

**Universidad  
Nacional  
de San Martín**

**Efecto epigenético intra e intergeneracional  
de la deficiencia de ácido fólico sobre el  
desarrollo neural y de las células de la cresta  
neural embrionaria**

**Genetista Biotecnólogo Nagif Alata Jimenez**

Director: Dr. Pablo Hernán Strobl-Mazzulla

Co-director: Dr. Juan Ignacio Fernandino

Trabajo de tesis doctoral para optar por el título de “Doctor en Biología  
Molecular y Biotecnología”

Laboratorio de Biología del Desarrollo (LBD), INTECH-UNSAM, Chascomús

Genet. Biotec. Nagif Alata Jimenez

Doctorando

Dr. Pablo H. Strobl-Mazzulla

Director

Dr. Juan I. Fernandino

Co-director

“Nuestro miedo más profundo no es que seamos inadecuados. Nuestro miedo más profundo es que seamos poderosos inconmensurablemente. Es nuestra luz no nuestra oscuridad la que nos asusta. Nos preguntamos: ¿quién soy yo para ser brillante, hermoso, talentoso, fabuloso? Pero en realidad, ¿quién eres para no serlo?” ... “Y al dejar que nuestra luz brille, inconscientemente le damos permiso al resto de la gente a hacer lo mismo. Al ser liberados de nuestro propio miedo, nuestra presencia automáticamente libera a otros”.

Nuestro Miedo Más Profundo

~Marianne Williamso~

## AGRADECIMIENTOS

A las entidades que financiaron este proyecto: CONICET y al gobierno argentino que me dieron la oportunidad de realizar un doctorado en Biología Molecular y Biotecnología.

A las entidades que me permitieron realizar este proyecto: INTECH, UNSAM; ya que me permitieron ser parte del doctorado y conocer muchas personas y compañeros de trabajo durante mi estancia.

A mi director, Dr. Pablo Strobl-Mazzulla, y co-director, Dr. Juan Fernandino, por permitirme realizar este proyecto en su laboratorio, por enseñarme a pensar y cuestionar como un científico. Por su apoyo en la realización de esta tesis y por la confianza para sacar adelante este proyecto.

Al Dr. Leandro Miranda, a la Dra. Natalia de Miguel, a la Dra. María Corvi, a la Dra. Valeria Sander por haber sido mis asesores internos y al Dr. Juan Pablo Fededa por haber sido mi asesor externo y haberme dado sugerencias durante todo este periodo.

Al laboratorio de Biología del Desarrollo (INTECH), muchas gracias, Luisa Arias Padilla, Omar Moreno Costa, Yanel Bernardi, Agustin Boan, Diana Castañeda, Natalia Pagliaro, Rocío Marquéz, Luciana Scaturice, Nicola Vasquéz por haberme acompañado durante mis años en el laboratorio y por haberme ayudado en cada momento.

A la comunidad del INTECH, instituto que me permitió crecer personal y académicamente, así como conocer excelentes personas e investigadores. Un agradecimiento especial a Carina López por su inmenso trabajo en histología.

A mis mejores amigos del INTECH, Lu Arias, Marian Odrionzola, Diana Dip, Omar, Yanel, Pame, Tania, Agus Ganuza que estuvieron a mi lado en todo momento y siempre me ayudaron en cada etapa de mi crecimiento y me regalaron los mejores momentos que uno pueda tener. A pesar de la distancia siempre han sido y serán la mejor compañía que pueda tener.

A la comunidad del Chascomús, por haberme demostrado que no importa el lugar ni el tiempo, uno siempre puede encontrar un lugar al que puede llamar hogar. En especial a Meli, Lau, Sofi, los chicos del Dojo Serpiente, de Taekwondo, del windsurf, y al Dr. Gustavo Somoza por mostrarme que el deporte va de la mano de la ciencia.

Un agradecimiento muy especial a mi familia; a mi papá Alejandro, a mi mamá Lidia y a mi hermana Shady, que siempre me apoyaron en todo momento brindándome sus consejos, sus palabras de aliento y sobre todo por la compañía que me brindaron a pesar de la distancia. Muchas gracias por todo eso, los quiero un montón.

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>I.- INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	12
<b>II.- CAPÍTULO I: ROL DEL FOLATO EN EL CONTROL EPIGENÉTICO DE LA ESPECIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA CRESTA NEURAL</b> .....	16
<b>2.1.- Marco Teórico</b> .....	16
<b>2.1.1 Cresta Neural</b> .....	16
<b>2.1.2 Folato y defectos congénitos</b> .....	23
<b>2.1.3 Epigenética</b> .....	28
<b>2.2.- Resultados</b> .....	34
<b>2.2.1- Efecto de la deficiencia de folato en los mecanismos epigenéticos: metilación de las histonas y del ADN durante el desarrollo embrionario de la cresta neural</b> .....	34
<b>2.2.2.- Efecto de la deficiencia de folato en el desarrollo de la cresta neural y sus derivados orofaciales durante el desarrollo embrionario</b> .....	40
<b>2.3.- Discusión y conclusión</b> .....	50
<b>III.- CAPÍTULO II: ROL DEL TRANSPORTADOR <i>Rfc1</i> EN LA METILACIÓN DEL ADN Y POTENCIALIDAD CELULAR DE LOS PROGENITORES DEL BORDE DE LA PLACA NEURAL</b> .....	54
<b>3.1.- Marco Teórico</b> .....	54
<b>3.1.1 Borde de la Placa Neural (BPN)</b> .....	54
<b>3.1.2 Dinámica de metilación del ADN y potencialidad celular</b> .....	58

<b>3.2.- Resultados</b> .....	62
<b>3.2.1.- Distribución espaciotemporal de los genes involucrados en la dinámica del ADN y abundancia de 5mC y 5hmC durante el desarrollo del borde de la placa neural</b> .....	62
<b>3.2.2 Efecto de la deficiencia de <i>Rfc1</i> en las marcas epigenéticas 5mC y 5hmC durante el desarrollo del borde de la placa neural</b> .....	67
<b>3.2.3 Efecto de la deficiencia del transportador <i>Rfc1</i> en la metilación del ADN y potencialidad de las células del borde de la placa neural</b> .....	68
<b>3.3.- Discusión y conclusión</b> .....	77
<b>3.4.- Materiales y Métodos del Capítulo I y II</b> .....	81
<b>IV.- CAPÍTULO III: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PATERNA A METOTREXATO EN EL DESARROLLO DE LA DESCENDENCIA Y ABUNDANCIA DE sncRNAs ESPERMÁTICOS DEL PADRE</b> .....	90
<b>4.1.- Marco Teórico</b> .....	90
<b>4.1.1 El folato y el efecto materno en el desarrollo</b> .....	90
<b>4.1.2 Herencia epigenética paterna</b> .....	91
<b>4.1.3 Metotrexato, folato y desarrollo embrionario</b> .....	98
<b>4.2.- Resultados</b> .....	101
<b>4.2.1 Efecto de la exposición paterna a metotrexato en el desarrollo de la descendencia</b> .....	101
<b>4.2.2 Efecto de la exposición paterna a metotrexato en la abundancia de sncRNAs espermáticos y sus modificaciones postranscripcionales</b> .....	105
<b>4.2.3 Impacto de los sncRNAs paternos (afectados) en el desarrollo de la descendencia</b> .....	113

<b>V.- RELEVANCIA DEL ESTUDIO.....</b>	<b>130</b>
<b>VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>131</b>
<b>VI.- ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>158</b>

## RESUMEN

El folato es una vitamina esencial que ingresa a las células a través de sus transportadores FOLR1 y RFC1. Luego, es metabolizado hasta S-adenosilmetionina (SAM) y actúa como donador universal para la metilación del ARN, ADN y proteínas – principales mecanismos epigenéticos. La deficiencia materna de esta vitamina ocasiona serios defectos en el desarrollo neural y de la cresta neural fetal, sin embargo, hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares subyacentes a dichos defectos. La presente tesis se divide en tres capítulos en donde indagamos el efecto de la deficiencia de folato en: 1- la especificación de la cresta neural; 2- la inducción del borde de la placa neural; y 3- la herencia paterna intergeneracional.

- 1- En el primer capítulo, utilizando embriones de pollo, demostramos que la pérdida de función de los transportadores de folato *FolR1* y *Rfc1* reduce la metilación del ADN e histona H3, expandiéndose ectópicamente la expresión del marcador neural *Sox2* a expensas del territorio de la cresta neural. Este cambio de destino ocurre como consecuencia de una disminución en los niveles de metilación en el locus *Sox2* en la cresta neural. Estos cambios moleculares y celulares ocasionaron un desarrollo anormal de estructuras orofaciales.
- 2- En el segundo capítulo, demostramos que el borde de la placa neural (BPN), lugar en donde se originan principalmente las células de la cresta neural y de las placodas sensoriales, posee un perfil distintivo de transportadores de folato, metilasas y demetilasas de ADN, así como también de las marcas epigenéticas 5mC y 5hmC. El análisis de metilación por bisulfito ante la pérdida de función del principal transportador de folato presente en este territorio, *Rfc1*, demostró generar regiones diferencialmente metiladas (RDM) en el locus de *Notch1*, siendo este uno de los genes principalmente involucrado en la segregación territorial del BPN de los tejidos colindantes. Esto generó una expansión ectópica de la expresión de *Notch1*, y su blanco funcional *Bmp4*, lo cual ocasionó un aumento en la potencialidad de estos progenitores presentes en el BPN.
- 3- En el tercer capítulo, evaluamos el efecto de la exposición de peces machos adultos (*Oryzias latipes*) al inhibidor de folato metotrexato (MTX) y su efecto en el desarrollo de la descendencia.



Nuestros resultados demostraron que la descendencia presentaba defectos craneofaciales, así como también encontramos un aumento en mitades 5' de ciertos tRNAs espermáticos y de modificación 5mC presentes en dichos ARNs. Finalmente, pudimos demostrar que la sola inyección cigóticas de los ARNs espermáticos alterados ante el tratamiento con MTX era capaz de recapitular parcialmente los fenotipos craneofaciales observados en la descendencia.

En conjunto, demostramos la importancia que tiene el folato a nivel intra- e intergeneracional durante el desarrollo embrionario.

***PALABRAS CLAVES: folato, epigenética, cresta neural, metotrexato, fragmentos derivados de tRNAs (tsRNAs)***

## ABSTRACT

Folate is an essential vitamin that is uptaken by cells via folate transporters FOLR1 and RFC1. Then, it is metabolized until S-adenosylmethionine (SAM) and acts as a universal donor for DNA, RNA, and protein methylation – main epigenetic mechanisms. Maternal folate deficiency generates severe defects on the fetal development of neural and neural crest, however, there are not molecular mechanisms that are linked to those defects. This thesis is divided into three chapters, and we look into the effects of folate deficiency on: 1.- neural crest specification; 2.- neural plate border induction; and 3.- intergenerational paternal inheritance.

- 1- In the first chapter, by using chick embryos, we demonstrated that the loss of function of folate transporters *FolR1* and *Rfc1* reduces DNA and histone H3 methylation, and ectopically expands the neural marker *Sox2* to the detriment of the neural crest territory in chicken. This change in cellular fate is due to a reduction of methylation levels at *Sox2* locus in neural crest. These molecular and cellular changes led to an abnormal development of orofacial structures.
- 2- In the second chapter, we demonstrated that the neural plate border (NPB), region where neural crest and sensory placodes cells arise from, has distinguishing profile for folate transporters, DNA methylases and demethylases, as well as for the epigenetic marks 5mC and 5hmC. Methylation analysis by bisulfite after loss of function of the folate transporter that is expressed in this territory, *Rfc1*, generated differentially methylated regions (DMRs) at the *Notch1* locus, one of the main genes that is involved in territorial segregation of adjacent tissues to NPB. This led to an ectopic expansion of *Notch1* expression, and its functional target *Bmp4*, which increases the potency of these progenitors in the NPB.
- 3- In the third chapter, we evaluated the effect of adult male fish exposure (*Oryzias latipes*) to a folate inhibitor methotrexate (MTX) and its effect on offspring's development. Our results demonstrated that the offspring developed craniofacial defects, as well as we also found an increase of 5' halves of specific spermatic tRNAs, and 5mC modification at those ARNs. Finally,

we could demonstrate that the zygote injection of spermatic RNAs which are altered by MTX treatment is able to partially recapitulate the observed craniofacial phenotypes on the offspring.

In conclusion, we have demonstrated the importance of folate at intra- and intergenerational levels during embryonic development.

**KEYWORDS:** *folate, epigenetics, neural crest, methotrexate, tRNAs-derived fragments (tsRNAs)*

## I.- INTRODUCCIÓN GENERAL

El folato – y su forma sintética, el ácido fólico - es una vitamina hidrosoluble esencial para los vertebrados que es obtenida a partir de la dieta <sup>1</sup>. Esta vitamina se encuentra en el sistema circulatorio en forma de 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) e ingresa (principalmente) a las células por medio del receptor de membrana FOLR1 (alta afinidad) y el transportador RFC1 (baja afinidad, responsable de la mayor parte de transporte a través de la membrana) <sup>2-4</sup>. La deficiencia de esta vitamina durante el desarrollo embrionario temprano conlleva a severos defectos en la formación del tubo neural (como espina bífida, anencefalia, microcefalia) y diversas neurocristopatías (como defectos craneofaciales) <sup>5-11</sup>, los cuales se originan por la alteración del epitelio neural y de las células de la cresta neural <sup>5-8</sup>, respectivamente.

El tubo neural y la cresta neural son dos estructuras formadas a partir de progenitores ectodérmicos durante etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. La formación del tubo neural se da mediante el proceso de neurulación, el cual inicia con la inducción de la placa neural a través de la inhibición de señales inductoras de la epidermis como los BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*, siglas en inglés) <sup>12</sup> y la expresión de FGFs (*Fibroblast Growth Factor*, siglas en inglés). Posteriormente, se produce la elevación de los bordes laterales de la placa neural los cuales se mueven hacia la línea media para finalmente fusionarse y formar el tubo neural <sup>13,14</sup>. El desarrollo del tubo neural culmina con la formación del Sistema Nervioso Central y la medula espinal. Por otro lado, la cresta neural es una población transitoria de células multipotentes que se origina entre la placa neural y el ectodermo no-neural, en el borde de la placa neural. El desarrollo de la cresta neural comienza durante la gastrulación con el proceso de inducción del borde de la placa neural a través de un gradiente de morfógenos tales como WNTs (*Wingless-INT*, siglas en inglés),

BMPs, y FGF provenientes tanto de las regiones laterales y de la región media del embrión<sup>15</sup>. Posteriormente, estas células se especifican mediante la expresión de factores especificadores como *Tfap2a*, *Pax3/7*, *Msx1* ubicándose finalmente en la parte dorsal del tubo neural desde donde delaminarán y migrarán largas distancias hasta alcanzar su destino, en donde se diferenciarán<sup>16,17</sup>. Es importante destacar que las células de la cresta neural originan la mayoría de los huesos y cartílagos craneofaciales, células neuronales y gliales del sistema nervioso periférico, células medulares de la glándula suprarrenal y los melanocitos<sup>18,19</sup>, por lo que la comprensión de los procesos moleculares que regulan su formación puede permitir un adecuado entendimiento de los defectos asociados a sus derivados celulares y estructurales.

Por otro lado, el 5-MTHF es utilizado para la síntesis de purinas y S-adenosilmetionina (SAM), este último sirve como sustrato para la metilación del ADN, ARN y proteínas<sup>20</sup>. Las metilaciones de ácidos nucleicos e histonas son importantes mecanismos epigenéticos que regulan el desarrollo embrionario temprano mediante la regulación de la expresión génica. En particular, diversos trabajos han demostrado que estos mecanismos son importantes para el desarrollo neural<sup>21,22</sup> y de la cresta neural<sup>23–26</sup>. Es interesante mencionar que durante el desarrollo embrionario la metilación y demetilación del ADN juegan un rol importante, y los cambios en sus distribuciones permiten a las células progenitoras adquirir destinos celulares específicos<sup>27–30</sup>. Dichos cambios en la metilación son generados por las metiltransferasas de ADN (*Dnmts*, DNA MethylTransferases – siglas en inglés) y las demetilinasas del ADN (*Tets*, Ten-ElevenTranslocation – siglas en inglés)<sup>31</sup>, sugiriendo que durante etapas tempranas existe una dinámica en los procesos de metilación/demetilación del ADN y que cualquier perturbación en dicha dinámica podría generar efectos adversos en desarrollo embrionario. A pesar de todos estos estudios, hasta el momento no existen trabajos que aborden la mecánica

molecular, principalmente a nivel epigenético, de los cambios ocasionados por la deficiencia de ácido fólico y su rol sobre el desarrollo del tubo neural y de las células de la cresta neural. En este contexto, los capítulos 1 y 2 de esta tesis trataron de ahondar sobre estos interrogantes.

Durante décadas, la mayoría de los estudios se han focalizado en comprender y relacionar cómo la deficiencia materna de folato, o el uso de medicamentos anti folato como el metotrexato (MTX), pueden generar defectos en el normal desarrollo del feto <sup>32-35</sup>. Sin embargo, también existen este tipo de asociaciones en la herencia paterna, aunque hasta el momento los estudios son sólo correlaciones y la posible mecánica molecular no había sido indagada <sup>36,37</sup>. En la última década se han incrementado el número de evidencias – desde gusanos hasta mamíferos- mostrando que la exposición paterna a diversos estresores ambientales puede influenciar el desarrollo, el comportamiento y/o el metabolismo de la descendencia a través de mecanismos epigenéticos y epitranscriptómicos <sup>38,39</sup>. El fenotipo paterno generado por una exposición a diferentes dietas <sup>40-44</sup> o estrés <sup>45-47</sup> puede ser heredado de una manera no Mendeliana, demostrando que las experiencias paternas pueden ser memorizadas en el espermatozoide como información epigenética <sup>48-50</sup>. Sin embargo, tanto el cigoto como las células germinales sufren en gran medida un proceso de reprogramación epigenética <sup>51</sup> planteando la idea de la existencia de otras moléculas capaces de transmitir la información a través del espermatozoide. En ese sentido, los ARNs pequeños no codificantes (sncRNAs) escapan el proceso de reprogramación <sup>52</sup>, siendo estos también capaces de regular la metilación del ADN, la modificación de histonas y la transcripción/traducción en el embrión en desarrollo <sup>53</sup>. Dentro de las diferentes poblaciones de sncRNAs, los microARNs (miRNAs, siglas en inglés) y los fragmentos derivados de tRNAs (tsRNAs, siglas en inglés) han mostrado tener un potencial en la transmisión de experiencias paternas <sup>40-47,54-57</sup>. Adicionalmente, los

sncRNAs se caracterizan por poseer un gran número de modificaciones postranscripcionales <sup>58-61</sup>, siendo la metilación una de las marcas más asociadas con la biogénesis, estabilidad y funcionalidad de estos <sup>56,62,63</sup>. En relación con ello, se ha visto que el estrés producido en los padres puede alterar el nivel de modificaciones postranscripcionales <sup>54,56</sup> sugiriendo un posible vínculo entre la metilación de los sncRNAs (epitranscriptoma) y la transmisión de experiencias paternas hacia la descendencia. En este contexto, el capítulo 3 de esta tesis se centrará en evaluar el rol de la exposición paterna a MTX y su rol en los cambios trascríptómicos y epitranscriptómicos de sncRNAs espermáticos y las consecuencias de dichos cambios en el desarrollo de la descendencia.

## II.- CAPÍTULO I: ROL DEL FOLATO EN EL CONTROL EPIGENÉTICO DE LA ESPECIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LA CRESTA NEURAL

### 2.1.- Marco Teórico

#### 2.1.1 Cresta Neural

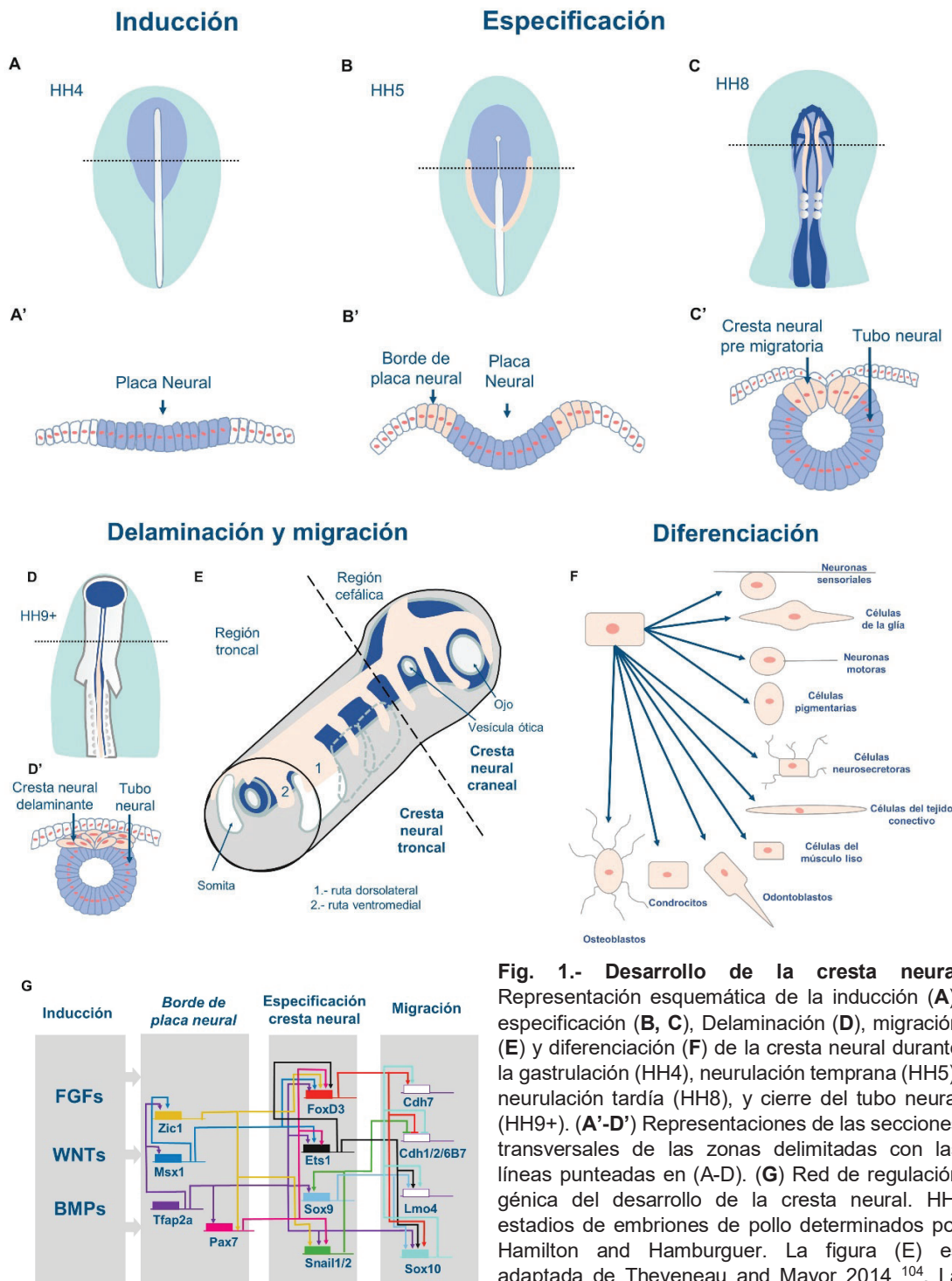
La cresta neural es una población transitoria de células multipotentes que se origina a partir del borde de la placa neural y tiene un rol central en el desarrollo embrionario de los vertebrados (**Fig. 1**). La cresta neural es considerada uno de los tejidos más fascinantes presentes en vertebrados debido a su potencial para generar derivados tanto mesodermales como ectodermales, y por este motivo algunos autores la consideran la cuarta capa germinal <sup>19</sup>. Además, dado que la mayoría de las características distintivas de los vertebrados son derivadas de la cresta neural, estas células tienen importantes implicancias en la evolución de los deuteróstomos y, por lo tanto, se consideran una sinapomorfia de los vertebrados <sup>64</sup>.

