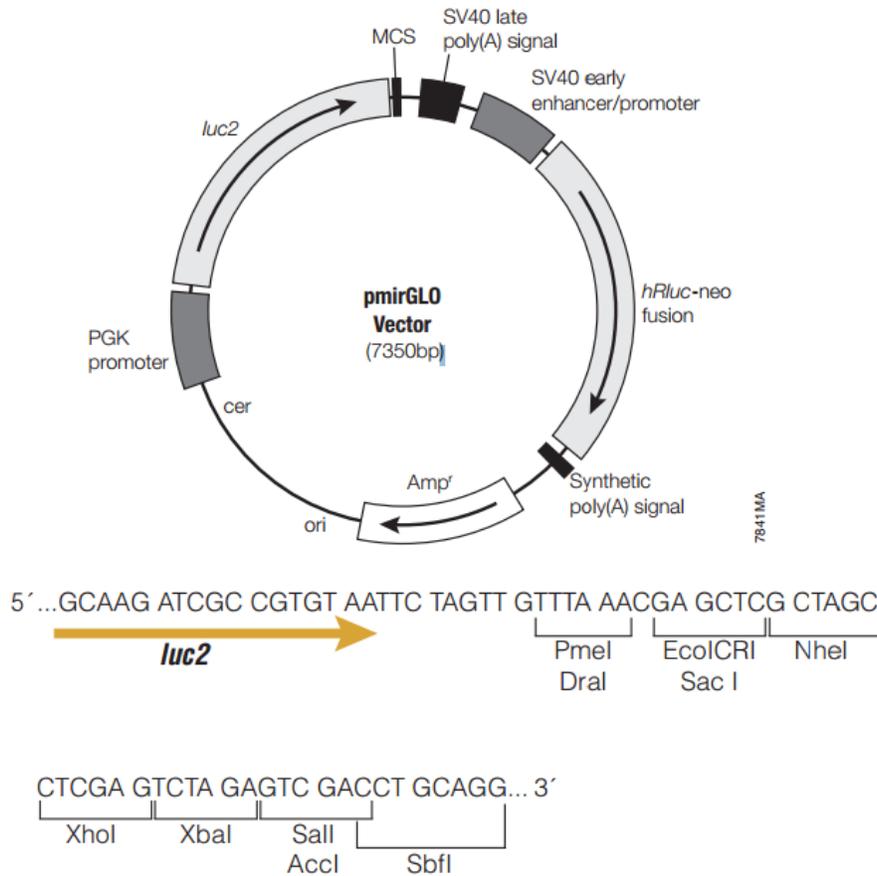


Figura V. Vector pmirGLO utilizado para la clonación de los 3'UTR blanco de miR-92a. Ilustración del plasmidio comercial utilizado de 7350 pares de bases, donde se muestra el sitio de múltiple clonamiento (MCS) con los respectivos sitios de corte para las enzimas de restricción, promotores virus 40 vacuolado del simio, SV40 y fosfoglicerato quinasa, PGK, resistencia a ampicilina (Amp^r), señales de término de la transcripción (PoliA), y los genes de luciferasa de renilla humanizada-resistente a neomicina (hRluc-neo) y para el gen reportero de luciferasa de luciérnaga (*luc2*).