La cresta neural fue identificada por primera vez en 1868 por Wilhem His <sup>65</sup> al estudiar embriones de pollo, se le describió como una curvatura media que rodeaba la placa neural en estadios tempranos del desarrollo y denominándola un cordón o hilo medio entre el tubo neural y la epidermis. La cresta neural se desarrolla a lo largo del eje anteroposterior, lo que influye en sus capacidades de diferenciación en los diferentes linajes celulares que se originan a partir de estas. De manera general, la cresta neural esta agrupada en craneal (cefálica), cardíaca, troncal y sacral de acuerdo con su posicionamiento en el eje anteroposterior del embrión <sup>65</sup>. La formación de la cresta neural es un proceso progresivo que envuelve la interacción combinada de vías de señalización y factores de transcripción. Este proceso de formación está conformado por 4 etapas importantes <sup>16,66-69</sup>: inducción,



especificación, migración y diferenciación. El proceso de **inducción** comienza entre el final de la gastrulación y el inicio de la neurulación, el cual involucra la interacción de diferentes gradientes de morfógenos, tales como BMPs, WNTs, FGFs los cuales se generan a partir de tejidos circundantes <sup>15,66–71</sup>. Este proceso de inducción está altamente vinculado con el desarrollo neural en el cual la activación de diferentes redes regulatorias permite un adecuado control de cada proceso. Entre los diferentes genes involucrados en dichas redes, el primer y definitivo marcador de la placa neural es el factor de transcripción *Sox2* <sup>72,73</sup>. Este factor cumple múltiples funciones durante el desarrollo de vertebrados, en donde además de ser uno de los factores de pluripotencia y de auto-renovación <sup>74–76</sup>, está encargado de especificar las células madre embrionarias hacia un destino de neuro-ectodérmico <sup>77</sup>. El proceso de inducción es relatado con mayor detalle en el capítulo 2.

De manera general, durante el proceso de inducción la presencia de los antagonistas de BMP como Cerberus, Noggin, Chordin y Follistatin - expresados desde la placa neural <sup>12</sup> – permiten que el morfógeno BMP alcance niveles intermedios en la futura zona del borde de la placa neural al contrarrestar los niveles altos de BMP provenientes del ectodermo no neural <sup>67</sup>. Estos niveles intermedios de BMP crean una zona de competencia que promueve la inducción de la cresta neural bajo la influencia de las señalizaciones WNT y FGF <sup>78,79</sup>. Esta regulación negativa de BMP esta mediada por la señalización FGF la cual regula positivamente a los inhibidores de BMP y negativamente a sus ligandos <sup>65</sup>. Las interacciones de estas señales definen el territorio de progenitores ectodérmicos que dará lugar a la formación del borde de la placa neural como consecuencia de la activación de un conjunto distintivo de factores de transcripción conocidos como “genes especificadores del borde de la placa neural” tales como: *Tfap2a*, *Msx1*, *Zic1*, *Gbx2*, *Pax3/7*, *Dlx5/6*, *Gata2/3*, *Foxi1/2* y *Hairy2* <sup>17,66,80</sup>.



**Fig. 1.- Desarrollo de la cresta neuca.** Representación esquemática de la inducción (A), especificación (B, C), Delaminación (D), migración (E) y diferenciación (F) de la cresta neural durante la gastrulación (HH4), neurulación temprana (HH5), neurulación tardía (HH8), y cierre del tubo neural (HH9+). (A'-D') Representaciones de las secciones transversales de las zonas delimitadas con las líneas punteadas en (A-D). (G) Red de regulación génica del desarrollo de la cresta neural. HH: estadios de embriones de pollo determinados por Hamilton and Hamburger. La figura (E) es adaptada de Theveneau and Mayor 2014<sup>104</sup>. La figura (G) es adaptada de Hovland et al 2020 et al 441.

El proceso de inducción se da juntamente con los eventos iniciales de la formación del tubo neural el cual es un proceso crítico en el desarrollo embrionario de vertebrados que involucra aspectos genéticos, morfogenéticos, epigenético, mecánicos y ambientales <sup>81–83</sup>. El desarrollo del tubo neural ocurre mediante el proceso conocido como neurulación; este proceso se divide en dos tipos: neurulación primaria y neurulación secundaria <sup>84</sup>. La neurulación primaria es un proceso altamente conservado entre los vertebrados <sup>14,85–89</sup> y ocurre en 4 etapas: formación de la placa neural, moldeado de la placa neural, flexión de la placa neural para formar el canal neural y cierre del canal neural para formar el tubo neural <sup>12–14,90</sup>. La inducción de la cresta neural se da durante la formación y moldeado de la placa neural, e inicios del plegamiento de esta misma. Poco después de haberse formado la placa neural, las células de esta región y del borde de la placa comienzan a alargarse adoptando una forma columnar y se elevan iniciando la etapa de flexión. Durante la etapa de flexión, el borde de la placa neural forma los pliegues neurales y comienza a expresar los genes especificadores de la cresta neural iniciando la especificación.

La **especificación** de las células de la cresta neural comienza cuando las células más dorsales del pliegue neural expresan los “genes especificadores de la cresta neural” tales como: *SoxE*, *FoxD3*, *Snai1/2*, *Twist*, *Tfap2*, *Id3*, *cMyc*, *cMyb*, *Est1* <sup>17,68</sup>. Típicamente, estos genes son expresados en los progenitores de la cresta neural antes que inicien su migración y su expresión es mantenida o eliminada a medida que la migración progresa <sup>91</sup>. La expresión de estos genes es regulada por los propios especificadores del borde de la placa neural generando una compleja red regulatoria, la cual garantiza la plasticidad celular de este grupo de células <sup>92,93</sup>. Los especificadores de la cresta neural pueden dividirse en dos grandes grupos: tardíos y tempranos <sup>94</sup>. El primer grupo actúa para mantener la capacidad pluripotente de estas células (*Tfap2a*, *cMyb*, *cMyc*, *Id3*, *Sox10*),

mientras que el segundo grupo es requerido para iniciar el programa de transición epitelio-mesénquima y posterior migración (*Est1, Foxd3, Snail2, Sox9, Sox10*). El proceso de especificación se da a lo largo de las últimas etapas de formación del tubo neural e involucra: la elevación de los pliegues neurales, la formación del canal neural y el cierre del canal neural para dar lugar a la formación del tubo neural <sup>81,84,90,95–98</sup>. A medida que se da la expresión de los especificadores de la cresta neural, las células de la línea media de la placa neural reducen su altura, se anclan a la notocorda, denominándose células del punto medio de bisagra (MHP, del inglés: *medial hinge point*) <sup>95,99</sup>, y forman un surco en la línea media dorsal. Posteriormente, se forman dos nuevos puntos de bisagra en la región más lateral de la placa neural [puntos de bisagra dorsolaterales, DLHP (del inglés: *dorso[ateral] hinge point*)], permitiendo que los pliegues neurales se acerquen hacia la línea media dorsal y formen el canal neural. El final de la especificación de la cresta neural se da cuando las células de los pliegues neurales se adhieren entre sí y se fusionan generando el tubo neural <sup>14</sup>. En el caso de la neurulación secundaria, esta involucra la condensación de las células mesenquimáticas para formar un cordón medular el cual sufrirá ahuecamiento y formará el tubo neural. En ranas y pollos, la neurulación secundaria se produce en las vértebras lumbares y la cola <sup>90,100</sup>. La incorrecta formación del tubo neural conlleva a la formación de anomalías congénitas que en conjunto se conocen como defectos del tubo neural (DTN) <sup>82,101</sup>. Estos defectos son malformaciones congénitas que poseen una alta frecuencia (1 de 1000 embarazos) a nivel mundial siendo la principal fuente de muerte en los recién nacidos; entre las afecciones más comunes están la anencefalia, el mielomeningocele, y la espina bífida <sup>102</sup>.

Una vez especificadas, y al final del proceso de neurulación, las células de la cresta neural comenzarán el proceso de delaminación (desde el tubo neural) para iniciar la **migración** e invadir distintas regiones del embrión. Este proceso de delaminación se da

mediante una transición epitelio-mesénquima (TEM), la cual conlleva una serie de alteraciones moleculares y celulares que finalizan con cambios en la adhesividad celular. Estos cambios involucran la disolución de uniones adherentes y de la membrana basal, cambios en la organización del citoesqueleto y en las cadherinas que expresan <sup>66,103</sup>. Esto permite que las mismas se despeguen unas de otras e inicien la delaminación y dispersión celular adquiriendo características mesenquimáticas. La inducción de la delaminación y migración de la cresta neural está mediada principalmente por la expresión del gen *Snail/Slug*, el cual se regula de diferentes maneras en la región cefálica y troncal <sup>104</sup>. En embriones de pollo, la activación conjunta de *Snail/Slug*, *Foxd3*, *Sox9* y *Sox10* modulan las uniones célula-célula (cambio de cadherinas e integrinas), la supervivencia e identidad de la cresta neural <sup>104</sup>. En la región cefálica, la activación de este grupo de genes está mediada por *Ets1*, *Sox9*, *cMyc* así como por la presencia del supresor de tumor p53; mientras que en la región troncal, la activación está mediada por la señalización BMP/Wnt (*Bmp4*, *Wnt1*, *Msx1* y *cMyb*) que promoverá la activación de *Snail2*, *Foxd3* y miembros de la familia *SoxE* <sup>104-106</sup>.

La migración de las células de la cresta neural requiere tanto la interacción entre ellas mismas como con los tejidos circundantes, la cual se da través de mecanismos físicos, químicos o moleculares. En relación con las interacciones propias, las células de la cresta neural están sometidas a fuerzas de inhibición por contacto (CIL, del inglés *contact inhibition of locomotion*) y a la contracción (CoA), las cuales tienen efectos opuestos y permiten que las células se mantengan juntas y que migren en una misma dirección <sup>107-109</sup>. Por otro lado, la interacción de la cresta neural y los tejidos circundantes se da principalmente mediante receptores y ligandos tipo efrinas, endotelina, factores tipo *Hox* o reguladores de BMP, los cuales definen las rutas de migración <sup>104,110</sup>.

Una vez que las células de la cresta neural llegan a su destino comienza el proceso de **diferenciación**, el cual está mediado por redes regulatorias que activan diferentes circuitos en subpoblaciones de las células migratorias. Estos circuitos están centrados alrededor de factores de transcripción capaces de activar una batería de genes linaje-específicos. La activación de estos depende de la capacidad intrínseca de las subpoblaciones de células de la cresta neural (craneal, vagal, troncal o sacral) y de las señales del microambiente, y en particular de los tejidos circundantes <sup>66,111–114</sup>. La diferenciación de las células de la cresta neural está directamente vinculada con su posicionamiento anteroposterior. Las células craneales ingresarán a los arcos faríngeos y darán lugar a mesénquima craneofacial que se diferenciará en cartílago, hueso, neuronas craneales, glía y tejido conectivo de la cara. Así mismo, estas células darán origen a las células del timo, odontoblastos y huesos del oído medio y de la mandíbula <sup>65,90,111,114–116</sup>. La cresta neural vagal o cardíaca, localizada entre la craneal y troncal, tiene la capacidad de generar, melanocitos, neuronas y cartílago. Además, estas células generan la totalidad de tejido conectivo-muscular de la pared de las grandes arterias que se originan desde el corazón, así como también al tabique (septum) que separa la circulación pulmonar de la arterial <sup>117,118</sup>. Las células de la cresta neural del tronco generarán los ganglios de la raíz dorsal que contienen células sensoriales, los ganglios simpáticos, la médula suprarrenal, los grupos de neuronas que rodean la aorta y los melanocitos <sup>119</sup>. Finalmente, la cresta neural sacral generará los ganglios parasimpáticos (entéricos) <sup>90</sup>.

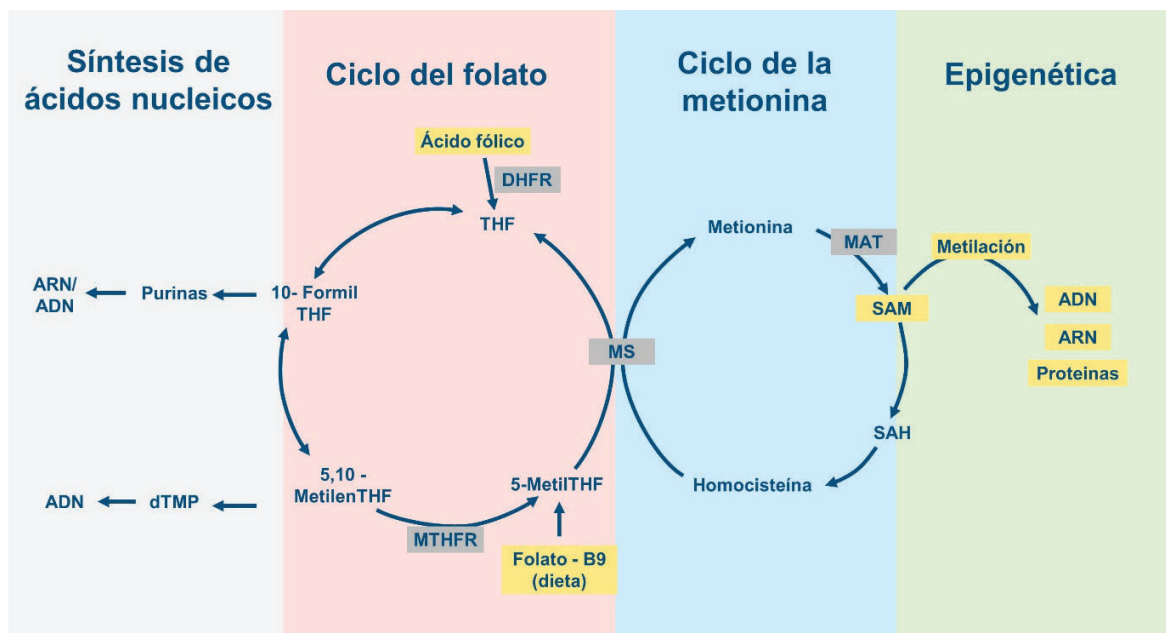
Teniendo en cuenta la amplia contribución de la cresta neural hacia diferentes tipos celulares a lo largo de cuerpo, un gran número de enfermedades humanas han sido asociadas con un inadecuado desarrollo y/o diferenciación de la cresta neural. Colectivamente, estas enfermedades y síndromes son conocidas como neurocristopatías las cuales se pueden clasificar en tres grandes grupos dependiendo de si los fallos ocurren

durante la especificación, migración o diferenciación (revisado por Noak and Trainor <sup>120</sup>) <sup>11,121</sup>. Entre las enfermedades generadas por fallos en la especificación se puede mencionar al síndrome de Treacher Collins, anemia de Diamond Blackfan y el Síndrome de Miller, los cuales presentan malformaciones craneofaciales tales como fisuras orofaciales <sup>122</sup>. En relación con la migración, se pueden mencionar el Piebaldismo (falta de pigmentación de la piel), la enfermedad de Hirschprung (fallas en la inervación del tracto digestivo), el Síndrome de Waardenburg y cánceres metastáticos como neuroblastoma y melanoma, siendo este último uno de los cánceres más agresivos y con una alta tasa de mortalidad <sup>123,124</sup>. Finalmente, en relación con el proceso de diferenciación se puede mencionar al albinismo oculocutáneo (falla en diferenciación de melanocitos) y la craneosinostosis (fusión prematura de las suturas craneales). Entre las diferentes neurocristopatías, las malformaciones craneofaciales son un fenotipo recurrente que incluye la fisura del paladar o del labio, y al mismo tiempo abarcan la tercera parte de los defectos congénitos del nacimiento adquiriendo una gran relevancia clínica <sup>18,125</sup>.

### 2.1.2 Folato y defectos congénitos

El folato o vitamina B9 - y su forma sintética, el ácido fólico- es una vitamina esencial para los humanos que es obtenida a través de la dieta por la ingesta de verduras de hojas verdes, legumbres y cítricos <sup>126</sup>. El folato es crucial para la vida como un componente para reacciones bioquímicas esenciales como la síntesis *de novo* de ADN, ARN, producción de aminoácidos y la síntesis del donador de grupos metilo S-adenosil metionina (SAM) <sup>127,128</sup>. Para poder ejercer estas funciones, el folato entra en el ciclo de un carbón el cual conecta el ciclo del folato con el ciclo de la metionina (**Fig. 2**). Durante el ciclo de un carbón, el folato (5-metiltetrahidrofolato 5-MTHF, forma activa del folato) transfiere su grupo metilo a

la homocisteína para generar metionina. Esta reacción es mediada por la acción de la enzima metionina sintasa (MS: del inglés *Methionine Synthetase*) y de su coenzima cobalamina (derivada de B12). Posteriormente, la metionina es convertida en SAM por la metionina S adenosiltransferasa (MAT, del inglés *Methionine S-AdenosylTransferase*) y será utilizado para la metilación de diferentes moléculas dentro de la célula <sup>129,130</sup>. Una vez que se transfiera el grupo metilo, el SAM se convierte en S-adenosil-homocisteína (SAH, del inglés *S-AdenosylHomocystein*) el cual inhibe posteriores reacciones de metilación. El ratio SAM/SAH es un indicador del potencial de metilación, donde bajos ratios indican un reducido potencial de metilación <sup>131</sup>.



**Fig. 2.- Ciclo del folato.** Representación esquemática de la interconexión entre el ciclo del folato, de la metionina la síntesis de ácidos nucleicos y la epigenética. El ácido fólico necesita ser reducido por la DHFR para ingresar en el ciclo del folato mientras que el folato de la dieta sí lo hace. DHFR: dihidrofolato reductasa, MTHFR: metilen tetrahidrofolato reductasa, MS: metionina sintasa, MAT: Metionina S-Adenosiltransferasa. Adaptado de Alam et al 2020 <sup>128</sup>



El folato posee diferentes formas las cuales son denominadas derivados del folato o folatos, entre ellas se puede mencionar al 5-MTHF, el ácido fólico y el ácido folínico <sup>128,132</sup>. El 5-MTHF es la principal forma del folato en la dieta y representa la forma fisiológica predominante que es encontrada en la sangre y el cordón umbilical, y la disponibilidad de esta molécula contribuye altamente a la conversión de metionina a SAM <sup>20,132</sup>. Por otro lado, el ácido fólico es un compuesto sintético el cual es administrado como un suplemento dietético y su metabolismo requiere de una reducción inicial (en el hígado) por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR, *Dihydrofolate reductase*) hasta dihidrofolato y posteriormente a 5-MTHF <sup>20,133</sup>. En relación con el ácido folínico (Leucovorin), esta es una molécula sintética que puede entrar de manera directa en la ruta metabólica del ciclo del folato y ser convertida a 5,10-MTHF y 5-MTHF sin la acción de la DHFR <sup>132,134</sup>. Todos estos folatos -que son metabolitos intermediarios en el ciclo del folato y la metionina- están ligados entre sí y también son el soporte para el ciclo de un carbón.

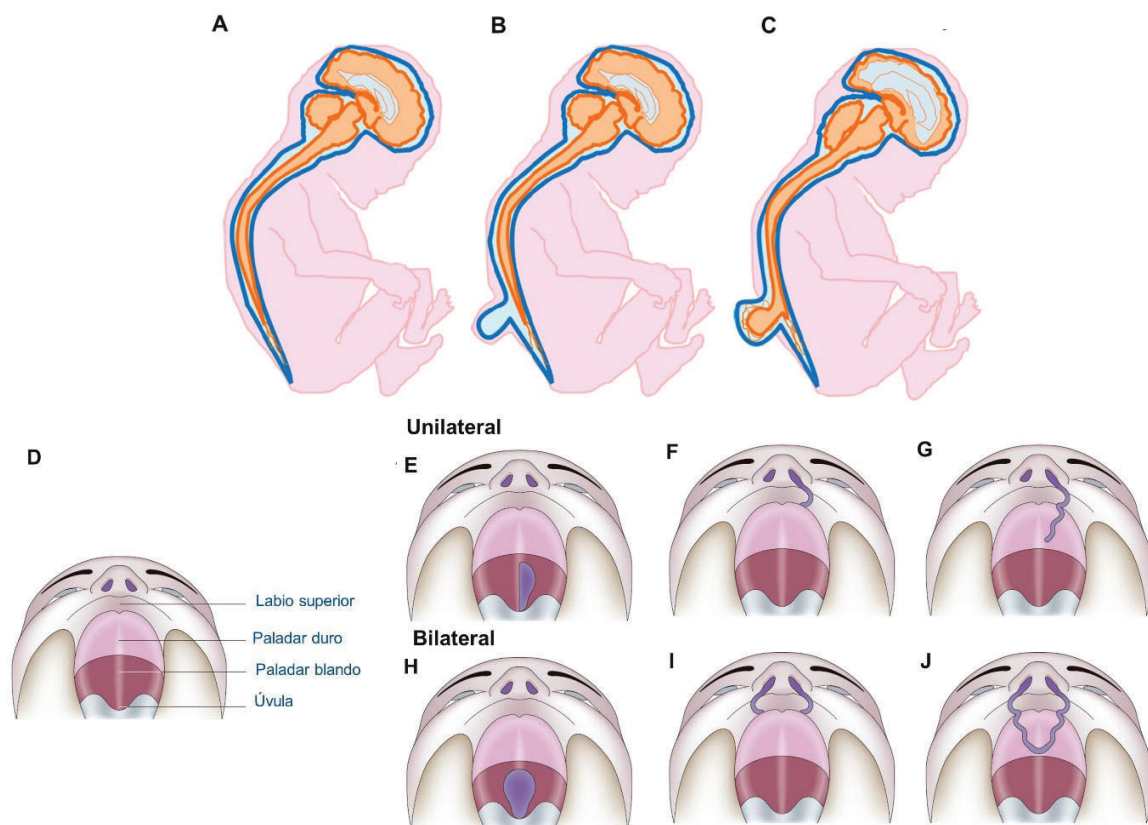
Una vez que el folato es consumido a través de la dieta, este ingresa en las células mediante receptores de folato (FOLR1-3, también conocidos como FR alfa, beta, gamma) y transportadores de folato reducido (RFC o SLC19A1, de *Soluto Carrier 19A1*) <sup>4,128,135,136</sup>. FR alfa y beta son glicoproteínas de la superficie de membrana y poseen una alta afinidad por el ácido fólico; así como un patrón de expresión tejido-específica. FR alfa es localizado en el plexo coroideo, túbulos proximales del riñón, útero, placenta y retina; mientras que FR beta está presente en la placenta, células hematopoyéticas y tejido como el bazo o timo <sup>128</sup>. FR alfa ha sido una de las isoformas mejor caracterizada a nivel funcional, atribuyéndosele de ser un mecanismo eficiente de reabsorción de folato a nivel de los riñones y como ruta primaria para la absorción de 5-MTHF en el plexo coroideo y las células epiteliales <sup>137,138</sup>. Por otro lado, RFC1 es una proteína transmembrana que funciona como un intercambiador bidireccional anti porte de folato con fosfatos orgánicos

intracelulares <sup>139</sup>. RFC1 posee una baja afinidad por 5-MTHF, así como por el ácido fólico; sin embargo, es el responsable de la mayor parte del transporte a través de la membrana a nivel sistémico <sup>3,4,9,135,139-141</sup>. Adicionalmente, FOLR1 y RFC1 se expresan en la placenta, permitiendo un flujo adecuado de esta vitamina hacia el feto y por lo tanto asegurando su correcto desarrollo <sup>4,135,136,142</sup>.

La importancia del folato en el desarrollo embrionario fue inicialmente abordada en la década de los 70 cuando Smithells trataba de determinar los posibles agentes causantes de los defectos del tubo neural <sup>143</sup>. Smithells determinó que los hijos de madres gestantes que eran deficientes de vitaminas (principalmente folato-ácido fólico) poseían una mayor recurrencia de estos defectos. Posteriormente, se determinó que el ácido fólico en una concentración de 4 mg era capaz de prevenir los defectos del tubo neural <sup>144-147</sup>. Hoy en día, la dosis recomendada para el consumo de ácido fólico/folato varía entre 0.4-0.8 mg/día dependiendo de los factores de riesgo que puedan estar involucrados <sup>146,148</sup>. Además de los defectos del tubo neural, la deficiencia de folato ha sido relacionado con otros defectos congénitos como son la fisura del labio/paladar (orofaciales) o defectos cardíacos <sup>149-155</sup>. Entre estos, los defectos orofaciales y del tubo neural poseen una alta frecuencia a nivel mundial (1:1000 y 1:700-1000, respectivamente), por lo que diversos estudios han tratado de determinar los mecanismos por los cuales la deficiencia de folato es capaz de generar dichos defectos <sup>145,149,151,156</sup>.

Los defectos del tubo neural han sido clásicamente divididos en defectos abiertos y cerrados; pudiendo generarse en la región cefálica y/o en la columna vertebral <sup>145</sup>. Entre los defectos abiertos se encuentran: la craneorraquisquis, la anencefalia y el mielomeningocele o espina bífida abierta; mientras que los defectos cerrados incluyen: la encefalocele, meningocele y la espina bífida oculta (**Fig. 3A**) <sup>151</sup>. Además, los defectos que ocurren en la región cefálica con apertura de la bóveda craneana son de carácter letal;

mientras que los defectos a nivel de la columna vertebral o defectos en la región cefálica (cerrados) son generalmente compatibles con la supervivencia postnatal <sup>145,151</sup>. En relación con la fisura del labio/paladar, estos defectos se pueden clasificar en: fisura del labio, del paladar, unilateral o bilateral incompleta del labio y paladar, unilateral o bilateral completa del labio y paladar, y bilateral completa del labio y paladar (**Fig. 3 B**) <sup>153</sup>. Además, se ha observado que estos defectos están presentes en individuos que poseen mutaciones en genes involucrados en el desarrollo de la cresta neural (*Msx1*, *Bmp4*, *Pax3/7*), y/o en el metabolismo del folato <sup>157</sup>.



**Fig.3.- Defectos orofaciales y del tubo neural.** (A-C) Representación esquemática de algunos defectos del tubo neural. (A) Normal, (B) Meningocele, (C) Mielomeningocele. Tomado de Avagliano et al 2018 <sup>151</sup>. (D-I) Representación de algunos defectos orofaciales. (D) Normal, (E, H) fisura del paladar, (F, I) fisura del labio, (G, J) fisura del labio y paladar. Tomado de Dixon et al 2011 <sup>153</sup>.

De manera similar a los defectos de tubo neural, la incidencia de la fisura del labio/paladar puede ser reducida mediante la suplementación con ácido fólico, demostrando el importante rol que puede tener esta vitamina en el desarrollo de dichas estructuras<sup>158,159</sup>. Esta relación inicial entre el folato y los defectos asociado a un desarrollo anormal del tubo neural y de la cresta neural craneal (principalmente) ha incrementado los esfuerzos para determinar los mecanismos por los cuales el folato afecta el desarrollo de dichas estructuras.

Como se mencionó previamente, el folato es la fuente principal para la generación de la molécula SAM, la cual es utilizada como sustrato para la metilación de diferentes moléculas. Esta reacción de metilación juega un rol crítico en dos mecanismos regulatorios: modificaciones epigenéticas e *imprinting*, mediante la adición de grupos metilo a las histonas y al ADN<sup>20,127,130</sup>. Estos hechos plantean la idea de una posible relación entre la deficiencia del folato y mecanismos epigenéticos durante el desarrollo embrionario.

### 2.1.3 Epigenética

El término epigenética fue propuesto inicialmente por Waddington (1942) como "la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos, que dan origen al fenotipo". En otras palabras, la epigenética es el estudio de cambios heredables en el fenotipo o la expresión génica que no son resultado de cambios en la secuencia primaria del ADN<sup>160,161</sup>. Entre los mecanismos epigenéticos más estudiados se destacan: la metilación del ADN, la modificación postraduccional de las histonas (metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, entre otras), variantes de histonas, remodeladores de la cromatina, y ARN no codificantes<sup>20,24,162-164</sup>. A nivel nuclear, los

mecanismos epigenéticos modulan la estructura de la cromatina y contribuyen a diferentes procesos moleculares como la transcripción, replicación, reparación, y procesamiento de ARN <sup>20</sup>. Por otro lado, el proceso de diferenciación celular (necesario para el desarrollo completo de un organismo) ha sido descrito como un proceso gobernado en gran medida por cambios en el "paisaje epigenético", en lugar de alteraciones en la herencia genética. En este contexto, la epigenética se define actualmente como "el estudio de cualquier cambio potencialmente estable y, idealmente, heredable en la expresión génica o el fenotipo celular que ocurre sin cambios en las bases del ADN" <sup>165</sup>.

### ***Metilación del ADN***

La metilación del ADN regula la expresión génica mediante la adición o remoción de un grupo metilo en el quinto carbón del anillo de pirimidina de la citocina <sup>166</sup>. La metilación de la citosina en el ADN es una modificación común en diferentes especies y ocurre principalmente en los dinucleótidos 5'-CpG-3' (CpG). Sin embargo, también se puede encontrar en otros sitios a los cuales se les refiere como metilación no-CpG (también conocidas como metilaciones no canónicas), y cuyo rol ha sido asociado con el desarrollo embrionario y neurodesarrollo <sup>162,167,168</sup>. El proceso de metilación posee tres fases: establecimiento (metilación *de novo*), mantenimiento y demetilación <sup>169</sup>. La metilación de la citosina se da cuando el grupo metilo de SAM es enzimáticamente transferido a la posición 5 de la citosina generando 5-metilcitosina (5mC). Esta transferencia es catalizada por las metiltransferasas de ADN (DNMTs, del inglés *DNA MethylTransferases*), las cuales poseen un dominio DNMT (dominio MTase, del inglés *MethylTransferase*) y están comprendidas por la DNMT1, 3A, y 3B <sup>170-173</sup>. De manera general, las metilaciones *de novo* están asociadas con las DNMT3A y DNMT3B; mientras que la metilación de mantenimiento está asociada con las DNMT1. Sin embargo, en humanos existen otras

DNMTs capaces de realizar metilación *de novo* <sup>169</sup>. Las DNMT3A/B poseen un dominio DNMT (dominio MTase, del inglés “*Methyltransferase*”) y dos dominios de lectura de cromatina que son altamente conservados, los cuales interactúan con residuos de lisinas de la histona para poder generar la metilación <sup>174,175</sup>. Por otro lado, la DNMT1 interactúa con otra proteína que reconoce al ADN hemimetilado en la horquilla de replicación, así como con diferentes residuos de lisina, para luego metilar la otra hebra del ADN <sup>176–178</sup>. Finalmente, el proceso de demetilación activa del ADN es llevada a cabo por las dioxigenasas de metilcitosina TETs (del inglés, *Ten Eleven Translocation*), las cuales oxidan progresivamente la 5mC hasta 5-hidroximetilcitosinas (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-carbosilcitosina (5caC) <sup>179–181</sup>.

A lo largo del genoma, la presencia de los nucleótidos CpG es altamente variable, sin embargo, existen regiones que poseen una alta abundancia de estos dinucleótidos a los cuales se les denomina islas CpG (CGI, del inglés “*CpG Island*”) <sup>182</sup>. Estas CGIs están comúnmente relacionadas con regiones promotoras (principalmente en genes reguladores del desarrollo) y otras regiones regulatorias intergénicas <sup>182,183</sup>. La metilación del ADN puede darse en las regiones promotora, *enhancers* o en el cuerpo de un gene. La metilación en la región promotora o en el *enhancer* de un gen conlleva a la formación de heterocromatina silenciándolo e inhibiendo la unión de factores de transcripción <sup>173,184,185</sup>. Por otro lado, la metilación en el cuerpo del gen se correlaciona positivamente con la transcripción <sup>20,186,187</sup>.

Entre las DNMTs, se ha visto que las DNMT3A/B actúan principalmente durante el desarrollo embrionario para establecer un remodelamiento epigenético que conlleva a la diferenciación celular <sup>20,171</sup>. Es así que en ratones, la deficiencia de DNMTs o la desregulación de la metilación del ADN es letal o puede generar diversos tipos de cáncer,

respectivamente <sup>190,191</sup>. Todo esto nos indica que la metilación del ADN cumple un rol importante en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo temprano.

### ***Metilación de las histonas***

Las colas N-terminal de las histonas están sujetas a modificaciones postraduccionales como la metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, entre otros <sup>193,194</sup>. Estas modificaciones afectan la estructura de la cromatina y sirven como plataforma para la unión de factores de transcripción, remodeladores de la cromatina, y enzimas que modifican el ADN. Inicialmente, se hipotetizó la existencia de un código o lenguaje de histonas donde las combinaciones de las modificaciones -ya sea de manera secuencial o simultánea- podrían determinar la actividad de genes asociados. Sin embargo, la variabilidad del posicionamiento de dichas modificaciones, así como su ubicación dentro del genoma, muestran que este mecanismo epigenético posee un alto grado de complejidad <sup>178</sup>. Las modificaciones de las histonas tienen un rol en la expresión génica, replicación/reparación del ADN, compactación de la cromatina, control del ciclo celular; por lo que fallos en la regulación de estas modificaciones puede conllevar a la aparición de estados patológicos <sup>193-195</sup>.

Dentro de las histonas, la histona H3 y los residuos de lisina (Lys o K) son los más comunes aceptores de modificaciones postraduccionales, siendo la metilación una de las más comunes <sup>196</sup>. La metilación de las lisinas es un proceso dinámico que involucra la adición del grupo metilo por las lisinas metiltransferasas (KMT, del inglés “K MethylTransferases”) y la remoción de este mismo por las demetilinas específicas <sup>197-202</sup>. El dinamismo de la metilación de las histonas sugiere la presencia de una plasticidad epigenética capaz de responder ante un estímulo externo. El rol de la metilación en relación con la expresión génica depende del estado de metilación (mono-, di-, y trimetilación [me1, me2, me3 respectivamente]) y la posición de la lisina <sup>203-205</sup>.

Generalmente las trimetilaciones de las lisinas 4 y 36 de la histona 3 (H3K4me3 y H3K36me3, respectivamente) son consideradas marcas transcripcionales activas, mientras que las trimetilaciones de las lisinas 9 y 27 de las histonas 3 (H3K9me3 y H3K27me3, respectivamente) están asociadas con estados de silenciamiento de la transcripción<sup>205</sup>.

### ***Regulación epigenética de la formación de la cresta neural***

Durante el desarrollo embrionario, las células están bajo constante modificación de la expresión de genes que permiten dirigir los procesos morfogénicos necesarios para la formación adecuada de los diferentes tejidos embrionarios. Durante estas etapas se dan los eventos de diferenciación celular donde genes de pluripotencia deben ser silenciados y genes tejido-específico deben ser algunos expresados y otros silenciados. En las últimas décadas ha habido una mirada de publicaciones dedicadas a la epigenética, posicionándola como un factor clave en la regulación fina de la expresión génica y la diferenciación celular. En este sentido, la cresta neural no es una excepción y se ha demostrado que dichas regulaciones son un factor crítico en el control temporal y territorial de la expresión de genes claves en el desarrollo de estas <sup>21-23,26,66,70,93,103</sup>.

En la cresta neural, la *Dnmt3a* ha sido relacionada con la represión del gen neural *Sox2/3* mediante la metilación de islas CpG en el territorio de los progenitores de la cresta neural permitiendo la formación de este grupo celular <sup>22,206</sup>. Mientras que la *Dnmt3b* ha sido relacionada con el control de la migración de las células de la cresta neural <sup>23</sup>; demostrando el importante rol que cumplen estas dos enzimas durante su desarrollo. Por otro lado, se ha determinado que la remoción de las marcas de metilación represivas en los genes *Sox10* y *Snai2* (mediante la demetilasa de histonas *Kdm4a -Jmjd2a*) es necesario para el programa de especificación de la cresta neural <sup>26</sup>. De igual manera, en



estadios más tardíos, la demetilasa de histonas Phf8 demetila los promotores de genes importante para el desarrollo craneofacial <sup>207</sup>. Estos ejemplos, demuestran que las modificaciones epigenéticas son una parte integral de la maquinaria de regulación génica jugando un rol importante en la modulación de la expresión durante el desarrollo de la cresta neural.

Como se mencionó previamente, la deficiencia de folato durante el desarrollo embrionario conlleva a la generación de defectos congénitos derivados de la cresta neural <sup>5-9,208-210</sup>; o bien del tubo neural <sup>145,151</sup>. La presencia de estos defectos origina la pregunta de ¿por qué el tubo neural y la cresta neural en desarrollo son más vulnerables a la deficiencia de folato que otros tejidos? Diversos estudios (en modelos animales) han mostrado que *FolR1* y *Rfc1* se expresan en estos tejidos durante el desarrollo temprano <sup>8,211,212</sup>. *FolR1* es expresado en el tubo neural <sup>3</sup>, pliegues neurales y cresta neural <sup>213,214</sup> de ratones; mientras que en *Xenopus*, es expresado en la placa neural durante la formación del tubo neural <sup>215</sup>. Contrariamente, en ratón *Rfc1* es expresado en el tubo neural y la región craneofacial <sup>211,216</sup>, mientras que en *Xenopus* su expresión se da en el borde de la placa neural y la cresta neural <sup>8</sup>. Estos patrones de expresión de *FolR1* y *Rfc1* en diferentes modelos brindan un indicio de la existencia de un requerimiento diferencial de folato en estos tejidos. Además, se ha visto que *FolR1* y *Rfc1* son expresados en la misma región donde se expresan las metiltransferasas de ADN (*Dnmts*, siglas en inglés) y metiltransferasas de histonas <sup>9,22,23,217</sup>, sugiriendo un posible vínculo entre el folato, la metilación y el desarrollo neural y de la cresta neural. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares y epigenéticos afectados por la deficiencia de folato que podrían estar ligados a la generación de defectos del tubo neural y de la cresta neural. Considerando lo previamente mencionado *hipotetizamos que los transportadores de folato*

*jugarían un rol importante en el control epigenético durante la especificación neural y de la cresta neural.*

Para ello, nos planteamos el siguiente **objetivo general**: **Evaluar el rol de los transportadores de folato en el control epigenético de la especificación neural y de la cresta neural.**

**Objetivos específicos:**

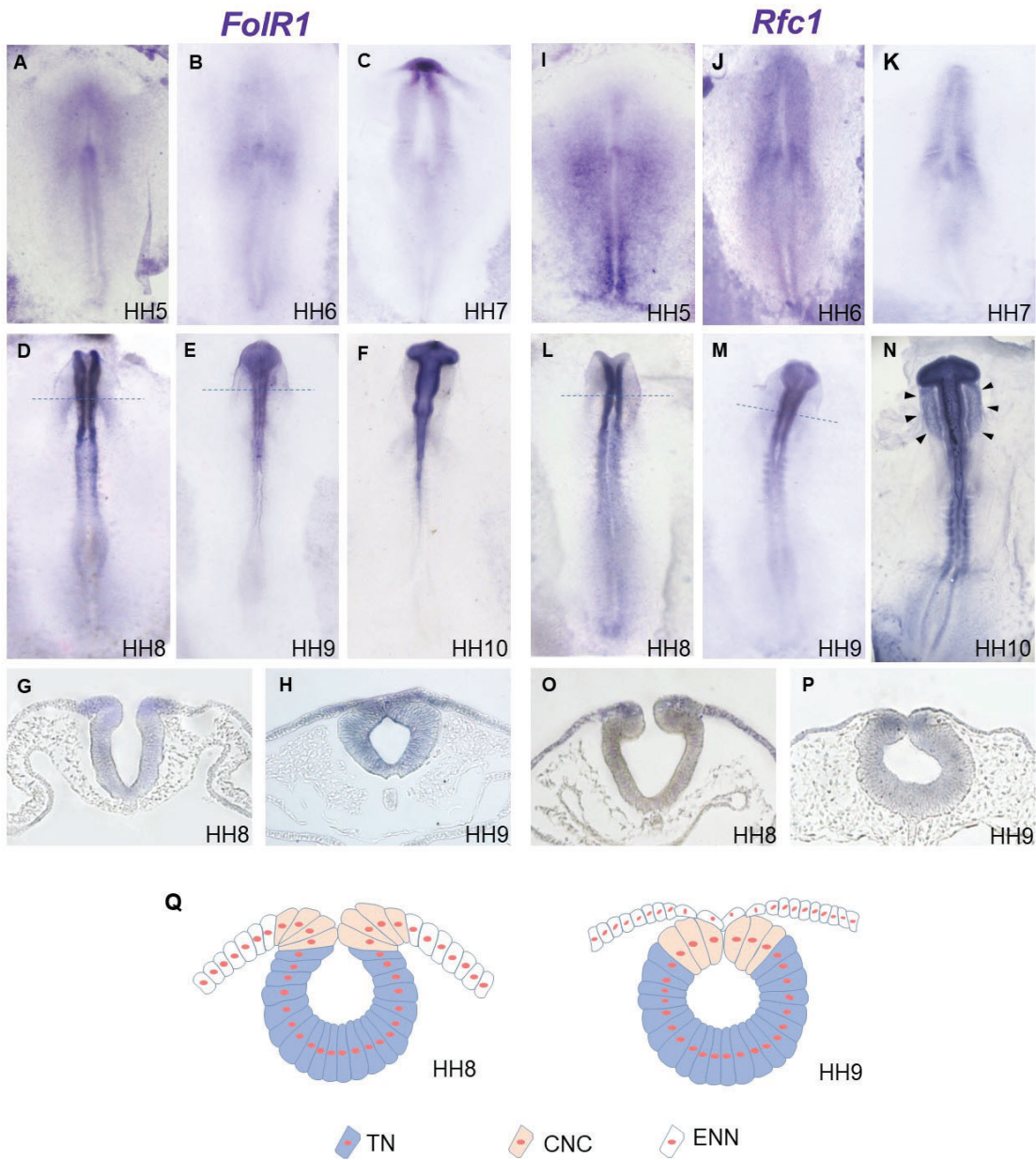
- 1.- Determinar el efecto de la deficiencia de folato en los mecanismos epigenéticos: metilación de las histonas y del ADN durante el desarrollo embrionario de la cresta neural.
- 2.- Estudiar el efecto de la deficiencia de folato en el desarrollo de la cresta neural y sus derivados orofaciales durante el desarrollo embrionario.

**2.2.- Resultados**

**2.2.1- Efecto de la deficiencia de folato en los mecanismos epigenéticos: metilación de las histonas y del ADN durante el desarrollo embrionario de la cresta neural.**

***a.- La expresión de *FoIR1* y *Rfc1* se regionaliza a medida que avanza el desarrollo embrionario***

Como un paso inicial en el establecimiento de la importancia funcional del rol de los transportadores folato durante la especificación neural y de la cresta neural es que decidimos evaluar el patrón de expresión espaciotemporal de *FoIR1* y *Rfc1* en embriones de pollo. Para ello, realizamos hibridaciones *in situ* (HIS) con sondas específicas en embriones colectados desde el inicio de neurulación (HH5) hasta el inicio de la migración de la cresta neural craneal (HH10, estadios según Hamburguer–Hamilton <sup>218</sup>).



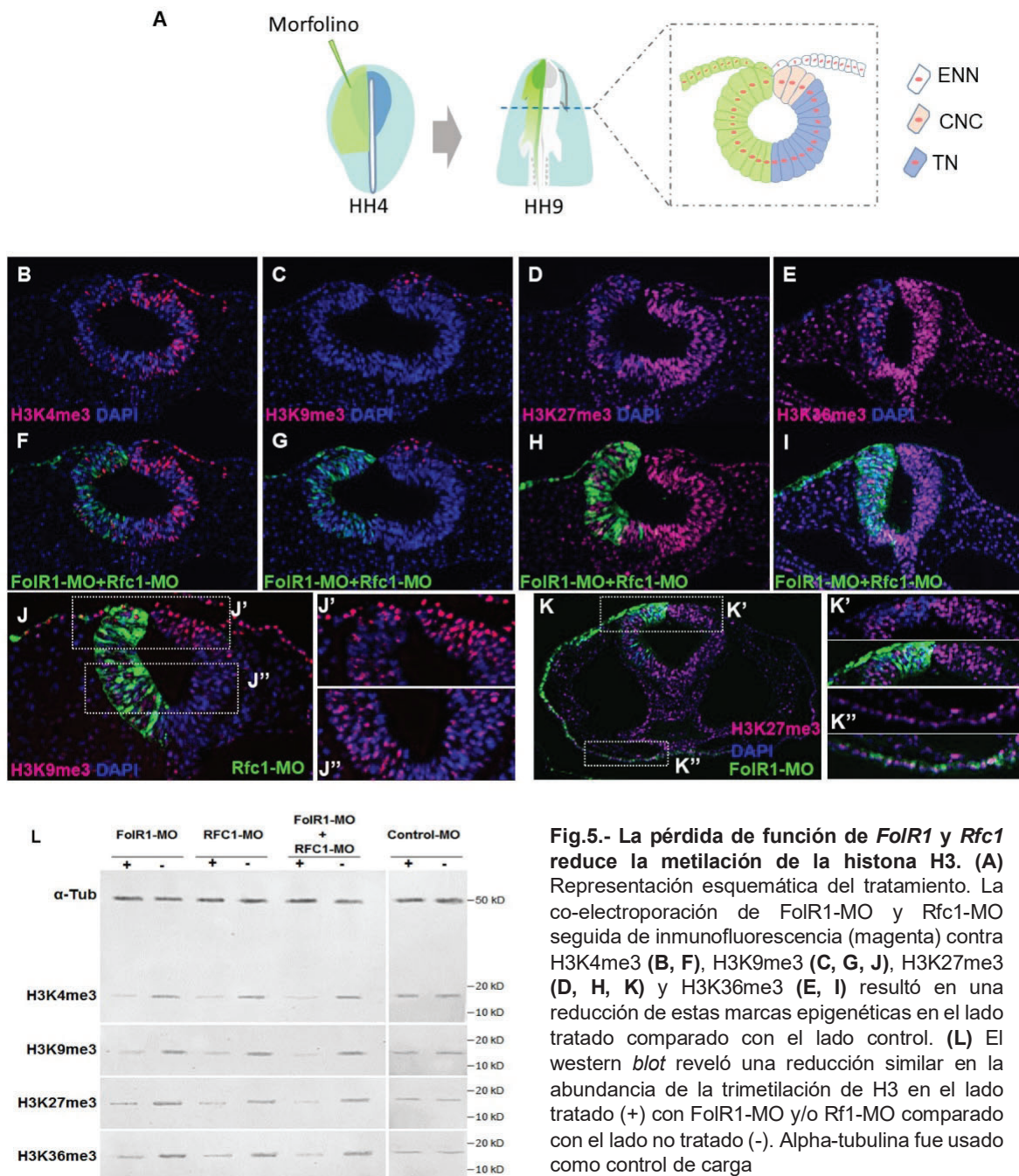
**Fig.4.- Expresión espacial-temporal de *FoIR1* y *Rfc1* durante el desarrollo neural y de la cresta neural.** Las Hibridaciones *In situ*, en embriones completos, muestran una expresión temprana de los genes *FoIR1* (A-C) y *Rfc1* (I-K). En estadios tardíos, la expresión de *FoIR1* (D-H) es detectada en el tubo neural y parte del ectodermo no neural; mientras que *Rfc1* (L-P) se detecta en la parte dorsal del tubo, el ectodermo no neural y en células migratorias (N, punta de flecha). Las líneas punteadas en D, E, L, M representan la sección transversal observada en G, H, O, P respectivamente. Q. Representación esquemática de los estadios HH8 y HH9. TN: tubo neural, CNC: cresta neural craneal, ENN: ectodermo no neural.

Las HIS mostraron que tanto *FolR1* y *Rfc1* son expresados en la placa neural (PN) y borde de la placa neural (BPN) en los estadios HH5-6 (**Fig. 4 A-B, I-J**). En HH7, ambos continúan expresándose en estos mismos territorios y en la región intersomítica de manera más notoria (**Fig. 4 C, K**). En estadios más avanzado (HH8-9), *FolR1* y *Rfc1* se expresan a lo largo del tubo neural (**Fig. 4 D, E, L, M**). Al realizar cortes transversales a la altura de la región cefálica (líneas punteadas), observamos que *FolR1* se expresa en el tubo neural, cresta neural premigratoria y ectodermo no neural (**Fig. 4 G, H**); mientras que *Rfc1* es mayoritariamente detectada en la cresta neural premigratoria (**Fig. 4 O, P**). En estadio HH10, se puede observar que *FolR1* se expresa exclusivamente en el tubo neural, mientras que *Rfc1* es fuertemente detectada en la cresta neural migratoria (**Fig. 4 F, N**; puntas de flechas negras). Estos resultados muestran que ambos transportadores se expresan durante la etapa de inducción neural y del borde de la placa neural, así como también durante la especificación y migración de la cresta neural; siendo *RFC1* el que presenta una expresión más restringida a estas últimas.

***b.- Los transportadores de folato: FolR1 y Rfc1 son requeridos para la normal metilación del ADN e histonas durante el desarrollo de la cresta neural y del tubo neural***

Considerando que el folato es la principal fuente de grupos metilo <sup>6</sup>, decidimos examinar el efecto combinado e individual de la pérdida de función de los transportadores de folato (*FolR1* y *Rfc1*) en la metilación de la histona H3 y del ADN. Para esto realizamos electroporaciones unilaterales con morfolinós (*FolR1*-MO y/o *Rfc1*-MO – estos morfolinós se unirían a la región cercana al ATG y bloquearían la traducción de las respectivas proteínas) antes del inicio de la neurulación (HH4) y los dejamos crecer hasta el estadio HH9 (**Fig. 5 A**). Primero, evaluamos la abundancia de la triple metilación en diferentes

lisinas de la histona H3 (H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, y H3K36me3) mediante inmunohistoquímica (IHC) (**Fig. 5 B-K**) y *western blot* (**Fig. 5 L**). De manera general, la deficiencia de *Folr1* y *Rfc1* generó una fuerte reducción de las metilaciones en comparación con el lado no inyectado.