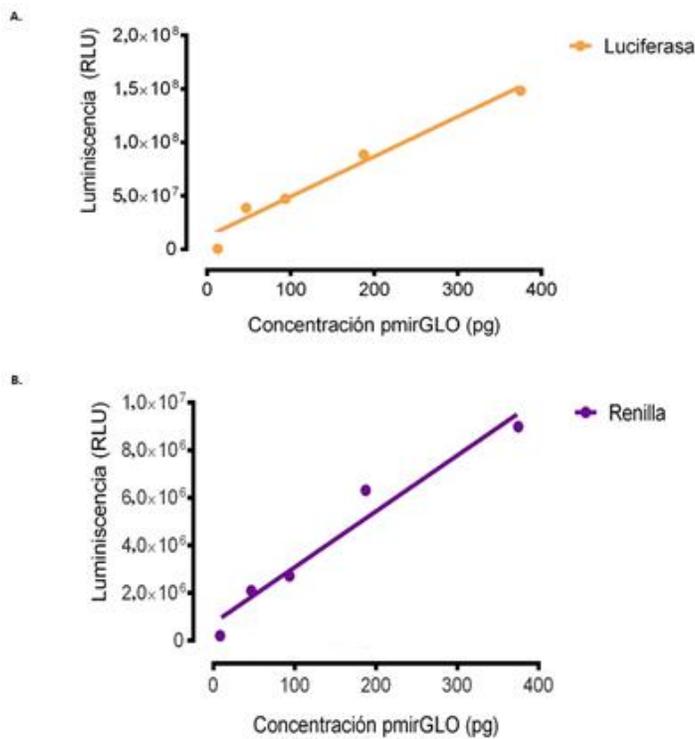


Figura VI. Curva de luminiscencia versus concentración de plasmidio pmirGLO. Se estandarizó de acuerdo a diluciones seriadas del plasmidio pmirGLO (0, 10, 47, 190, 380 ng) para luciferasa y renilla independientemente en comparación a la proporción entre luciferasa/ renilla para cada condición.

Tabla I. Resumen búsqueda bioinformática de blancos putativos a evaluar de miR-92a.

Human ortholog of target gene	Gene name	Conserved sites				Total context+ score	Aggregate P _{CT}	MirWalk Match
		total	8mer	7mer-m8	7mer-1A			
KCC2	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporter)	4	2	0	2	-0.69	>0.99	5
KAT2B	K(lysine) acetyltransferase 2B	1	1	0	0	-0.42	0.89	4
REST	RE1-silencing transcription factor	1	1	0	0	-0.32	0.78	1
MEF2D	transcription factor myocyte enhancer factor 2D	1	1	0	0	-0.12	0.95	1

En esta tabla se describen los cuatro blancos de miR-92a que fueron evaluados por ensayo de reportero de luciferasa, la clasificación por columna fue: Nombre del blanco, nombre del gen, sitios de unión a la secuencia semilla y su conservación, puntuación total “context score” según TargetScan, Valor agregado (P_{CT}), y coincidencia entre las bases de datos reportada por MirWalk.

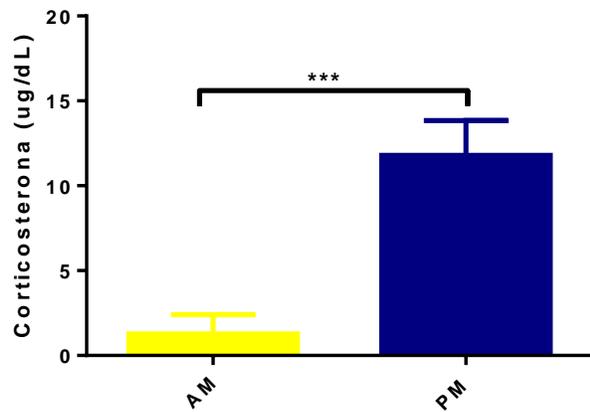


Figura VII. Perfil de secreción de corticosterona durante el día en ratas macho. Se muestra el perfil de regulación de la hormona CORT en ratas macho adultas (2 meses) Sprague Dawley, la cual alcanza sus máximos niveles al anochecer (aproximadamente 6:00- 8:00 pm) donde las ratas comienzan su mayor actividad; $P= 0,0003$. Se muestra en amarillo el horario en el cual se trabajó en el modelo (9:00 am- 12:00 pm), con los niveles más bajos de CORT, para asegurar que los aumentos de CORT observados sean producto del estrés y no del ciclo circadiano normal. Análisis t-test no paramétrico de Mann Whitney, análisis de una cola. *** $p<0,001$. **(Datos no publicados del Laboratorio de Neuroplasticidad y Neurogenética)**