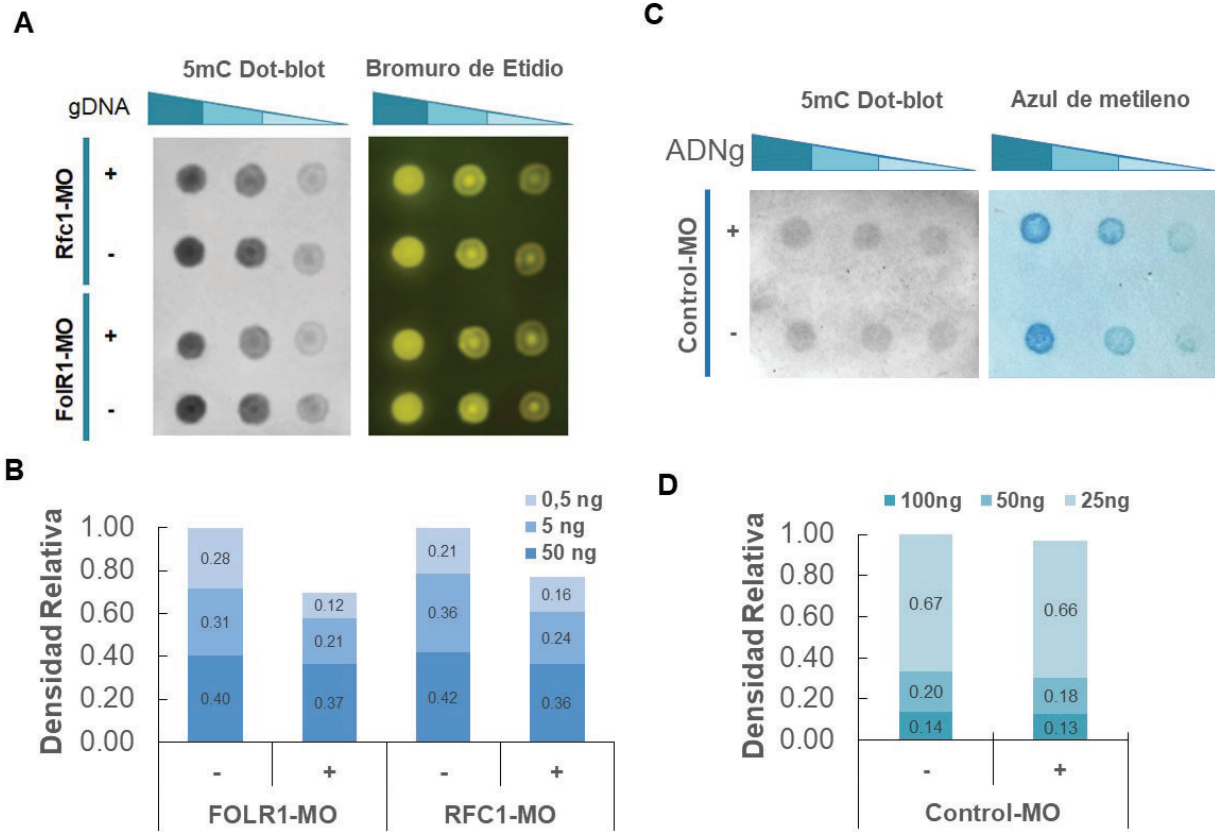


**Fig.5.- La pérdida de función de *FoIR1* y *Rfc1* reduce la metilación de la histona H3.** (A) Representación esquemática del tratamiento. La co-electroporación de FoIR1-MO y Rfc1-MO seguida de inmunofluorescencia (magenta) contra H3K4me3 (B, F), H3K9me3 (C, G, J), H3K27me3 (D, H, K) y H3K36me3 (E, I) resultó en una reducción de estas marcas epigenéticas en el lado tratado comparado con el lado control. (L) El *western blot* reveló una reducción similar en la abundancia de la trimetilación de H3 en el lado tratado (+) con FoIR1-MO y/o Rf1-MO comparado con el lado no tratado (-). Alpha-tubulina fue usado como control de carga

Es interesante mencionar que las marcas H3K27me3 y H3K36me3 eran las más abundantes en la zona dorsal y en la zona ventral del tubo neural, mientras que H3K9me3 se encontraba más restringida a la parte dorsal del tubo neural (**Fig. 5 C**). En relación con esto último; observamos que el tratamiento con Rfc1-MO alteraba la marca H3K9me3 en el tubo neural dorsal y en el ectodermo no neural (**Fig. 5 J'**), mientras que las células de la parte ventral del tubo, donde *Rfc1* no se expresa, no presentaban alteración alguna (**Fig. 5 J''**). De manera similar, el tratamiento con FolR1-MO redujo la metilación de la H3K27me3 en todo el tubo neural y el ectodermo adyacente (**Fig. 5 D, K'**), pero no en el ectodermo ventral donde la expresión de *FolR1* no había sido detectada (**Fig. 5 K''**). La reducción de la triple metilación de las lisinas presentes en la histona H3 en el lado inyectado también fue observada cuando realizamos un ensayo de western *blot* (**Fig. 5 L**). Además, pudimos observar que la reducción era mayor cuando los embriones eran tratados con ambos morfolinis. En contraste, no observamos cambios cuando los embriones fueron tratados con el morfolino control (Control-MO). Todos estos resultados muestran que la pérdida de *FolR1* y/o *Rfc1* afecta la metilación de las lisinas presentes en la histona H3 de manera exclusiva en los territorios donde estos genes son expresados.

Al observar que la metilación de las histonas es afectada, nos preguntamos si la pérdida de los transportadores de folato también podría afectar la metilación del ADN. Para ello, realizamos ensayos de *dot blot* contra la marca 5-metilcitosina (5mC) del ADN genómico. El ADN genómico -extraído de los embriones tratados- fue usado para los ensayos de *dot blot*, y observamos una reducción de la marca en los lados que habían sido inyectados con los morfolinis (**Fig. 6 A**). La cuantificación de los *dot blots* evidenció una reducción del 30% y 23% en la abundancia global de 5mC en los lados inyectados con FolR1-MO y Rfc1-MO, respectivamente (**Fig. 6 B**). Por otro lado, cuando inyectamos el Control-MO no observamos una variación en la abundancia de 5mC (**Fig. 6 C, D**). Todos

estos resultados indican que *FoIR1* y *Rfc1* son requeridos para el normal establecimiento de la metilación de las histonas y del ADN durante el desarrollo temprano.



**Fig.6.- Pérdida de función de *FoIR1* y *Rfc1* reduce la metilación global del ADN.** Ensayos de *dot blot* usando anticuerpos contra 5mC en ADN extraído de embriones tratados con morfolinolinos *FoIR1*-MO, *Rfc1*-MO (**A**) y morfolino control (**C**). Se uso 50, 5 y 0.5 ng (A), y 100, 50 y 25 ng (C) de ADN<sub>g</sub> por dot que fue extraído de los lados inyectados (+) y no inyectados (-) con los morfolinolinos. La tinción con bromuro de etidio (A) y azul de metileno (C) demostró que una similar cantidad de ADN<sub>g</sub> fue cargado en las membranas. (**B**, **D**) Histogramas representando la cuantificación de los Dot Blot de (A) y (C) respectivamente. ADN<sub>g</sub>: ADN genómico

## 2.2.2.- Efecto de la deficiencia de folato en el desarrollo de la cresta neural y sus derivados orofaciales durante el desarrollo embrionario

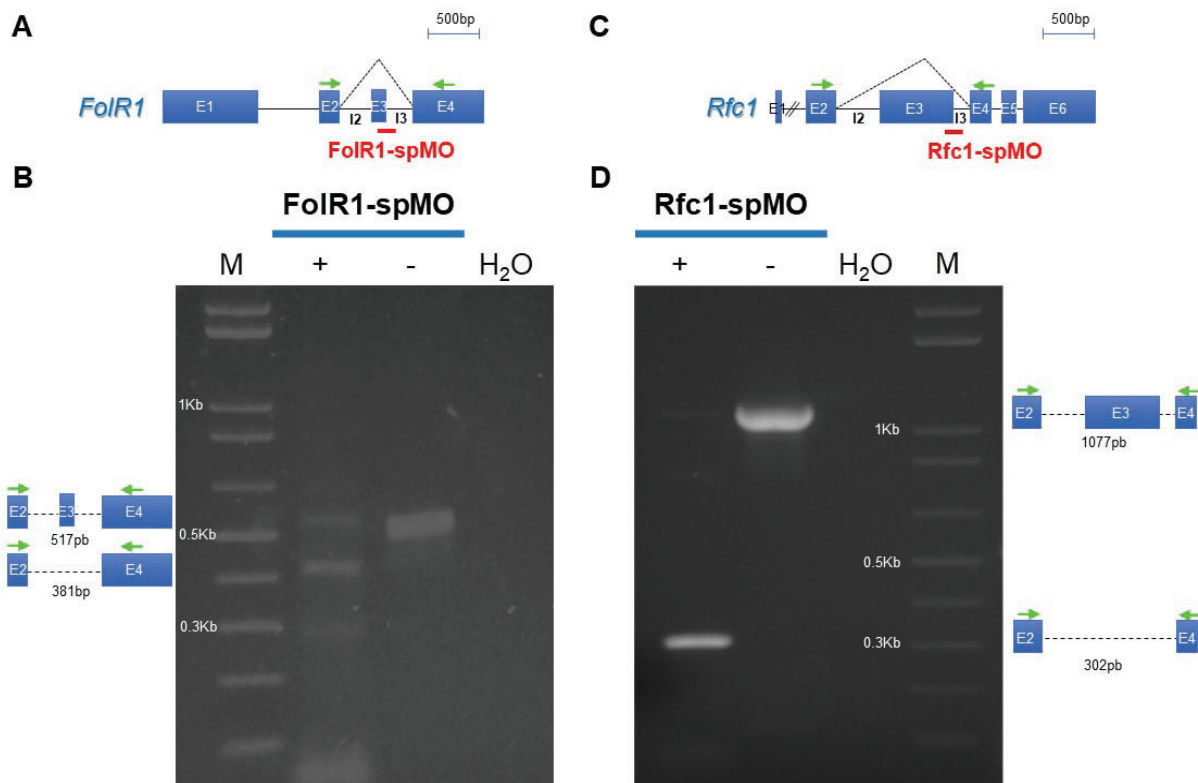
### ***a.- La pérdida de los transportadores de folato (FolR1 y Rfc1) afecta la especificación de la cresta neural e induce defectos orofaciales***

La expresión del *FolR1* y *Rfc1* en las regiones donde se formarán las células de la cresta neural nos hizo preguntar si la pérdida de función de los transportadores podría afectar la especificación de las células de la cresta neural y sus derivados orofaciales. Para ello, realizamos electroporaciones unilaterales con morfolinis contra *FolR1* y *Rfc1* (morfolinis que bloquean la traducción: *FolR1*-MO y *Rfc1*-MO; y morfolinis que afectan el correcto *splicing* del ARN mensajero: *FolR1*-spMO y *Rfc1*-spMO), y con morfolino control (Control-MO). La eficiencia de los morfolinis que afectan el *splicing* fue evaluada por RT-PCR de tiempo final (**Fig. 7**). Luego, realizamos nuevamente inyecciones unilaterales de los morfolinis y evaluamos el efecto en las células de la cresta neural migratoria (HH10) mediante ISH contra el marcador *Sox10* (**Fig. 8 A**). Nuestros resultados mostraron que la pérdida de función de los transportadores de folato afectaba drásticamente la formación y migración de las células de la cresta neural (**Fig. 8 B**). Este efecto presentó distinta severidad, para lo cual catalogamos nuestros embriones en base a la severidad del fenotipo en: normal, moderado y severo (**Fig. 8 C**). El análisis estadístico evidenció un aumento significativo en el número de embriones que presentaban fenotipos severos y moderados ante el tratamiento de la pérdida de función de los transportadores de folato respecto al control. Estos resultados demuestran que la pérdida de función de los transportadores de folato es capaz de afectar la especificación y/o migración de las células de la cresta neural.

Después de delaminar del tubo neural, migrar y llegar a su destino, las células de la cresta neural se diferencian en varios tipos celulares <sup>66</sup>, por lo que cualquier alteración



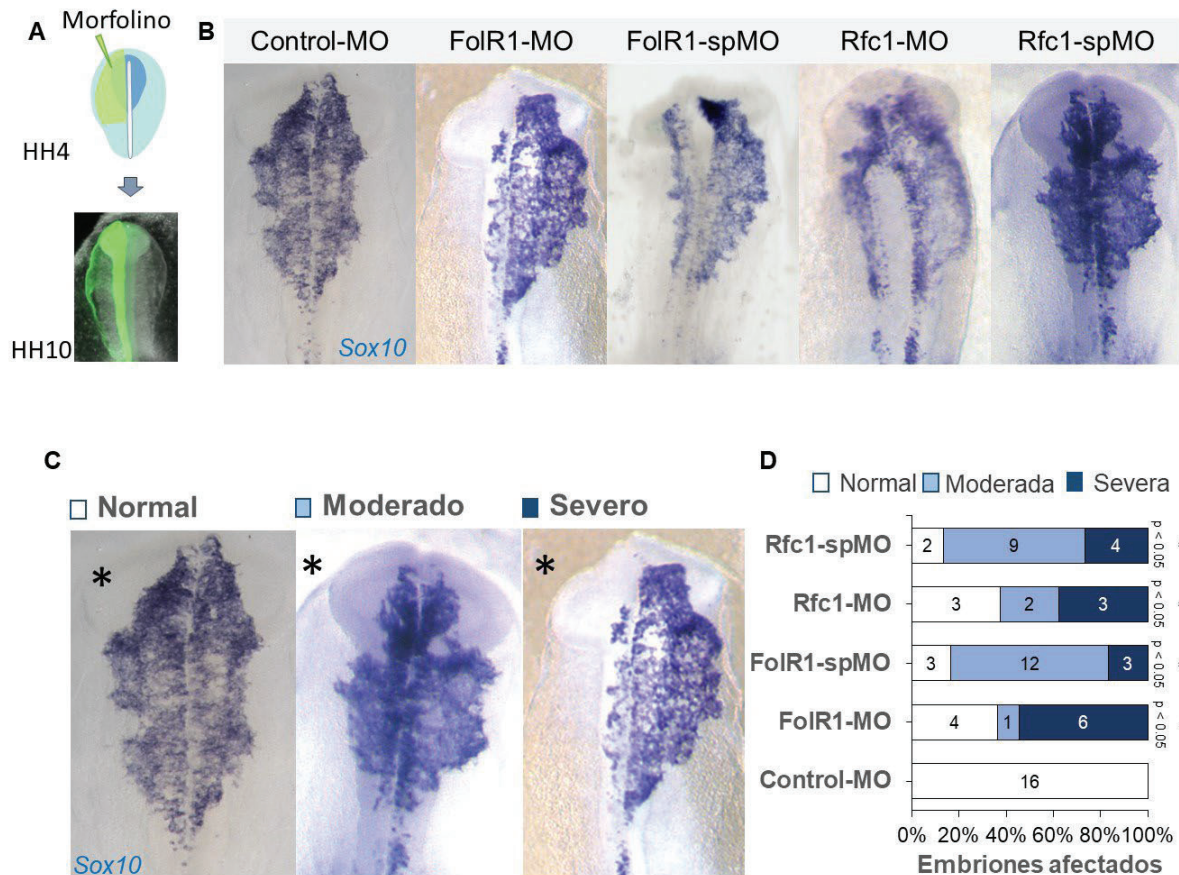
durante su desarrollo puede afectar la correcta formación de sus estructuras derivados. Por otro lado, la deficiencia de folato ha sido altamente vinculada con la presencia de alteraciones orofaciales como fisura del paladar o del labio (labio leporino) <sup>5,155,219</sup>.



**Fig.7.- Eficiencia de morfolinós de splicing FoIR1-spMO Y Rfc1-spMO.** Representación esquemática del cuerpo del gen de *FoIR1* (A) y *Rfc1* (C) y la región de unión de los morfolinós. FoIR1-spMO y Rfc1-Mo parean con la secuencia que incluye el exón3-intrón3 de sus pre-ARN mensajeros. Las flechas verdes indican la región donde los primers fueron diseñados para detectar el *splicing* anormal. (B, D) electroforesis horizontal de los amplicones obtenidos por RT-PCR del lado inyectado con morfolino (+) y del lado no inyectado (-). (B) Se observa la banda de 517pb (ARN maduro) tanto en el lado inyectado como en el no inyectado, mientras que solamente en el lado inyectado se observa una banda de 381pb (*splicing* anormal). (D) Se observa la banda del ARNm maduro (1077pb) solamente en el lado no inyectado mientras que el lado inyectado presenta una banda de 302 pb que corresponde a un proceso de *splicing* anormal.

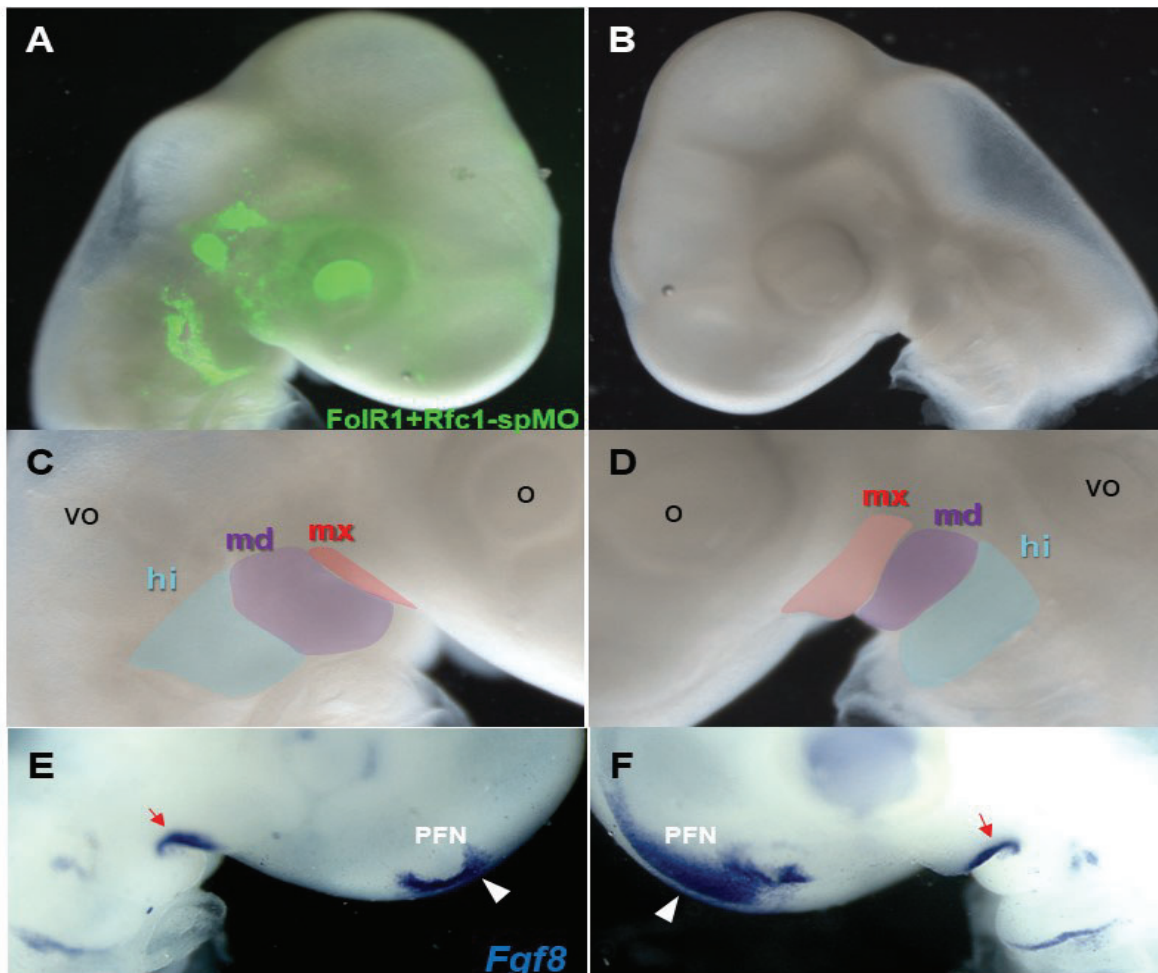
Teniendo en cuenta estos resultados, nos preguntamos si la pérdida de función de los transportadores de folato podría tener un efecto en los derivados orofaciales. Para ello, realizamos una inyección unilateral de los morfolinós FoIR1-spMO + Rfc1-spMO (los

cuales afectaban en mayor medida a las células de la cresta neural) y evaluamos la formación de estructuras orofaciales (**Fig. 9 A, B**). Nuestros resultados mostraron la presencia de defectos en la formación de la prominencia maxilar (mx), la cual estaba reducida en el lado tratado o estaba casi ausente (**Fig. 9 C, D**). Este fenotipo fue particularmente evidente cuando evaluamos la expresión del marcador ectodermal *Fgf8* (el cual se expresa en el límite de la región maxilar-mandibular, así como en el proceso fronto-nasal (PFN)) (**Fig. 9 E, F**).



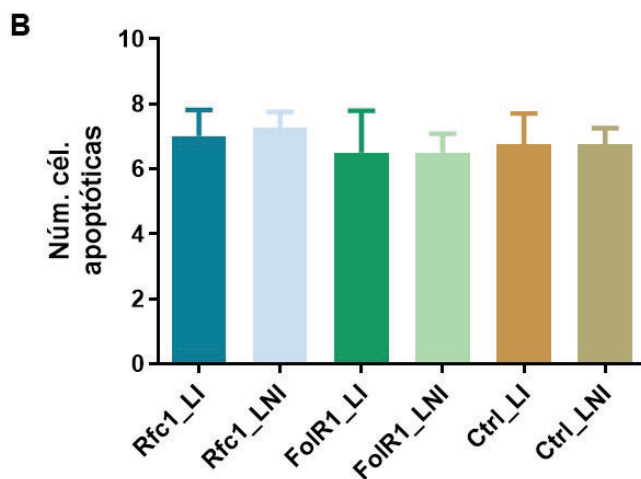
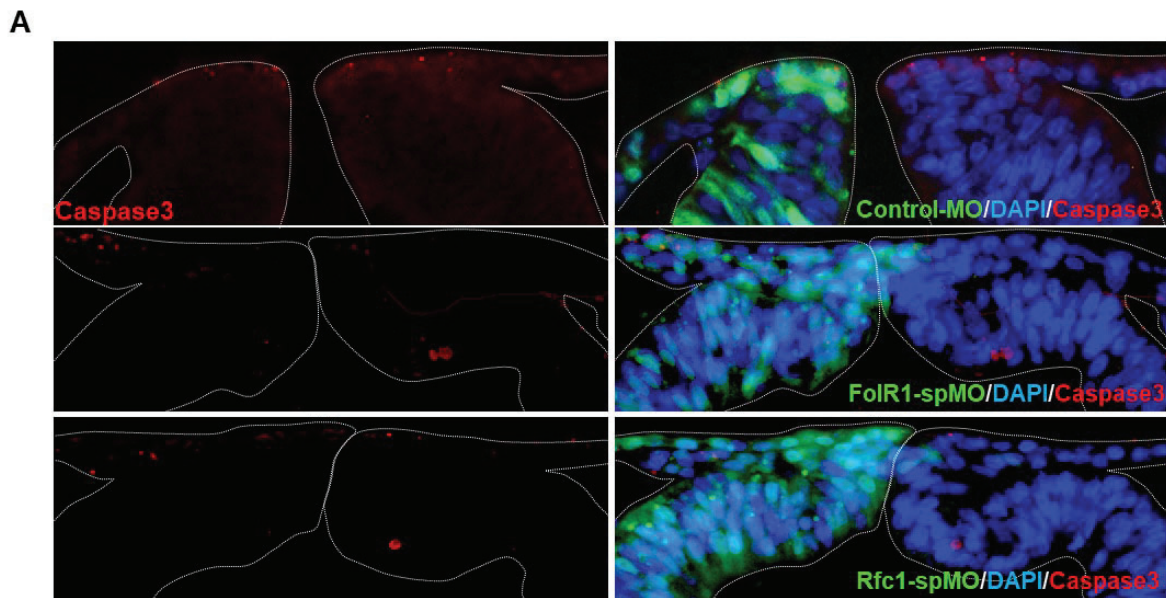
**Fig.8.- La pérdida de función de *FoIR1* y *Rfc1* genera defectos en la formación de la cresta neural. (A)** Representación esquemática del ensayo de pérdida de función. **(B)** La pérdida de función de *FoIR1* y *Rfc1* usando morfolinos que bloquean la traducción y el *splicing* (MO y spMO, respectivamente) resultó en una reducción del transcrito *Sox10* comprado con el lado no inyectado o con embriones inyectados con morfolino control (Control-MO). **(C)** La pérdida de función de *FoIR1* y *Rfc1* generó una gradación en la reducción del transcrito de *Sox10*: normal, moderada o severa. El asterisco indica el lado inyectado con morfolino. **(D)** Histogramas representando la cuantificación de los fenotipos observados en (C). El análisis estadístico se realizó mediante una tabla de contingencia seguido de la prueba  $\chi^2$ . Los números en la gráfica indica el número de embriones analizados.

Es interesante mencionar que la prominencia maxilar y el proceso fronto-nasal son estructuras importantes para la formación de estructuras homologas al paladar y la nariz en humanos. Todos estos resultados demostraron que el receptor *FoIR1* y el transportador *Rfc1* son requeridos para el normal desarrollo de las células de la cresta neural craneal y sus derivados orofaciales.



**Fig.9.- La pérdida de función de *FoIR1* y *Rfc1* genera defectos en el desarrollo de estructuras orofaciales.** (A-B) Embriones en estadio HH16-17 que fueron inyectados unilateral de los morfolinis *FoIR1+Rfc1-spMO*. (C-D) La pérdida de función de *FoIR1* y *Rfc1* genera una reducción del proceso maxilar en comparación con el lado no inyectado. (E-F) Hibridación *In situ* contra el marcador *Fgf8*. El lado inyectado con los morfolinis presenta una reducción del transcritto de *Fgf8* en la región del proceso fronto-nasal (cabeza de flecha blanca) y en límite entre el proceso maxilar y mandibular (flecha roja). mx: proceso maxilar, md: proceso mandibular, hi: hioide, PFN: proceso fronto-nasal.

Debido a que observamos defectos en la formación de células de la cresta neural y en sus derivados orofaciales, nos planteamos la posibilidad que la deficiencia de folato pueda estar generando un aumento en la muerte celular de las mismas. Para evaluar esta posibilidad, realizamos IHC contra la Caspasa 3 activada <sup>220,221</sup> en cortes transversales de embriones tratados con los morfolininos (**Fig. 10**). Sin embargo, no encontramos un incremento en el número de células apoptóticas, descartando la posibilidad que los fenotipos observados se deban a una muerte celular exacerbada.



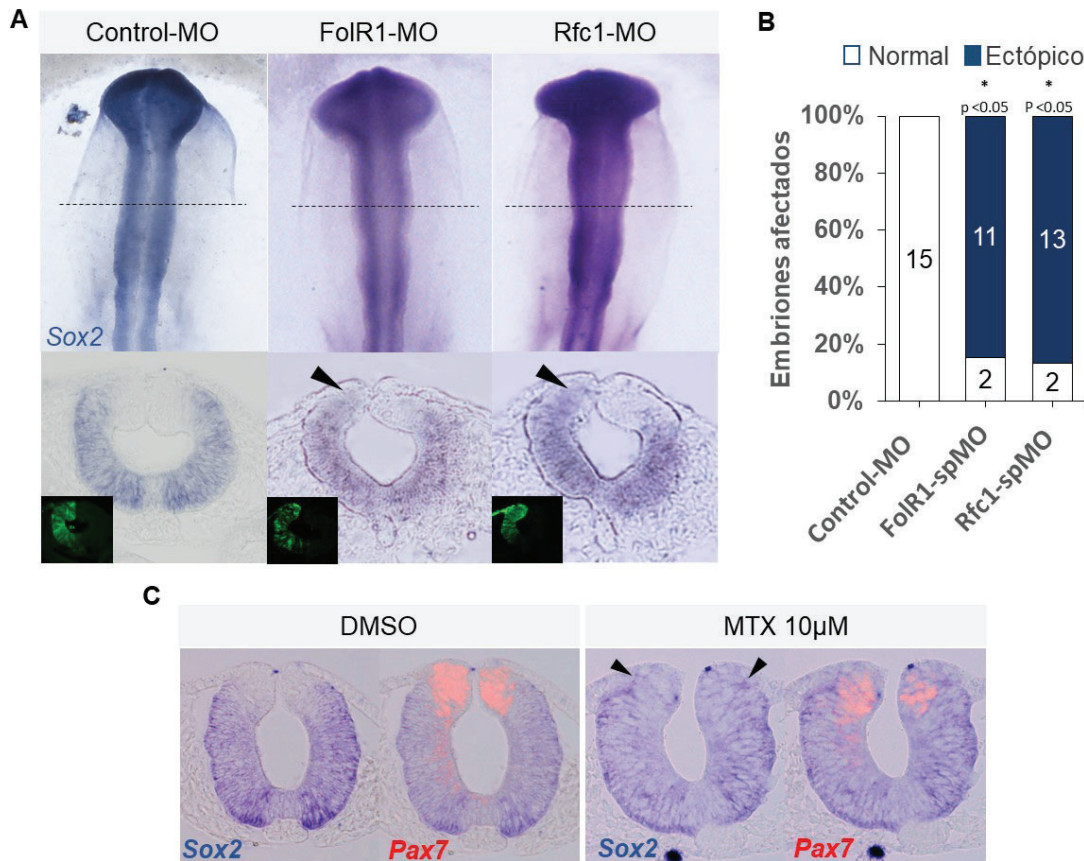
**Fig. 10.- La pérdida de función de *FolR1* y *Rfc1* no genera un incremento de apoptosis. (A)** Región dorsal del tubo neural mostrando algunas células caspasa3-clivada+ en embriones inyectados con *FolR1*-spMo, *Rfc1*-spMO o Control-MO. **(B)** Histograma representando la cuantificación del número de células caspasa3-clivada+ observadas en (A). No se encontró diferencia significativa entre el lado inyectado (LI) y el lado no inyectado (LNI) usando el análisis ANOVA ( $p$  value = 0.7708)  $n= 5$  embriones. LNI: lado no inyectado, LI: lado inyectado

### ***b.- La pérdida de *FoIR1* y *Rfc1* cambia el destino de la cresta neural hacia una neural***

Los resultados anteriores generaron la pregunta de si los defectos en el desarrollo de la cresta neural eran debido a fallas en la especificación o un cambio en el destino celular de sus progenitores. Para investigar esta interrogante decidimos evaluar la expresión del marcador neural *Sox2*. Para ello, los embriones inyectados con los morfolinós (*FoIR1*-MO y *Rfc1*-MO) fueron sometidos a HIS contra *Sox2* y cortados transversalmente en crióstato. Observamos que la pérdida de función de *FoIR1* o *Rfc1* generaba una expresión ectópica (>80% de embriones) de *Sox2* en el territorio de la cresta neural comparado con el lado control (**Fig. 11 A, B** - punta de flecha). Adicionalmente; para corroborar que el efecto observado estaba relacionado con defectos en la abundancia de folato en las células, decidimos usar la droga metotrexato (MTX) - droga anti-folato que inhibe el ingreso y metabolismo del folato en la célula<sup>222-224</sup>. El tratamiento con metotrexato también generó una expansión ectópica de *Sox2* hacia el territorio dorsal del tubo neural. Al observar esto, decidimos evaluar qué pasaba con las células de la cresta neural, para ello, realizamos también una inmunohistoquímica en los mismos cortes contra el marcador de cresta neural PAX7. Observamos que al mismo tiempo que se generaba una expresión ectópica de *Sox2*, se observaba una reducción en el número de células PAX7+ (**Fig. 11 C** - punta de flecha); demostrando que la alteración del ingreso y/o metabolismo del folato afecta el destino de las células del tubo neural dorsal.

Al observar estos resultados, decidimos evaluar si este efecto también era generado en nuestros embriones tratados con los morfolinós. De manera similar, los resultados mostraron que la pérdida de *FoIR1* o *Rfc1* expandía la expresión de *Sox2* en la parte dorsal

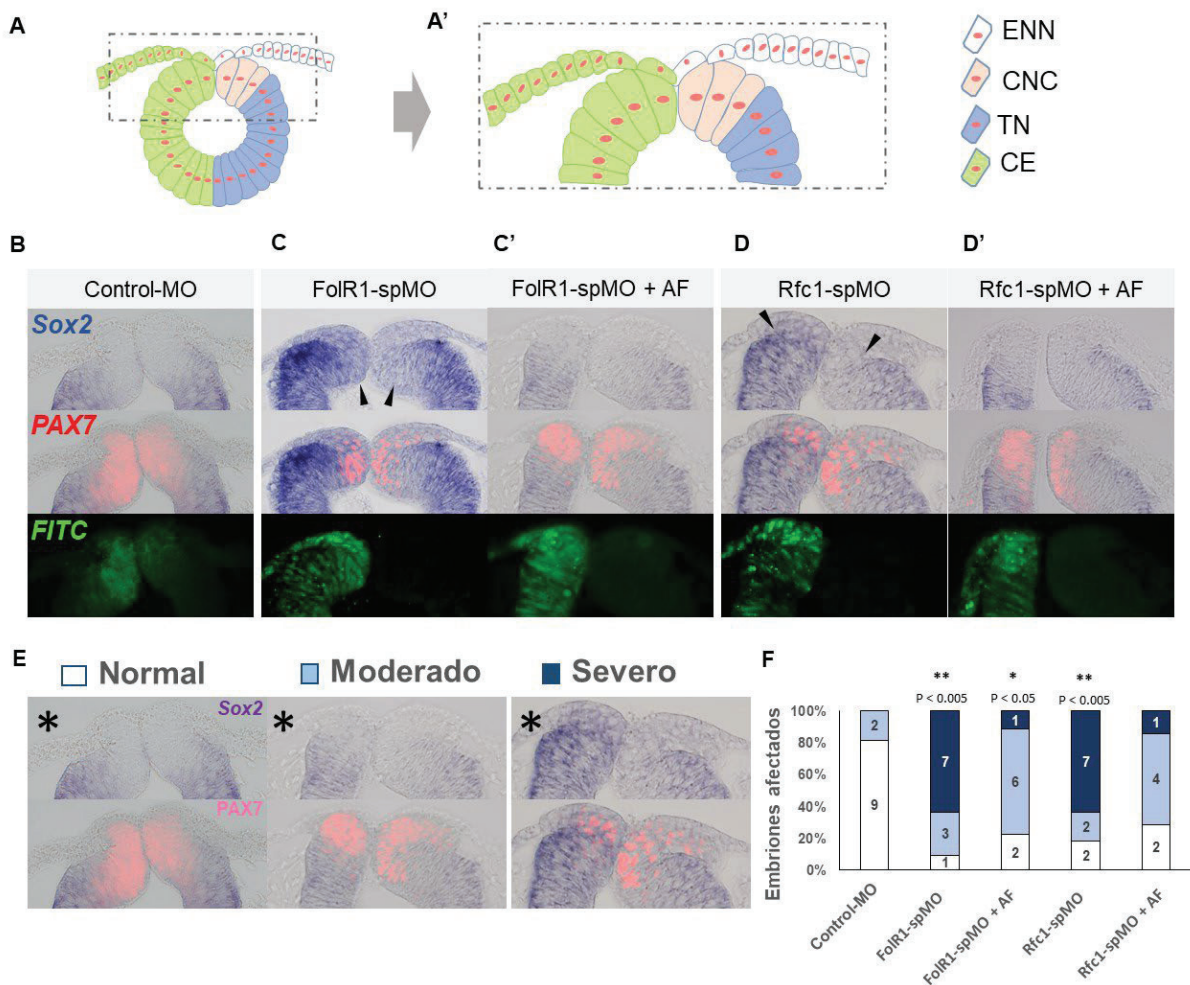
del tubo y al mismo tiempo disminuía el número de células PAX7+ respecto al lado control o con embriones inyectados con el Control-MO (Fig. 12 B, C, D, F). Además, observamos que mientras mayor era la expresión ectópica de Sox2, más severa era la reducción del territorio de células PAX7+ (cresta neural) (Fig. 12 E, ver fenotipo severo).



**Fig.11.- Folato es requerido para la represión de Sox2 en el territorio de la cresta neural. (A)** Pérdida de función de *FolR1* y *Rfc1* (lado izquierdo, fluorescencia verde) resulta en la expansión de Sox2 hacia el territorio de la cresta neural (punta de flecha negra) en el lado inyectado comparado con el lado no inyectado. Las líneas punteadas indican la región que corresponde a los cortes transversales. **(B)** Histograma representando la cuantificación del número de embriones tratados con los morfolinós que presentaron expresión normal o ectópica de Sox2 en el lado inyectado respecto no inyectado en el mismo embrión. En análisis estadístico se hizo con una tabla de contingencia seguido de la prueba  $\chi^2$ . Los números dentro de la gráfica indican el número de individuos analizados. **(C)** Inhibición farmacológica del ingreso y/o metabolismo del folato por MTX produce una expansión ectópica de Sox2 en el territorio de la cresta neural (punta de flecha negra) y una reducción de células PAX7+.

Para evaluar si el fenotipo observado podía ser rescatado, decidimos realizar una suplementación con ácido folínico (AF) a los embriones que habían sido electroporados con los morfolinós<sup>132,225</sup>. Nuestros resultados muestran que la adición de AF redujo parcial

o totalmente la expresión ectópica de *Sox2* (Fig. 12 C', D', F), llegando incluso a restaurar el territorio de células PAX7+. Todos estos resultados demuestran que la pérdida de *FoIR1* o *Rfc1* induce una reducción del territorio de la cresta neural generada por una falla en la especificación de los progenitores de la cresta neural (en la parte dorsal del tubo) los cuales pierden el destino de cresta neural y adoptan uno neural.

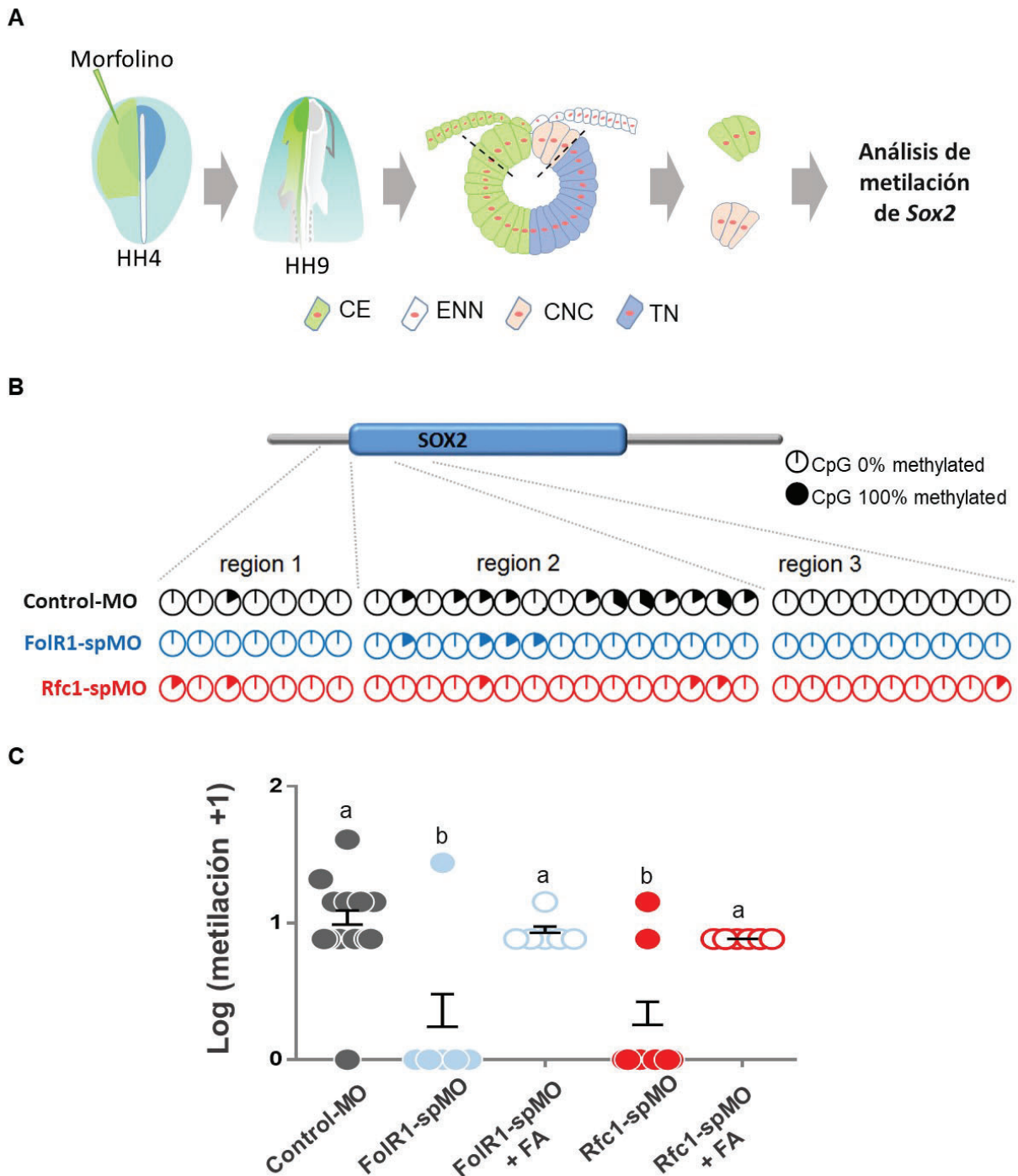


**Fig.12.- La pérdida de función de *FoIR1* y *Rfc1* cambia el destino de la cresta neural hacia uno neural en la parte dorsal del tubo (A)** Representación esquemática del ensayo de pérdida de función de *FoIR1* y *Rfc1* y de la (A') región dorsal del tubo neural analizada. (C, D) La pérdida de función de *FoIR1* y *Rfc1* (FITC) genera una expresión ectópica de *Sox2* hacia el territorio de la cresta neural (cabeza de flecha negra) y una reducción de las células PAX7+ comparado con el lado no inyectado o el Control-MO (B). (C', D') La adición de ácido fólico rescata parcial o completamente el fenotipo observado en (C, D). (E) La reducción de las células PAX7+ y la expansión de *Sox2* se da de manera moderada o severa. Asteriscos representan el lado inyectado con el morfolino. (F) Histograma representando la cuantificación del porcentaje de embriones tratados y que presentaron los fenotipos observados en (E). El número dentro de la gráfica representa el número de embriones con analizados. El análisis se realizó mediante una tabla de contingencia seguida de la prueba  $\chi^2$ . ENN: Ectodermo no neural, CNC: cresta neural craneal, TN: tubo neural, CE: células inyectadas con morfolino.

***c.- FolR1 y Rfc1 son requeridos para la represión epigenética del gen Sox2 en la región dorsal del tubo neural***

Una cosa que nos llamó mucho la atención es que los fenotipos que observamos por la pérdida de función de *FolR1* y/o *Rfc1* fenocopian a los resultados publicados por la pérdida de función de la ADN metiltransferasa 3A (DNMT3A), en donde también se generaba una expansión ectópica de *Sox2* a expensas de una reducción en el número de células de la cresta neural <sup>22</sup>. Además, en dicho trabajo se demostró que la DNMT3A es capaz de unirse a regiones regulatorias presentes en el locus de *Sox2* (+0.5kb desde el sitio de inicio de la transcripción) y de esta forma reprimir su expresión en el territorio de la cresta neural <sup>22</sup>. Considerando estos antecedentes, y que el folato sirve como donador universal de grupos metilo para la metilación del ADN, nos preguntamos si la pérdida de función de *FolR1* o *Rfc1* podría afectar la metilación del locus *Sox2* en la cresta neural. Para esto realizamos un secuenciamiento de bisulfito a partir de ADN extraído de tubos neurales dorsales provenientes de embriones control y tratados con los morfolinós, (**Fig. 13 A**) y evaluamos el patrón de metilación de tres regiones en el locus de *Sox2* (**Fig. 13 B**). El análisis de metilación mostró que el locus *Sox2* estaba metilado en la región 2 del lado control (la cual corresponde con la región en donde se demostró la unión de la DNMT3A <sup>22</sup>), mientras que los embriones tratados con *FolR1*-spMO o *Rfc1*-spMO presentaban una reducción significativa en la metilación de las CpGs presentes (**Fig. 13 B**). No se encontraron diferencias significativas en las otras regiones analizadas (regiones 1 y 3). Finalmente, la reducción en la metilación de la región 2 observada en los tubos neurales dorsales provenientes de embriones tratados con los morfolinós fue rescatada cuando los mismos fueron crecidos en albumina suplementada con ácido fólico (**Fig. 13 C**).





**Fig.13.-Los transportadores de folato *FoIR1* y *Rfc1* son requeridos para la metilación de *Sox2* en el territorio de la cresta neural. (A)** Representación esquemática del ensayo realizado. La región dorsal del tubo neural de embriones inyectados con los morfolinos (Control-MO, *FoIR1*-spMO, y *Rfc1*-spMO) fue utilizada para los análisis de metilación. **(B)** Perfiles de la secuenciación de bisulfito de la metilación de los CpG en las tres regiones analizadas (8 secuencias por región) en el locus *Sox2*. Las metilaciones CpGs son mostradas en graficas de torta: llenas (100% metiladas) y vacías (0% metiladas). **(C)** Gráfica de puntos de los ratio de CpG metilados y analizados en la región 2 del locus *Sox2*. Cada punto representa una secuencia individual. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos (mean  $\pm$  SEM, análisis ANOVA de una vía de ratios de metilación normalizados seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. p value < 0.0001).

Tomando nuestros resultados en conjunto, planteamos un modelo en donde la deficiencia de folato durante el desarrollo embrionario reduciría la disponibilidad de grupos metilo para la metilación del ADN e histonas, lo cual resultaría en la falta de represión del gen *Sox2* en el territorio de la cresta neural durante el cierre del tubo neural. La expresión ectópica de *Sox2* en la región dorsal del tubo neural ocasiona un cambio de destino y por lo tanto afecta el desarrollo normal de sus derivados ocasionando defectos en las estructuras orofaciales.

### 2.3.- Discusión y conclusión

La deficiencia de folato ha sido ampliamente relacionada con los defectos del tubo neural y neurocristopatías <sup>5-7 5-9,145,151,208-210</sup>, los cuales son los defectos congénitos estructurales más comunes a nivel mundial. Las neurocristopatías son un grupo de desórdenes que resultan de fallos en la especificación, migración y/o diferenciación de las células de la cresta neural. Las principales neurocristopatías relacionadas con la deficiencia de folato son las anomalías orofaciales: la fisura del labio y del paladar comúnmente conocidas como labio leporino y paladar hendido, respectivamente <sup>11</sup>. En relación con lo anterior, está bien establecido que la suplementación materna con ácido fólico durante el periodo preconcepcional reduce el riesgo de tener hijos con estos defectos congénitos <sup>146,158,208,226</sup>. Esto último sugiere que los defectos del tubo neural y la fisura orofacial tienen una etiología multifactoriales, y es claro que los factores ambientales – incluyendo el folato- pueden modular el riesgo de su ocurrencia. Sin embargo, surge la pregunta de ¿por qué estos tejidos son particularmente vulnerables a la deficiencia de folato? En este contexto, concentraciones elevadas de folato han sido detectadas en el sistema nervioso central durante el desarrollo, <sup>9,129</sup> lo cual es concordante con la elevada

expresión de los transportadores de folato en los progenitores neurales y de la cresta neural de diferentes especies de vertebrados <sup>9,217</sup>. En ese sentido, nuestros estudios demostraron que dos de los mayores transportadores de folato, *FoIR1* y *Rfc1*, son expresados principalmente en los tejidos neurales y de la cresta neural durante el desarrollo temprano de embriones de pollo; lo cual es similar a lo que ha sido observado en otros modelos como ranas o ratones <sup>213,214,216</sup>. Sin embargo, encontramos diferencias particulares en sus distribuciones: la expresión de *FoIR1* y *Rfc1* fue detectada en todo el tubo neural, mientras que *Rfc1* está mayormente confinado al territorio de la cresta neural premigratoria y migratoria.

Como mencionamos en la introducción, el folato es metabolizado hasta la generación de SAM, el cual es el único donador de grupos metilo requerido para la metilación del ADN, ARN y proteínas. En ese sentido, dado que los defectos en el tubo neural y las neurocristopatías poseen una etiología multifactorial e influenciados por el ambiente, es de suponer que los mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN e histonas, podrían estar envueltos en su compleja etiología. En ese sentido, nuestro estudio demuestra que la metilación de histonas y del ADN se ve reducida en los embriones deficientes de los transportadores de folato (*FoIR1* y *Rfc1*). Estos resultados están en concordancia con otros estudios que han demostrado que los niveles de ácido fólico se correlacionan positivamente con el contenido de metilación del ADN genómico <sup>126,227-229</sup>. La importancia de la metilación del ADN e histonas durante el desarrollo neural y de la cresta en embriones de pollo ha sido demostrada previamente <sup>21-23,26</sup>. En ese aspecto, nuestro trabajo demuestra que la pérdida de los transportadores de folato altera la formación de la cresta neural impactando en la formación de estructuras orofaciales como la prominencia maxilar y el proceso fronto-nasal. Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados en diferentes modelos de vertebrados y humanos, donde la deficiencia

de folato (por mutaciones o exposición a químicos que afectan el ciclo del folato) resultó en defectos del tubo neural y faciales como fisura del labio o del paladar <sup>8,155,223,230,231</sup>.

Uno de nuestros resultados que cobra una gran importancia es el hecho que la deficiencia de folato es capaz de generar una expansión del marcador neural Sox2 en perjuicio del territorio de la cresta neural al reducir el número de células PAX7+. Esto último concuerda con el rol clave que tiene PAX7 en la especificación de la cresta neural <sup>232-234</sup> y el rol represivo de Sox2 durante la formación de la cresta neural <sup>235,236</sup>. Además, un estudio realizado por Roellig *et al.* <sup>237</sup> demostró que los progenitores individuales dentro del borde de la placa neural expresan marcadores de diferentes líneas celulares. Estos progenitores no poseen un destino celular definido hasta el cierre del tubo neural, por lo que progenitores que inicialmente son SOX2+ pueden contribuir no solo al tubo neural sino también a la cresta neural <sup>237</sup>. Este trabajo propone que los niveles de los marcadores PAX7 y SOX2 están en un equilibrio y que cambios en sus abundancias relativas generan la inhibición del otro factor. Es así que un aumento de la expresión de SOX2 causa una reducción de PAX7 e induce el destino neural, mientras que un aumento de PAX7 reduce los niveles de SOX2 e induce un destino de cresta neural. Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo y de manera similar a lo observado por la deficiencia de la *Dnmt3a* <sup>22</sup>.

En conjunto, nuestros resultados demostraron por primera vez *in vivo* el mecanismo molecular por el cual la deficiencia de folato afecta la especificación de la cresta neural. La deficiencia de folato genera defectos en la represión (vía metilación del ADN) del gen neural Sox2 en el tubo neural dorsal cambiando el destino de dichos progenitores y por lo tanto afectando la especificación de las células de la cresta neural y por ende ocasionando defectos en la formación de sus derivados craneofaciales. Nuestro trabajo aporta a la

mecanística molecular destacando a las regulaciones epigenéticas como mediadores de los defectos ocasionados por la deficiencia de folato en el desarrollo embrionario.

**Todos estos resultados han sido publicados (Alata Jimenez et al., *Developmental Biology* 2018). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.08.001>**

### III.- CAPÍTULO II: ROL DEL TRANSPORTADOR *Rfc1* EN LA METILACIÓN DEL ADN Y POTENCIALIDAD CELULAR DE LOS PROGENITORES DEL BORDE DE LA PLACA NEURAL

#### 3.1.- Marco Teórico

##### 3.1.1 Borde de la Placa Neural (BPN)

###### Formación del Borde de la Placa Neural

El borde de la placa neural es una región cuyo desarrollo es sumamente complejo, así como también atrayente para las áreas de la biología del desarrollo y la biomedicina. Los motivos que la hacen sumamente atractiva son: 1.- los linajes generados en esta región darán lugar a diferentes tipos celulares, incluyendo: células madre neuroepiteliales del sistema nervioso central, células de la cresta neural, progenitores placodales y células madre epidermales. 2.- la segregación de estas células se da rápidamente, aproximadamente 12 horas en amniotas y mucho más rápido en peces y anfibios, por lo que está sometida a una muy precisa regulación. 3.- las señales secretadas para su inducción actúan a cortas distancias y en muy corto tiempo, sin embargo, actúan cooperativamente para su segregación celular. 4.- la formación del BPN permitió la aparición de dos novedades evolutivas: la cresta neural y las placodas sensoriales <sup>238</sup>.

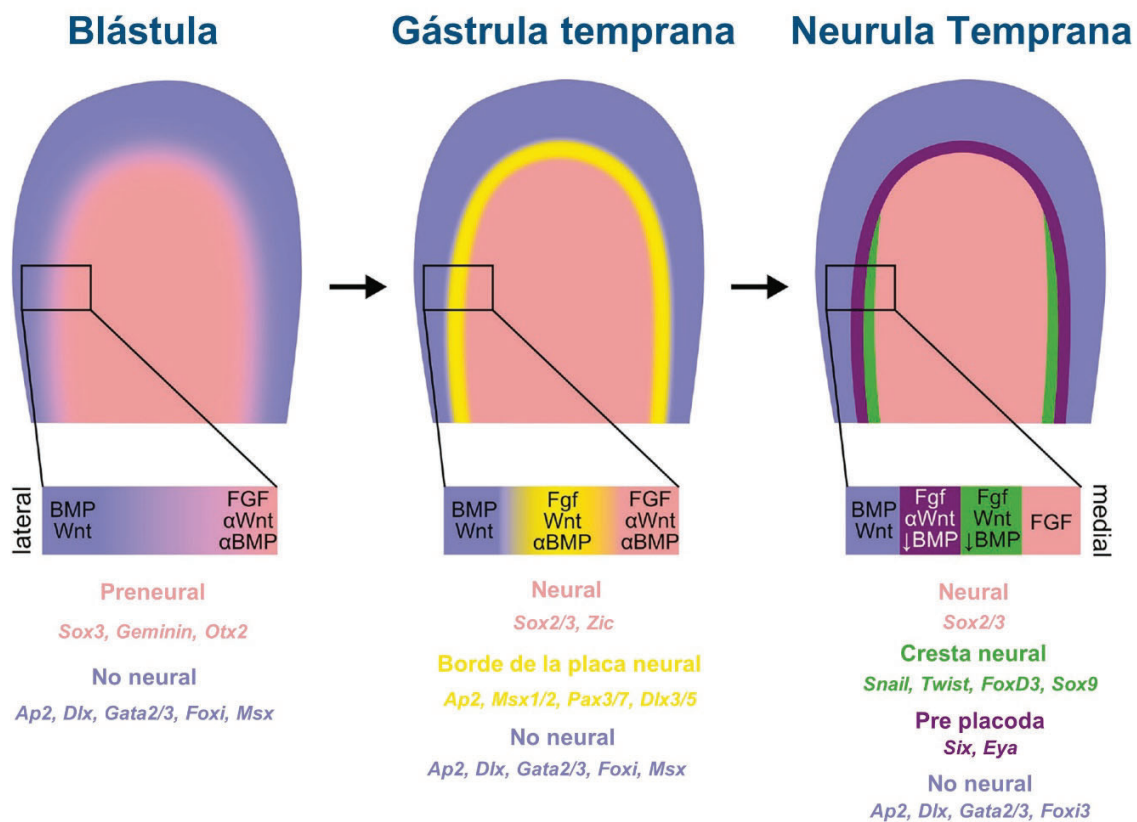
Durante la gastrulación se da la formación de las tres capas germinales: el ectodermo, mesodermo y endodermo. Posteriormente, el epiblasto (ectodermo primitivo) se somete a una refinada segregación territorial generando la placa neural (PN), el borde de la placa neural (BPN) y el ectodermo no neural (ENN) (**Fig. 14**). La PN es especificada en el territorio antero-medial y formará el sistema nervioso central <sup>239-242</sup>; por otro lado, el BPN alberga progenitores de la cresta neural (CN) y las placodas sensoriales <sup>15,243-246</sup>; mientras que el ENN dará lugar a la epidermis. Las células de la CN y la placoda son

características únicas de los vertebrados y han contribuido a la formación de diferentes estructuras craneales más especializadas dando lugar a la hipótesis de la “nueva cabeza o *new head*”, que fueron claves para el éxito evolutivo de este grupo <sup>247</sup>. En el caso de las placodas, estas generarán el epitelio olfatorio, el oído interno, formarán parte de las neuronas de ganglios sensoriales craneales y el lente del ojo. Mientras que las células de la cresta neural, como ya mencionamos en el capítulo anterior, se diferencian en neuronas y glía de los ganglios autónomos y sensoriales, células pigmentarias, y elementos del esqueleto craneofacial, entre otros derivados <sup>15,248</sup>. El desarrollo de la cresta neural y de la placoda depende del correcto establecimiento del BPN y por lo tanto cualquier alteración del desarrollo de esta estructura puede afectar la formación de sus derivados.

La formación del BPN inicia con el proceso de inducción, el cual involucra la interacción entre las señales morfogenéticas BMPs (del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*), FGFs (del inglés *Fibroblast Growth Factor*), WNTs (del inglés *Wingless-INT*) y Notch/Delta entre los estadios de blástula tardía y gástrula temprana <sup>79,94,238</sup>. Estos morfógenos provienen de diferentes regiones del embrión: BMP y Wnt desde la región más lateral del ectodermo, FGF desde la región media del ectodermo y mesodermo paraxial, y Notch/Delta desde la región media del ectodermo <sup>233,234,249,250</sup>.

Inicialmente, el establecimiento del gradiente de estos morfógenos permite la expresión de diferentes marcadores moleculares que definirán dos dominios. En primer lugar, los morfógenos FGFs o WNTs, y los antagonistas de BMPs inducirán la expresión de los marcadores pre-neurales *Otx2*, *Sox3*, *ERN1* y *Gemini* en la parte dorsal del ectodermo formando el dominio neural o futura placa neural <sup>251,252</sup>. Mientras que en las regiones del embrión donde las señales WNT y BMP4 están presentes, se da la expresión de marcadores no neurales tales como *Ap2*, *Dlx*, *Foxi*, *Gata2/3* y *Msx* definiendo el dominio no neural <sup>253,254</sup>. A medida que el epiblasto continúa recibiendo estas señalizaciones, se

comienza a establecer la región neural definitiva que es caracterizada por la expresión del gen neural *Sox2*<sup>255</sup>. Simultáneamente, en los bordes de la región neural comienzan a expresarse los componentes más tempranos del borde de la placa neural denominados “especificadores del borde de la placa neural” compuesta por genes de las familias *Pax*, *Zic*, *Dlx*, *Msx1/2* y *Ap2* (Fig.14)<sup>15,17,66,94,234,238,256–258</sup>.



**Fig. 14.- Patrón ectodermal temprano en la parte anterior del epiblasto.** En el estadio de blástula tardía, el epiblasto medio comienza a mostrar diferencias moleculares con los tejidos circundantes: la región medial expresa marcadores pre-neurales (salmón) y la región lateral (azul) expresa genes epidérmicos/no neurales. A inicios de gástrula, la zona transitoria entre el ectodermo neural y el no neural (llamado borde de la placa neural- amarillo) comienza a definirse. En estadios iniciales de neurula, el borde de la placa neural segrega en dos poblaciones espacialmente diferentes: progenitores del ectodermo pre-placodal (púrpura) y progenitores de la cresta neural (verde). Adaptado de Thawani y Grooves, 2020<sup>238</sup>

Es importante resaltar que, una vez establecida la región neural, las interacciones mutuamente represivas entre los genes neurales (ejem. *Sox2*) y los genes del borde de la placa neural permiten refinar sus límites<sup>253,259</sup>. Inmediatamente, después del



establecimiento inicial del BPN, en la región más lateral de este dominio, comienzan a expresarse miembros de la familia *Six* y *Eya* definiendo la región pre-pacodal donde se encontrarán los progenitores placodales <sup>260,253,259</sup>. Por otro lado, en la región más cercana a la placa neural comienzan a expresarse genes especificadores de la cresta neural tales como *Msx1*, *Pax3/7*, *FoxD3*, *c-Myc* <sup>83,106,260,261</sup>.

### Heterogeneidad Molecular del Borde de la Placa Neural

Estudios de marcaje celular realizados en embriones de pollo y pez cebra han mostrado que las células del BPN se caracterizan por ser una población heterogénea de progenitores que coexpresan genes neurales (*Sox2*, *Sox3*), placodales (*Six*, *Eya*) y de cresta neural (*Pax7*, *Msx1*) <sup>71,83,237,238,261–264</sup>. La heterogeneidad del borde la placa neural ha sido analizada en detalle mediante análisis transcriptómicos en embriones de pollo a lo largo de la gastrulación y neurulación <sup>71,83,261</sup>. Estos estudios mostraron que no es posible definir el borde de la placa neural mediante la expresión de un único marcador, incluso hasta en estadios de neurula tardía. Si bien el borde de la placa neural se caracteriza por la expresión de *Pax3/7*, *Ap2a* o *Msx1/2*, estos estudios transcriptómicos muestran que no existe un grupo de células que expresen únicamente estos marcadores. Por el contrario, se observa que en etapas de gástrula tardía, cuando se está definiendo la zona pre-neural, existe un grupo de células que coexpresan marcadores neurales, no neurales y de borde <sup>83,261</sup>. Esta coexpresión se mantiene aún hasta estadios de neurula tardía.

La heterogeneidad a lo largo de la gastrulación y neurulación temprana les otorga a estos progenitores del BPN propiedades similares a las células madre cuando transicionan desde un estado *naïve* hacia un estado *primed* <sup>69,237,265–268</sup>. Esta característica particular nos indica que las células del borde de la placa neural poseen una competencia celular diferente a otras regiones del ectodermo. En este sentido, es importante mencionar que la

competencia celular se define como la capacidad de una célula particular para responder a una señal inductora, adoptando un destino o grupo de destinos definidos <sup>269</sup>. La regulación de la competencia celular puede estar dada por diferentes factores como receptores, componentes específicos de señalización celular, o factores de transcripción. Sin embargo, estudios realizados en células progenitoras y células madre han mostrado que el estado epigenético de la cromatina también pueden ser un factor regulador de la competencia celular y restricción celular <sup>15,270,271</sup>. En ese sentido, uno de los procesos dinámicos más importantes que cumple un rol fundamental durante la restricción celular en el desarrollo embrionario es la metilación/demetilación del ADN<sup>169,272</sup>.

### 3.1.2 Dinámica de metilación del ADN y potencialidad celular

Después de la fecundación, el cigoto atraviesa una serie de transiciones de potencialidad celular caracterizado por cambios transcripcionales a gran escala, y que van acompañados de cambios epigenéticos. Es así como el cigoto pasa desde un estado pluripotente *naïve* a un estado pluripotente *primed* implicando una ganancia global de metilación de manera *de novo* <sup>273,274</sup>. En general, el estado *naïve* se caracteriza por carecer de la marca H3K27me3, poseer hipometilación global del ADN (incluyendo promotores y de *enhancers*), así como expresar genes de pluripotencia (NANOG, KLFs, ESRRb). Mientras que el estado *primed*, posee alta abundancia de la marca H3K27me3, hipermetilación global del ADN en *enhancers* y promotores, y expresan marcadores específicos (OTX2, ZIC2) <sup>275,276</sup>.

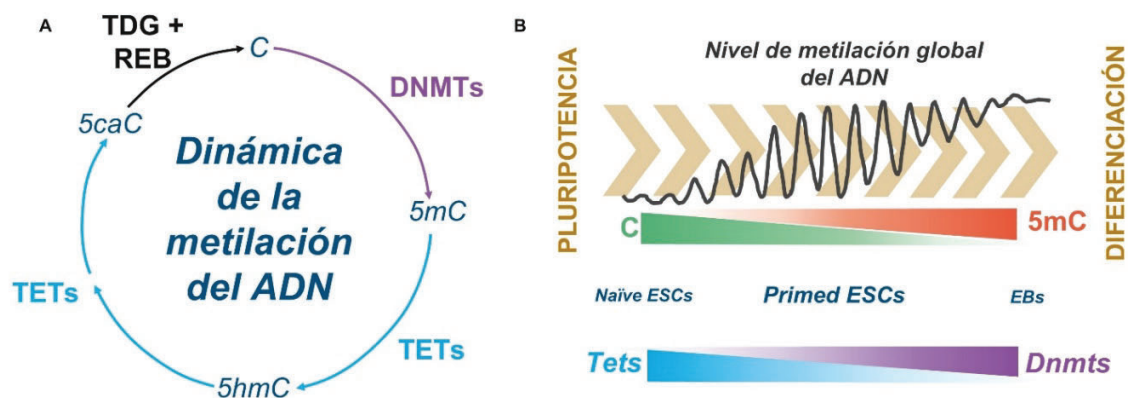
La metilación en la posición 5 de la citosina (5mC) es una de las modificaciones epigenéticas mejor estudiada y conservada <sup>51</sup>. Como ya se mencionó en el capítulo anterior, esta modificación es generada por las DNMTs y su ubicación en el genoma

permite tanto la represión y activación génica <sup>169,190,277</sup>. El rol de la metilación del ADN durante el desarrollo embrionario ha sido vinculado con la mantención o salida de estados pluripotentes de las células madre embrionarias, así como con el compromiso celular <sup>29,272,278–280</sup>. La ausencia o fallas en el correcto establecimiento de esta marca epigenética genera la completa inhibición de la diferenciación celular y por ende en la especificación de las capas germinales <sup>281</sup>. Sin embargo, durante estas transiciones las metiltransferasas *de novo* (DNMT3A/B) no son las únicas que incrementan su expresión; sino que también aumentan los niveles de las demetilinas TETs (del inglés *Ten-Eleven Translocation*) <sup>282,283</sup> (**Fig. 15 A**). Como se mencionó anteriormente, las enzimas TETs (TET1/2/3) promueven la remoción de la marca 5mC mediante oxidaciones sucesivas: primero se oxida el 5mC hasta 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) y 5-caboxicitosina (5caC) <sup>180</sup>. Esta última, es luego reemplazada por una citosina no modificada por la maquinaria de reparación por escisión de base (BER, siglas en inglés) <sup>181,284,285</sup>.

En mamíferos, la metilación global del ADN cae drásticamente desde un 70% (cigoto) hasta un 25% (pre-implantación embrionaria). Sin embargo, una vez que se da la implantación embrionaria (salida del estado de pluripotencia celular), las células comienzan el proceso de metilación global mediante la reducción de la expresión de las TET1/2 e incremento la expresión de las DNMT3A/B <sup>282,286</sup> (**Fig. 15 B**). En ese sentido, se ha observado que la pérdida de estas enzimas (al igual que fallos en la metilación) conlleva a la muerte embrionaria con severos defectos en la gastrulación; sugiriendo que la dinámica de metilación/demetilación del ADN es un proceso esencial para la continuidad del desarrollo embrionario <sup>190,282,287</sup>.

Durante estas transiciones de pluripotencia, la alta actividad de las DNMTs y TETs conlleva a rápidos cambios de metilación/demetilación del ADN que generan oscilaciones en el genoma, permitiendo que diferentes regiones de la cromatina se encuentren

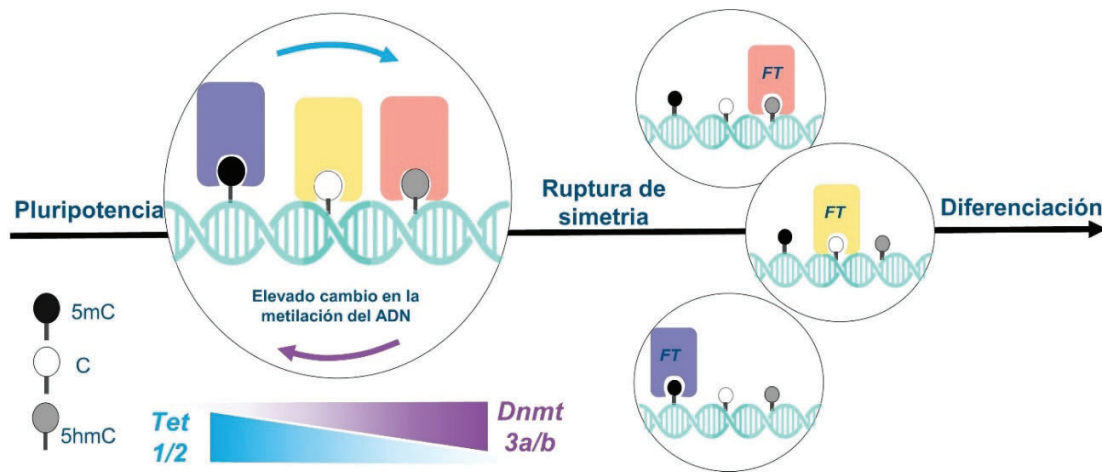
accesibles simultáneamente <sup>31,288–292</sup>. Este comportamiento fue mayormente observado en cultivos celulares durante la transición desde un estado *naïve* (caracterizado por una hipometilación global del ADN) hasta un estado *primed* (caracterizado por poseer una hipermetilación heterogénea del ADN) debido a la presencia simultánea de DNMTs y TETs <sup>31</sup>. Es importante mencionar que las oscilaciones en la metilación del ADN se daban en regiones de poca a mediana densidad de sitios CpG, como es el caso de los enhancers, sugiriendo que las oscilaciones de metilación del ADN se dan de manera diferencial en el genoma <sup>293</sup>.



**Fig. 15.- Dinámica de metilación del ADN.** (A) Representación esquemática del ciclo de metilación del ADN. Las DNMTs metilan las citosinas generando 5mC, posteriormente las TETs realizan una serie de oxidaciones generando especies intermediarias que culmina en 5caC el cual es convertido a C por acción de la TDG y de sistema REB. (B) Representación de los cambios de metilación durante la salida de pluripotencia celular. En cultivos celulares, la transición celular desde el estado *naïve* hasta un estado más diferenciado (EBs) va acompañado de un incremento en la metilación del ADN (5mC) lo cual se correlaciona con una disminución de las Tets y un incremento de las Dnmts. Sin embargo, en el estado transitorio *primed*, las Tets y las Dnmts coexpresan creando una oscilación en los niveles de 5mC en el genoma el cual se va perdiendo a medida que la expresión de una aumenta y del otro disminuye. TDG: Timinida DNA glicosilasa, REB sistema de reparación por escisión de base Adaptado de Rulands et al 2018 <sup>31</sup>.

Si bien la dinámica de metilación del ADN ha sido evidenciada experimentalmente en células madre pluripotentes, se considera que este fenómeno podría estar sucediendo en otros sistemas donde exista una coexpresión de las DNMTs y TETs <sup>289</sup>. Esto último se relaciona con la importancia que tiene la metilación del ADN en los enhancers durante el

*priming* de linajes celulares, ya que alteraciones en la metilación de dichas regiones puede conllevar a fallos en el *priming* transcripcional y por lo tanto generar un cambio de linaje celular <sup>294,295</sup>. En ese sentido, los cambios rápidos de metilación del ADN esculpirían el paisaje epigenético permitiendo que cada célula de una población coexpresara diferentes factores de transcripción (heterogeneidad); posteriormente, la disminución de la dinámica de metilación del ADN y presencia de inductores externos reduciría esta heterogeneidad (Fig. 16) <sup>289</sup>.



**Fig. 16.- Dinámica de metilación del ADN y heterogeneidad celular.** Esquema representando el posible rol de la dinámica de metilación del ADN en la heterogeneidad celular. La coexpresión de las *Dnmt3a/3b* y las *Tet1/2*, en células saliendo de un estado de pluripotencia, genera una elevada tasa de cambio entre C, 5mC y 5hmC. Esta elevada tasa de cambio permite que diferentes factores de transcripción se unan al ADN simultáneamente. A medida que avanza el desarrollo, se rompe la simetría generando que determinados estados de la C se mantengan y otros se pierdan. Finalmente, esta diferencia genera que específicos factores de transcripción se unan al ADN. FT: Factor de transcripción. Adaptado de Parry et al 2018 <sup>289</sup>

Como mencionamos previamente, las células del borde de la placa neural poseen la capacidad de coexpresar diferentes marcadores celulares manteniendo un estado similar al *primed*. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado el rol que tienen la metilación/demetilación del ADN y la segregación de linajes celulares en el borde de la placa neural. Es importante destacar que el proceso de metilación del ADN es dinámico y depende de la disponibilidad de las metiltransferasas, de las demetilinasas y del sustrato necesario para la metilación (SAM). Teniendo en cuenta estos antecedentes,

*hipotetizamos que la metilación/demetilación del ADN tendría un rol preponderante durante la adquisición de la identidad celular de los progenitores del borde de la placa neural.* Para ello nos planteamos como **objetivo general: Evaluar el rol de la metilación/demetilación del ADN durante la especificación de los progenitores celulares en el borde de la placa neural en embriones de pollo.**

### **Objetivos específicos:**

- 1.- Caracterizar la distribución espacio-temporal de las metiltransferasas, demetilinas, transportadores de folato, abundancia de 5mC y 5hmC durante el desarrollo del borde de la placa neural.
- 2.- Determinar el efecto de la deficiencia del transportador de folato *Rfc1* en la regionalización de las marcas epigenéticas 5mC y 5hmC durante el desarrollo del borde de la placa neural.
- 3.- Estudiar el efecto de la deficiencia del transportador de folato *Rfc1* en la metilación del ADN y en la potencialidad celular de las células del borde de la placa neural.

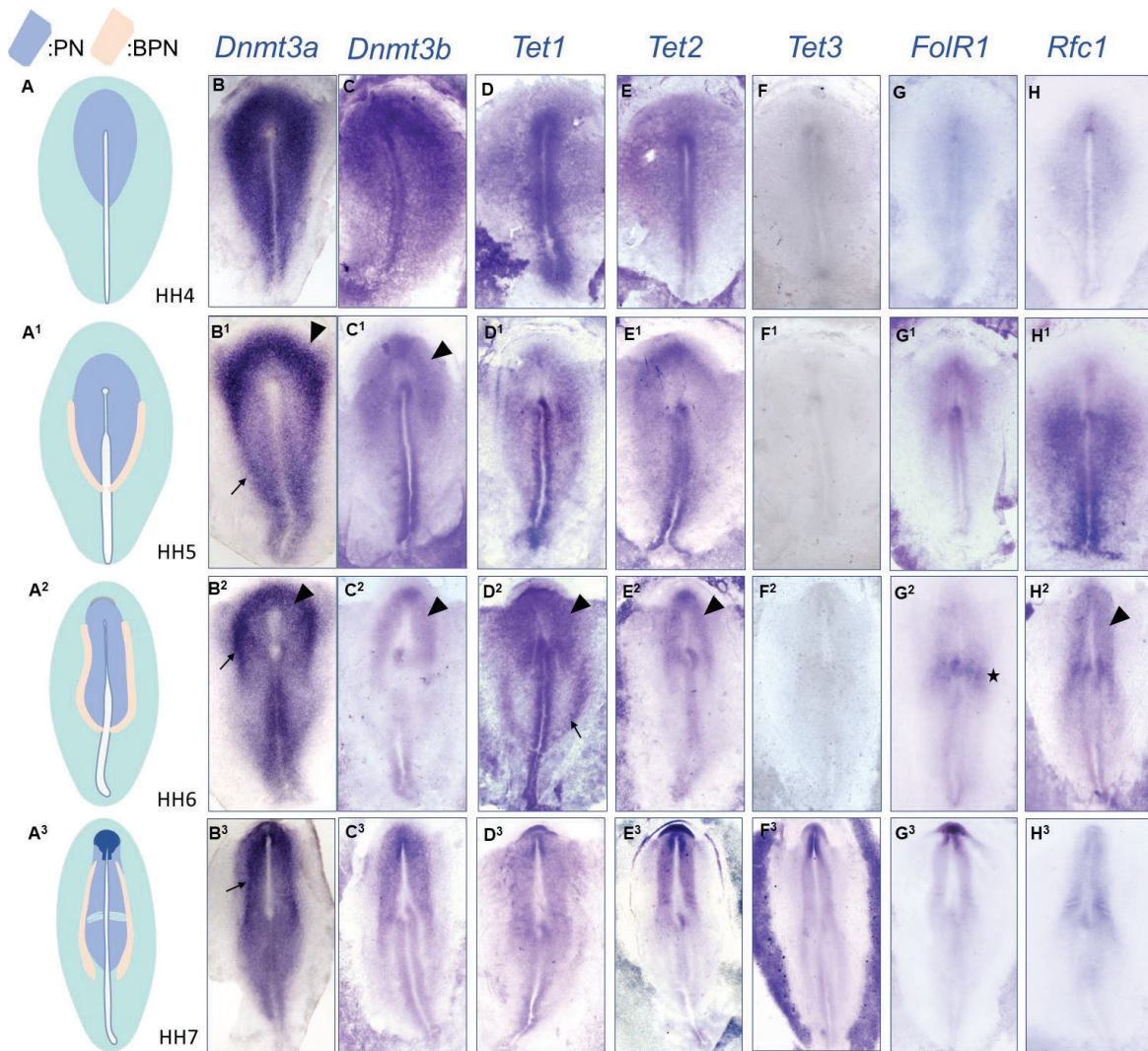
## **3.2.- Resultados**

### **3.2.1.- Distribución espacio-temporal de los genes involucrados en la dinámica de metilación del ADN y abundancia de 5mC y 5hmC durante el desarrollo del borde de la placa neural**

#### **a.- Patrón de expresión de las *Dnmts*, *Tets*, *FolR1* y *Rfc1* durante el desarrollo embrionario temprano**

Considerando: 1.- el rol de la dinámica de metilación/demetilación del ADN durante los cambios de pluripotencia celular, 2.- las células del borde de la placa neural poseen características pluripotentes durante su especificación y 3.- el folato es la fuente principal para la metilación del ADN, decidimos evaluar la dinámica temporo-espacial de la

expresión de las enzimas encargadas de la metilación (*Dnmts*), demetilación (*Tets*) del ADN y de los transportadores de folato (*FolR1* y *Rfc1*) durante el desarrollo del BPN. Para ello, realizamos hibridaciones *in situ* con sondas específicas para *Tet1*, *Tet2*, *Tet3*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* y de los transportadores *Rfc1*, *FolR1* durante la inducción y especificación temprana del BPN en embriones de pollo (desde gástrula [HH4] hasta neurula tardía [HH7]) (**Fig. 17 A-A<sup>3</sup>**). Observamos que las *Dnmts* tenían una expresión similar a lo largo de los estadios evaluados, presentándose tanto en la placa neural (PN) como en el borde de la placa neural (BPN). Sin embargo, la *Dnmt3a* (**Fig. 17 B-B<sup>3</sup>**) poseía una mayor expresión en el BPN (flechas), mientras que la *Dnmt3b* (**Fig. 17 C-C<sup>3</sup>**) presentaba una mayor expresión en la PN (cabeza de flecha). En el caso de las *Tets*; *Tet1*, *Tet2* presentaban una expresión tanto en la PN como en el BPN (**Fig. 17 D-D<sup>3</sup>, E-E<sup>3</sup>**). Sin embargo, a partir del estadio HH6 comienza a darse una expresión diferencial: en HH6, *Tet1* presenta una fuerte expresión en la región anterior de la PN, y en la región posterior del BPN (**Fig. 17 D<sup>3</sup>**, flecha); mientras que la *Tet2* tiene mayor expresión en la PN (**Fig. 17 E<sup>2</sup>**, cabeza de flecha); en HH7, *Tet2* presenta una alta expresión en la PN (**Fig. 17 E<sup>3</sup>**, cabeza de flecha). La expresión de *Tet3* fue evidenciada solamente en el estadio HH7 en los pliegues neurales más anteriores (**Fig. 17 F<sup>3</sup>**). Por otro lado, el análisis de expresión en estadios tempranos de los transportadores de folato evidenció que *FolR1* es preferentemente expresado en la PN (**Fig. 17 G-G<sup>3</sup>**), mientras que *Rfc1* se expresa tanto en la PN como en el BPN (**Fig. 17 H-H<sup>3</sup>**). En conjunto, los patrones de expresión de las metiltransferasas y demetilasas, así como también de los transportadores de folato, sugieren que los tejidos de placa neural y borde de la placa neural requerirían eventos dinámicos de metilación durante su desarrollo temprano.



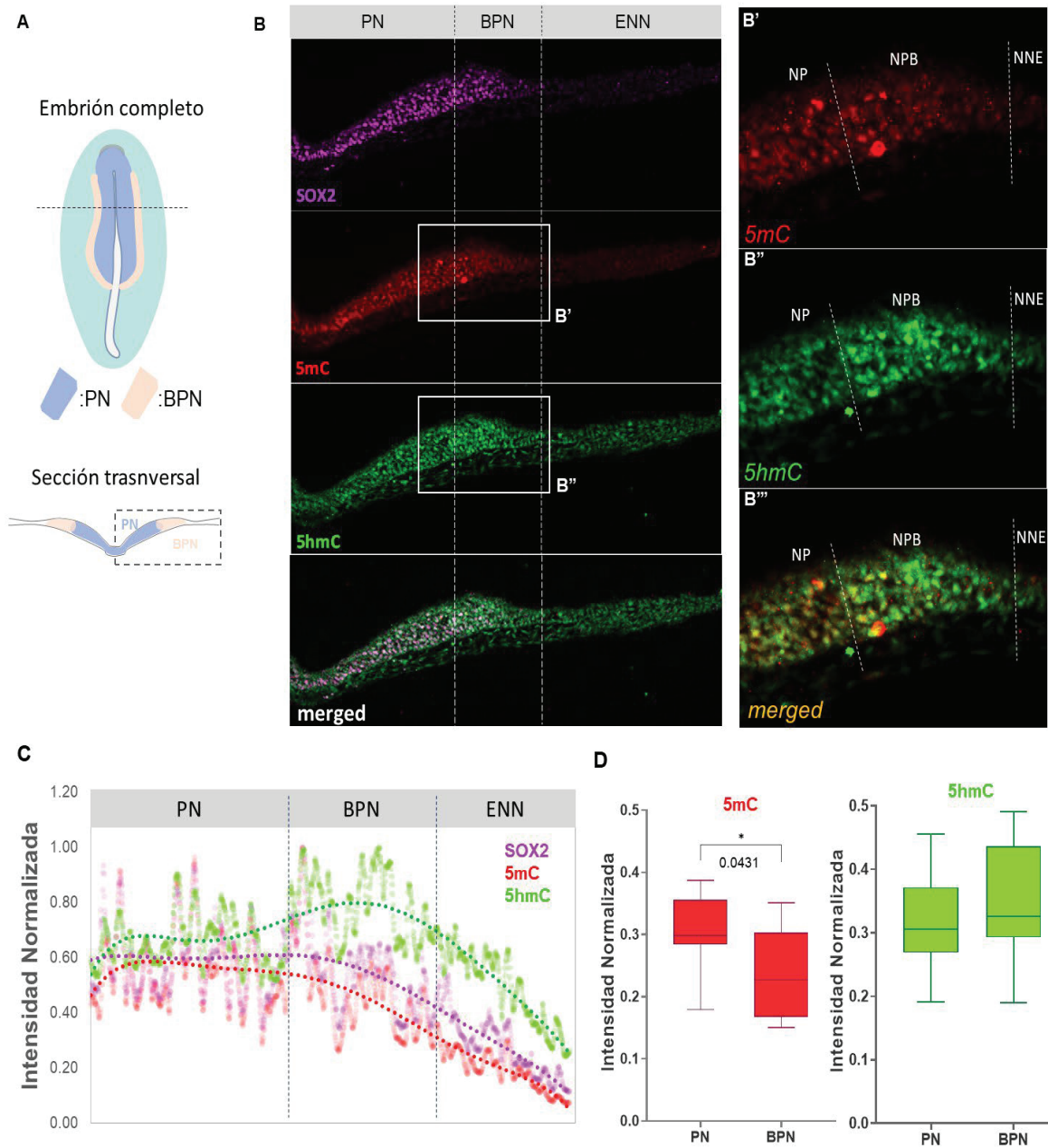
**Fig. 17.- Patrón de expresión espaciotemporal de los principales genes involucrados en la dinámica de metilación/demetilación del ADN durante el desarrollo del borde de la placa neural.** Hibridaciones *in situ* de las metiltransferasas *Dnmt3a* (B-B<sup>3</sup>), *Dnmt3b* (C-C<sup>3</sup>); demetilasas *Tet1* (D-D<sup>3</sup>), *Tet2* (E-E<sup>3</sup>), *Tet3* (F-F<sup>3</sup>) y transportadores de folato *FolR1* (G-G<sup>3</sup>), *Rfc1* (H-H<sup>3</sup>) durante los estadios de gástrula (A-H) y neurula (A<sup>1</sup>-H<sup>3</sup>). La demetilasa *Tet3* recién fue detectada en el estadio HH7 (F<sup>3</sup>), mientras que los demás genes fueron detectados a lo largo del desarrollo del borde la placa neural. PN: placa neural, BPN: borde de la placa neural.

### **b.- Distribución y abundancia de las marcas 5mC, 5hmC durante la especificación temprana del BPN**

Al observar la presencia de *Dnmt3s*, *Tets* y transportadores de folato durante la inducción del BPN (HH6), nos preguntamos si esto podría estar generando cambios territoriales en la abundancia de las marcas 5mC y 5hmC. Para ello, realizamos



inmunofluorescencia contra 5mC y 5hmC (**Fig. 18 B**) en embriones de pollo en el estadio HH6 y evaluamos sus abundancias utilizando sus intensidades de fluorescencia normalizadas de acuerdo con Roellig *et al.*<sup>237</sup>. La expresión de la proteína SOX2 fue usada para definir la extensión territorial del BPN y de la PN. Observamos una intensidad diferencial de las marcas de 5mC y 5hmC en la placa neural, borde de la placa neural y el ectodermo no neural. Específicamente, 5mC presentó una mayor intensidad de fluorescencia en la placa neural con una disminución hacia el ectodermo no neural; mientras que 5hmC presentaba una mayor intensidad en el BPN la cual disminuía tanto en la placa neural como en el ectodermo no neural (**Fig. 18 C**). Para tener una mejor resolución de estos cambios a nivel celular, decidimos analizar la intensidad de fluorescencia en células individuales localizadas en la placa neural y el BPN. Nuestros resultados mostraron que la intensidad de 5mC era mayor en la PN ( $0.3047 \pm 0.0606$ ) que en el BPN ( $0.2366 \pm 0.0705$ ) (**Fig. 18 D**). Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la intensidad de 5hmC entre las células localizadas en la PN ( $0.3194 \pm 0.0782$ ) y en el BPN ( $0.3475 \pm 0.902$ ). Esta falta de diferencia podría ser el resultado de la variabilidad observada en las células individuales que están localizadas en el BPN. Tomados en conjunto, nuestros resultados nos sugieren la existencia de una variabilidad territorial en la abundancia de la metilación del ADN, la cual podría estar involucrada en la expresión diferencial de genes para establecer las identidades celulares.

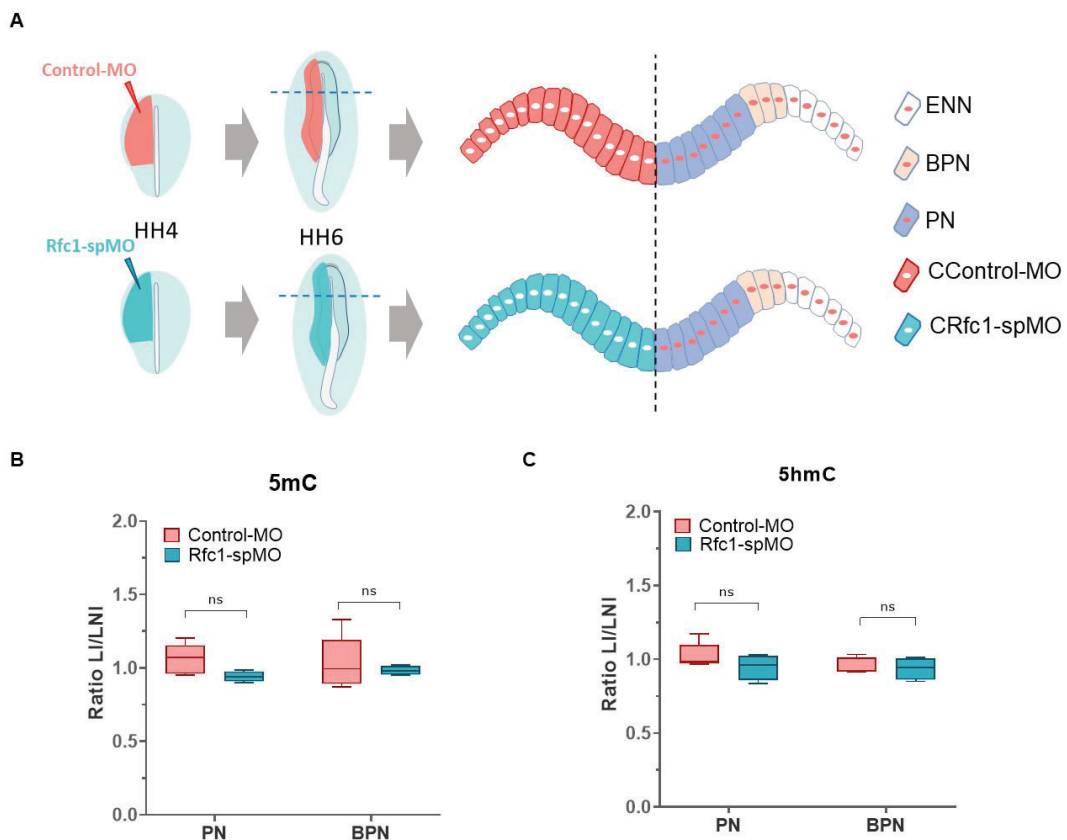


**Fig. 18.- Patrón de intensidad de las marcas 5mC y 5hmC en la PN y el BPN. (A)** Representación esquemática del estadio analizado. Las líneas punteadas representan la región del embrión que corresponde a la sección transversal evaluada en (B-D). **(B)** Inmunofluorescencia contra las marcas epigenéticas del ADN. El marcador neural SOX2 fue utilizado para determinar las regiones de PN, BPN y ENN. **(B'-B''')** Magnificación de la región del BPN mostrando una mayor intensidad de 5hmC. **(C)** Perfil de intensidad de las marcas 5mC y 5hmC a lo largo del ectodermo, observado en (B). **(D)** Histograma representando el promedio de intensidad de 5mC y 5hmC en células individuales de la PN y del BPN. Se cuantificó la intensidad normalizada de las marcas epigenéticas en los núcleos (2-3 secciones por embrión, n=4), el análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de student (unpaired) con dos colas. PN: placa neural, BPN: borde de la placa neural, EEN: ectodermo no neural

### 3.2.2 Efecto de la deficiencia de *Rfc1* en las marcas epigenéticas 5mC y 5hmC durante el desarrollo del borde de la placa neural

#### a.- Abundancia de 5mC y 5hmC en embriones deficientes de *Rfc1*

Teniendo en cuenta la premisa anterior, decidimos evaluar si la deficiencia de folato era capaz de generar una alteración en el perfil de intensidad de 5mC y 5hmC en la PN y el BPN. Realizamos electroporaciones unilaterales de los morfolininos *Rfc1*-spMO y Control-MO (*Rfc1* mostró una mayor expresión durante el desarrollo de la PN y el BPN), y realizamos IHC sobre cortes transversales (Fig. 19 A).



**Fig. 19.- La pérdida de función de *Rfc1* no altera la abundancia global de 5mC y 5hmC en la PN y BPN. (A)** Representación esquemática del ensayo de pérdida de función. Los morfolininos Control-MO y *Rfc1*-MO fueron inyectados unilateralmente, se dejaron crecer y fueron cortados transversalmente. La línea punteada indica la región del embrión que fue analizada en los cortes. **(B-C)** Histogramas representando el ratio de abundancia entre el lado inyectado y el lado no inyectado para 5mC (C) y 5hmC (D). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba múltiple de t student con un Q de 1%.

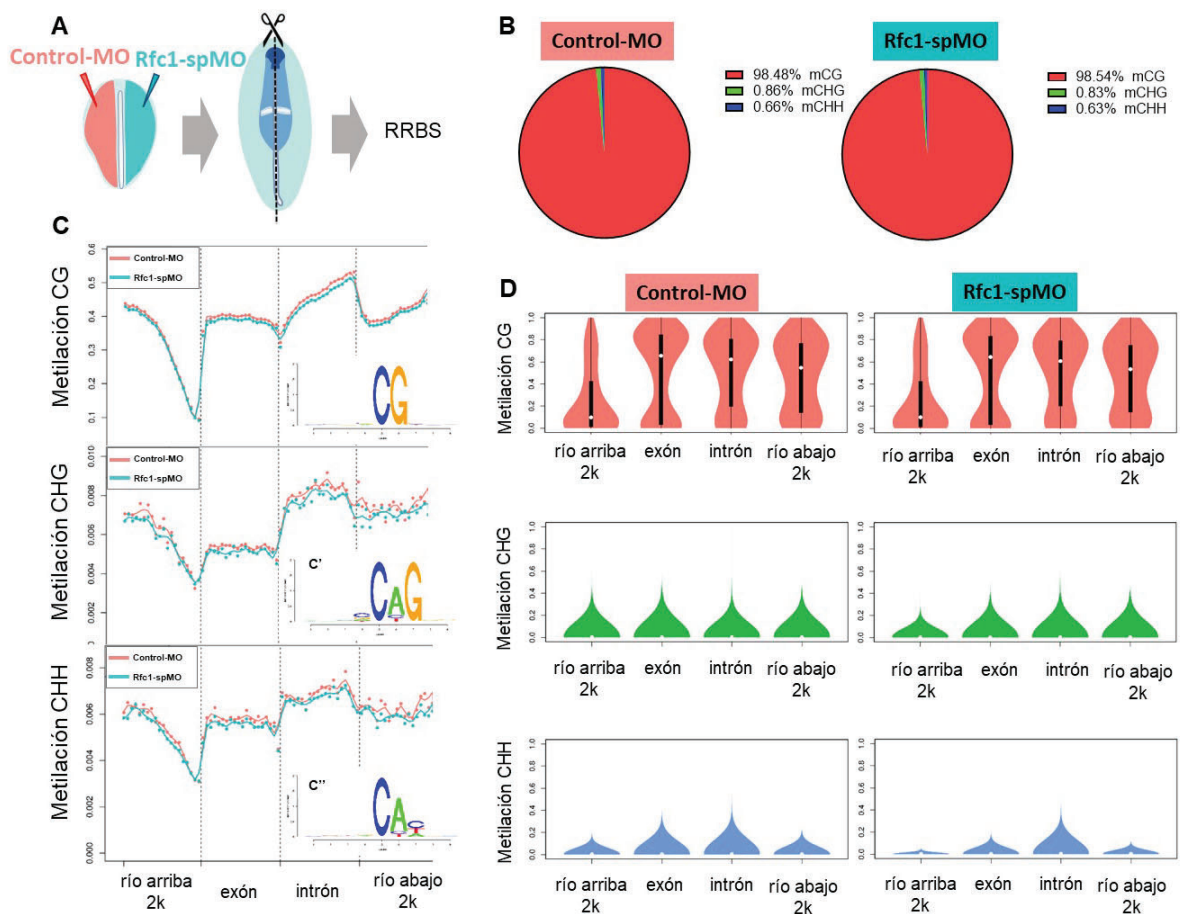
Los resultados mostraron que la pérdida de función de *Rfc1* no genera una alteración global en la intensidad de las marcas 5mC y 5hmC en los territorios analizados (PN y BPN) en comparación con los tratados con el Control-MO (**Fig. 19 B, C**). Todos estos resultados nos muestran que globalmente la marca 5mC es diferencialmente abundante entre la PN y el BPN la cual es mantenida a pesar de las perturbaciones ocasionadas.

### **3.2.3 Efecto de la deficiencia del transportador *Rfc1* en la metilación del ADN y potencialidad de las células del borde de la placa neural.**

#### **a.- La deficiencia del transportador de folato *Rfc1* genera regiones diferencialmente metiladas que afectan la especificación del BPN**

Teniendo en cuenta que la pérdida de función de *Rfc1* no generaba una alteración de 5mC/5hmC de manera global, decidimos evaluar si la pérdida de función de este transportador generaba alteración de metilación del ADN en regiones específicas del genoma. Para ello, electroporamos embriones de manera bilateral con Control-MO en un lado y *Rfc1*-spMO en el otro lado, posteriormente los embriones fueron cortados a la mitad para el análisis diferencial de metilación por Representación Reducida de Secuenciación por Bisulfito (RRBS: del inglés "*Reduced Representation Bisulfite Sequencing*") (**Fig. 20 A**). El análisis de metilación global, y en concordancia con los datos obtenidos por inmunofluorescencia, no mostró diferencias significativas al analizar las metilaciones en CG, CHG y CHH (H representa cualquier base menos G) en diferentes regiones asociadas a genes (río arriba 2kb, exón, intrón, río abajo 2kb) (**Fig. 20 B-D**). Por otro lado, y como era de esperar, la mayoría de las metilaciones identificadas se daban en los sitios CG (~98%), mientras que los sitios CHG y CHH no superaban el 1% (**Fig. 20 B**). El perfil de

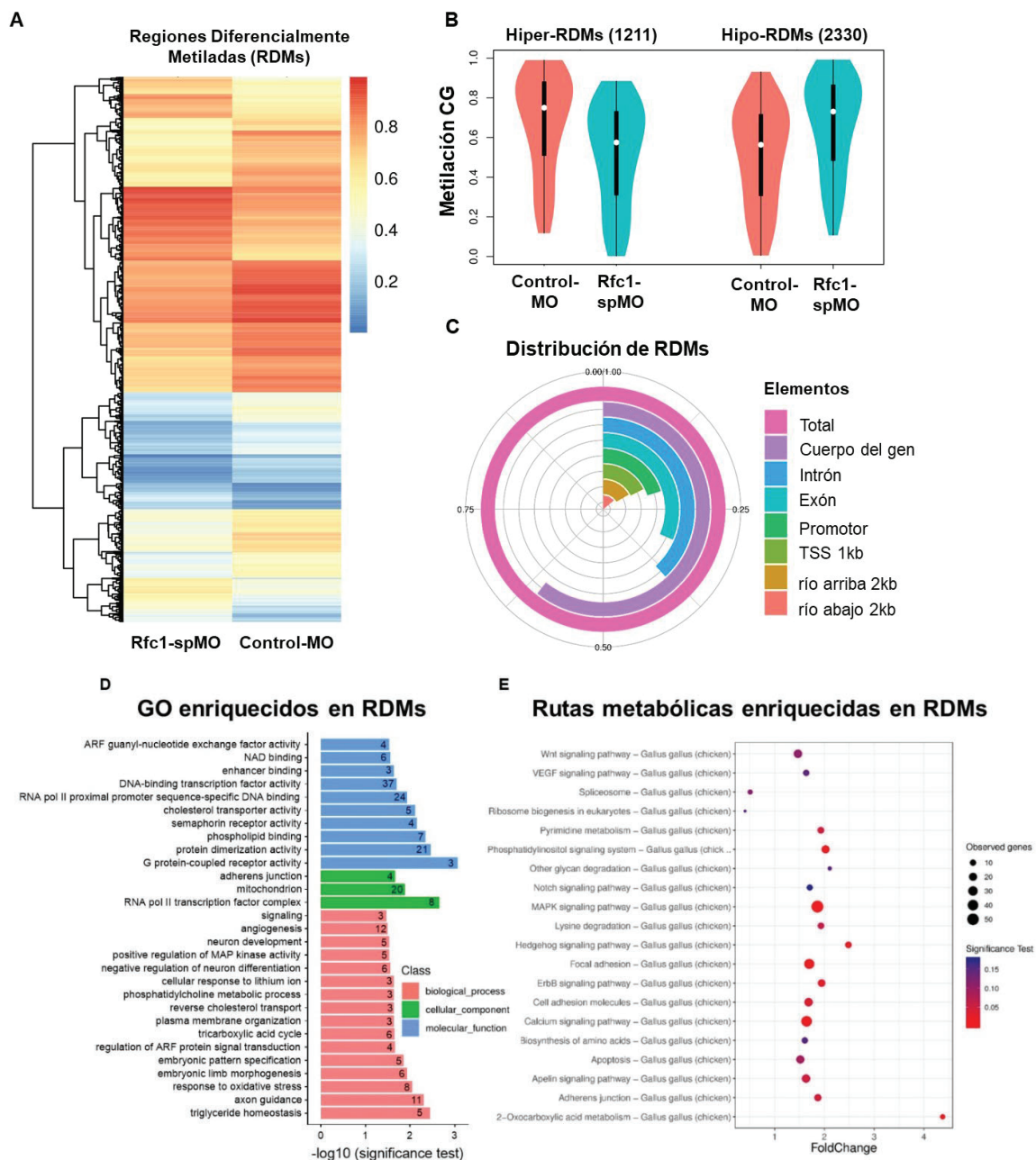
metilación que se encontraba en regiones asociadas a un gen era muy similar entre los sitios CG, CHG y CHH, siendo las regiones intrónicas las que poseían mayor metilación y las cercanas al sitio de inicio de transcripción las de menor metilación (Fig. 20 C, D). En relación con los sitios no CpG, los contextos CHG y CHH poseían un mayor enriquecimiento de A en el segundo nucleótido (Fig. 20 C', C'').



**Fig. 20.- La pérdida de función de *Rfc1* no altera la abundancia global de 5mC en el genoma. (A)** Representación esquemática del ensayo de pérdida de función para el análisis por RRBS. **(B)** Gráfico de torta mostrando la abundancia de 5mC en los contextos CG, CHG, CHH en los lados inyectados con Control-MO y *Rfc1*-spMO. **(C)** Perfil de distribución de la marca 5mC a lo largo de diferentes regiones genómicas y en los contextos CG, CHG, CHH. **(D)** Gráfico de violín de la marca m5C en las diferentes regiones genómicas.

Lo siguiente que decidimos evaluar fue la presencia de regiones diferencialmente metiladas (RDMs) debido a la pérdida de función de *Rfc1*. Identificamos 3541 RDMs, de los cuales 2374 estaban asociados a genes: 1211 regiones estaban hipermetiladas y 2330

regiones estaban hipometiladas en comparación con el control (**Fig. 21 A, B**). La mayoría de los RDMs estaban localizados en el cuerpo del gen (60%, 2145 RDMs) y una menor proporción en la región promotora (16%, 590 RDMs). Dentro del cuerpo del gen, la proporción de RDMs en los intrones y exones era muy similar (38%, 1348 RDMs y 31%, 1116 RDMs, respectivamente) (**Fig. 21 C**).



**Fig. 21.- La pérdida de función de *Rfc1* genera Regiones Diferencialmente Metiladas (RDMs) a lo largo del genoma.** **(A)** Heatmap de RDMs en la metilación CG entre embriones deficientes de *Rfc1* (*Rfc1*-spMO) y controles (Control-MO). Cada fila en el heatmap corresponde a un dato puntual de una región simple mientras que las columnas corresponden a los tratamientos. El dendograma ramificado corresponde a la relación entre los datos puntuales determinada por agrupamiento usando 3541 RDMs. Las regiones hiper e hipometiladas son mostradas en un continuo de rojo a azul respectivamente. **(B)** Gráfica de violín comparando las regiones hipermetiladas (1121) e hipometiladas (2330) en los RDMs entre los embriones Control y deficientes de *Rfc1*. **(C)** Distribución de los RDMs a lo largo de elementos génicos. 2145 se encontraban en el cuerpo del gen, 1348 en intrones, 712 en los promotores, 590 en la región 2k aguas arriba del cuerpo del gen y 493 en la región 2k aguas abajo del cuerpo del gen. **(D)** Gráfico de barras mostrando la Ontología Génica (GO) de los genes asociados con RDMs. El número dentro de cada barra indica el total de genes relacionados con el GO. El eje horizontal indica el grado de significancia de la prueba (adjP). **(E)** Gráfico de puntos mostrando las vías enriquecidas de genes asociados con RDMs. El eje vertical representa la vía y el eje horizontal representa el cambio. El tamaño de los círculos indica el número de genes afectados en la vía y el color corresponde a los diferentes rangos de p-value. El análisis estadístico de los RDMs fue realizado usando una prueba doble (prueba MWU y 2D KS) seguida de una corrección múltiple (adj. p-value). La significancia del enriquecimiento GO y KEGG fue evaluada por la prueba Hipergeométrica seguida una corrección del p-value.

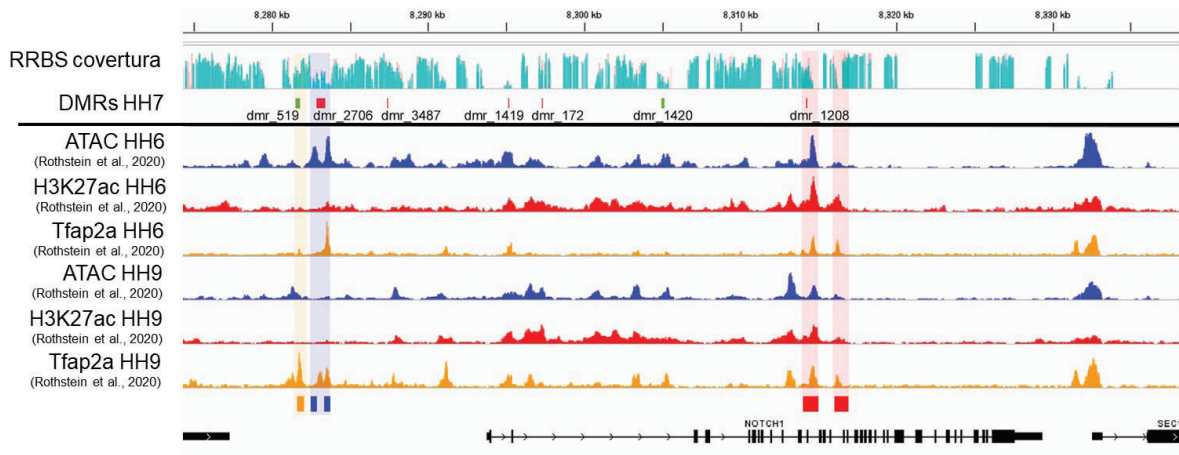
Posteriormente, evaluamos si los genes asociados a RDMs estaban relacionados con procesos del desarrollo embrionario mediante un análisis de Ontología Génica (GO, siglas en inglés). El análisis de GO mostró que los genes enriquecidos en RDMs estaban involucrados en procesos biológicos tales como especificación de patrones embrionarios, factores relacionados con el desarrollo neuronal, regulación negativa de la diferenciación neuronal, entre otros (**Fig. 21 D**). Adicionalmente, usando la Enciclopedia Kioto de Genes y Genomas (KEGG, siglas en inglés) evaluamos las rutas moleculares, biológicas o interacciones moleculares en las que estaban involucrados los genes enriquecidos en RDMs. Este análisis nos mostró que diferentes rutas de señalización como WNT, Hedgehog, MAPK y NOTCH estaban enriquecidas y tenían RDMs asociados (**Fig. 21 E**).

El proceso de formación del BPN involucra la interacción entre diferentes vías de señalización <sup>238</sup>. Entre estas, la señalización NOTCH ha sido establecida como un componente importante durante las etapas iniciales de inducción <sup>296,297</sup>, por lo que una alteración en esta vía podría generar defectos en el BPN. Teniendo en consideración esto, y que la vía NOTCH había sido identificada por el KEGG, decidimos evaluar cómo se

distribuían los RDMs alrededor del locus de *Notch1*. El locus *Notch1* contenía 4 RDMs en el cuerpo del gen (dmr\_1419, 172, 1420 y 1208) y 3 *upstream* (dmr\_3487, 2706 y 519) (**Fig. 22 A**). Entre estas, 5 RDMs eran hipometiladas (dmr\_2706, 3487, 1419, 172 y 1208) y 2 eran hipermetiladas (dmr\_519 y 1420). Además, observamos que varias de estas RDMs estaban localizadas en regiones genómicas que están asociadas con: una variabilidad en la accesibilidad a la cromatina (ATAC-seq), la presencia de la marca de enhancer H3K27ac, y/o unión del factor de transcripción pionero TFAP2A durante los estadios embrionarios HH6 a HH9 (datos obtenidos de Rothstein & Simoes-Costa<sup>93</sup>) (**Fig. 22 B**). Particularmente, encontramos que la dmr\_2706 estaba flanqueada por dos regiones de cromatina abierta que variaban significativamente entre los estadios (**Fig. 22 B**; barras azules) HH6 hasta HH9 (p-value: 1.62E-08, FDR: 3.57E-05; p-value: 4.64E-08, FDR: 6.62E-05; respectivamente). Esta dmr\_2706 hipometilada sugeriría que en nuestros embriones deficientes de *Rfc1* la cromatina podría mantenerse abierta. Por otro lado, la unión del factor de transcripción pionero TFAP2A (implicado en el remodelamiento epigenómico durante la especificación de la cresta neural<sup>298</sup>) presenta una unión diferencial entre los estadios (p-value: 0.00755, FDR: 0.105), la cual coincide con la dmr\_519 identificada en nuestro estudio (**Fig. 22 B**; barra naranja). Además, identificamos una región que presentaba cambios significativos en la abundancia de H3K27ac (p-value: 1.62E-08, FDR: 3.57E-05; p-value: 4.64E-08, FDR: 6.62E-05) la cual se superponía con la dmr\_1208 localizada en uno de los intrones del gen *Notch1* (**Fig. 22 B**; barra roja).

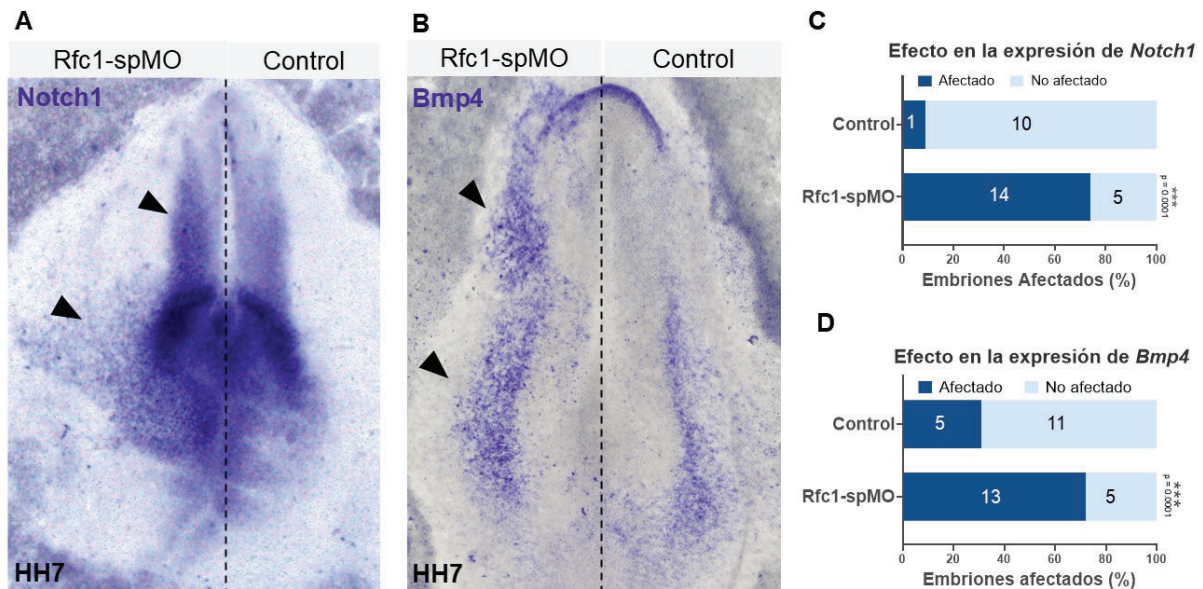
La vía de señalización NOTCH1 ha sido descrita como un factor clave en la segregación de la PN/BPN en vertebrados. La interacción entre NOTCH1 con DELTA1 regula la expresión de BMP4 en la epidermis, y es por lo tanto indirectamente requerido para la inducción del BPN entre los límites de la PN y el ectodermo no neural<sup>296,297,299</sup>.





**Fig. 22.- La pérdida de función de *Rfc1* genera RDMs en el locus *Notch1*.** Visualización IGV de los perfiles de cobertura RRBS de embriones en HH7, ATAC-seq, H3K27ac, y TFAP2A CUT&RUN de embriones en HH6 y HH9 (datos obtenidos de Rothstein et. al 2020). El análisis de elementos diferencialmente accesibles (sombreado en azul), abundancia de H3k27ac (sombreado en rojo), o unión de TFAP2A (sombreado en naranja) comparando HH6 y HH9 fue determinado usando DiffBind con una distribución binomial negativa (FDR < 0.1). HH6, HH9: estadios embrionarios de pollo según Hamilton y Hamburger.

Basándonos en estos precedentes y nuestros resultados que demuestran la presencia de varias RDMs en la vecindad del locus *Notch1*, nos preguntamos si la deficiencia de *Rfc1* podría afectar el patrón de expresión de *Notch1* y por lo tanto de *Bmp4*. Observamos que la pérdida de *Rfc1* incrementó y expandió la expresión de *Notch1* y *Bmp4* en el lado inyectado con RFC1-spMO comprado con el lado control en un número significativo de embriones (**Fig. 23 A, C**; cabeza de flecha). En conjunto, estos resultados indican la existencia de una correlación entre la metilación del ADN en regiones genómicas específicas y la expresión del gen *Notch1* durante el desarrollo. Sin embargo, se requiere más estudios para poder confirmar la mecánica de causalidad entre estos dos eventos.



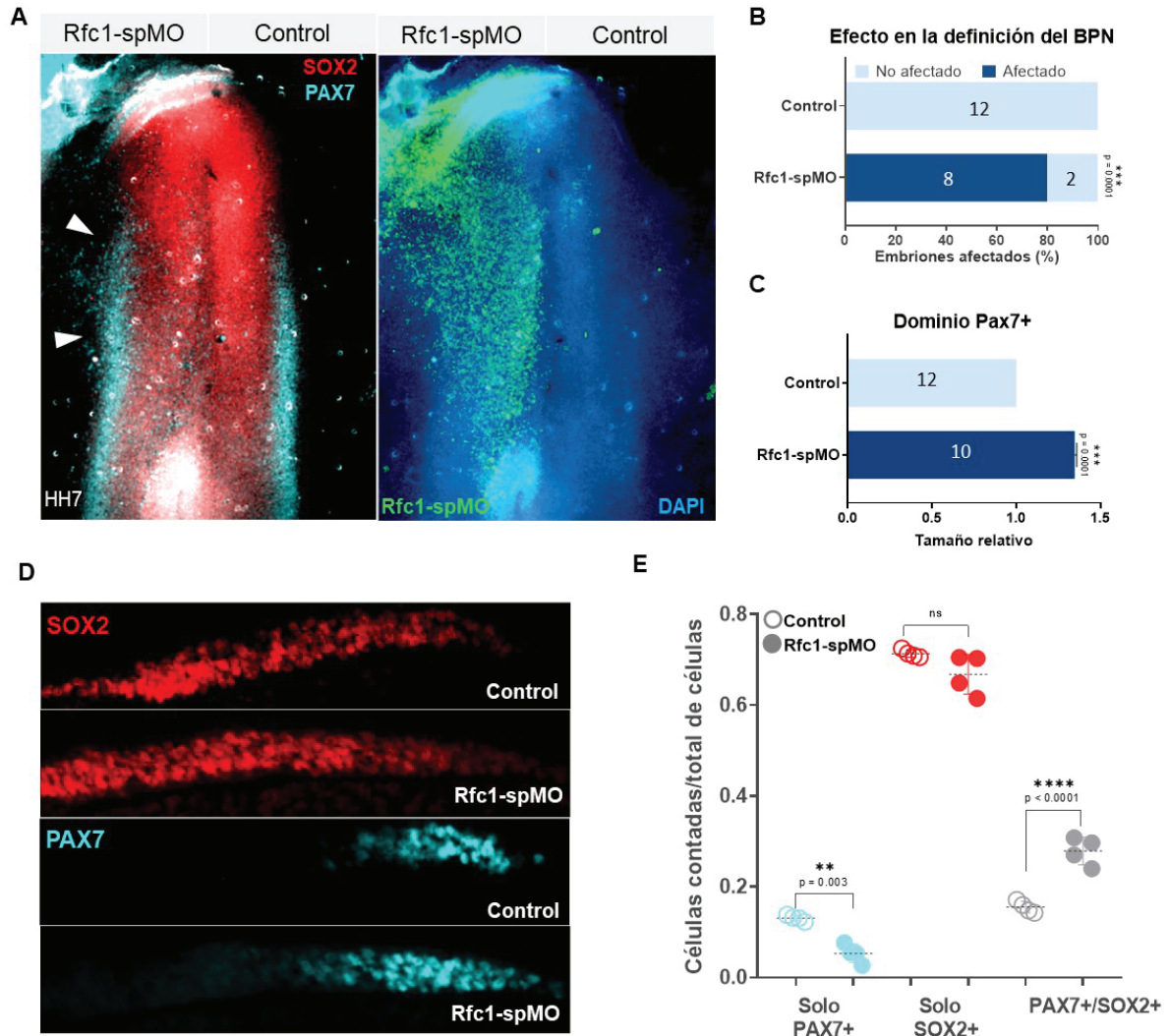
**Fig. 23.- La pérdida de función de *Rfc1* genera una expresión ectópica de *Notch1* y *Bmp4*.** Hibridaciones *in situ* de *Notch1* (A) y *Bmp4* (B). La deficiencia de *Rfc1* genera una expresión ectópica de *Notch1* y *Bmp4* comparado con el lado no inyectado y/o inyectado con el morfolino control (Control-MO) del mismo embrión. Las cabezas de flecha negra apuntan la expresión incrementada y ectópica en el lado deficiente de *Rfc1*. La cuantificación del porcentaje de embriones (inyectados unilateralmente y bilateralmente con los Control-MO y/o *Rfc1*-MO) con los fenotipos observados en (A) y (B) está representada en los histogramas (C) y (D), respectivamente. Los números dentro de las barras indican el número de embriones con los fenotipos observados en (A) y (B). El análisis estadístico fue desarrollado con una tabla de contingencia seguida de la prueba exacta de Fischer.

### b.- La deficiencia de transportador de folato *Rfc1* aumenta la bipotencialidad de las células del BPN

Teniendo en cuenta el hecho que la deficiencia de *Rfc1* expandió el territorio de expresión de *Notch1* y *Bmp4* (importantes señales involucradas en la especificación del BPN), decidimos evaluar las consecuencias que esto tenía sobre la especificación de los progenitores del BPN. Para ello, los embriones inyectados unilateralmente con *Rfc1*-spMO fueron sometidos a una coimmunofluorescencia contra SOX2 (marcador neural) y PAX7 (marcador del BPN). Nuestros resultados demostraron que la pérdida de *Rfc1* expandía el territorio del BPN comparado con el lado control (Fig. 24 A, D). Este fenotipo fue observado en el 80% de embriones (Fig. 24 B), los cuales poseían una expansión de 1.35 veces en

comparación con el lado control (**Fig. 24 C**). Dentro del BPN coexisten células que inicialmente coexpresan factores de transcripción de diversos linajes celulares (estado *primed*), luego estas células comenzarán a segregarse debido a la persistencia y represión de estos factores linaje-específicos. Sin embargo, es sabido que la mínima perturbación al estado homeostático de estas células puede redirigir y cambiar el destino celular <sup>237</sup>. Basándonos en esta idea y en nuestros resultados, decidimos evaluar si la expansión del BPN se generaba a expensas del territorio neural. Para ello, realizamos un conteo de las células que expresaban PAX7, SOX2 o ambos marcadores a la vez en los embriones deficientes de *Rfc1* (**Fig. 24 E**). En primer lugar, no observamos diferencia significativa en el número de células exclusivamente SOX2+, mientras que el número de células exclusivamente PAX7+ se encontraba significativamente reducido comparado con el control. Esto último resultó contradictorio con los resultados anteriores (**Fig. 24 A-D**), sin embargo, cuando evaluamos el número de células que expresaban simultáneamente SOX2+/PAX7+ encontramos que dicho número se encontraba aumentado significativamente en comparación con el lado control (**Fig. 24 E**). Estos resultados sugieren que la expansión del BPN por la deficiencia de *Rfc1* sería una consecuencia del incremento en la potencialidad celular de sus progenitores al mantener la coexpresión de SOX2 y PAX7.

Tomando en conjunto todos los resultados de esta sección, planteamos un modelo donde la falta de *Rfc1* afecta la metilación del ADN en regiones específicas que se correlacionan con desregulación de vías envueltas en el desarrollo temprano del BPN, tal como la vía *Notch1-Bmp4*. Estos cambios finalmente podrían afectar la potencialidad celular de los progenitores que residen en las zonas de contacto de los territorios de la PN y el BPN, y que finalmente conllevan a mantenerlos en un estado “*primed*” (**Fig. 25**).



**Fig. 24.-** La pérdida de función de *Rfc1* incrementa la potencialidad de las células del BPN. **(A)** Inmunofluorescencia contra los marcadores Pax7 (BPN) y SOX2 (PN) en embriones tratados con Control-MO y Rfc1-spMO. Las flechas blancas señalan la expansión ectópica de células Pax7+. **(D)** IHC contra los marcadores SOX2 y PAX7 en cortes transversales de embriones tratados con los morfolidos. La orientación de los controles ha sido invertida para la comparación. **(B, C)** Histogramas representando la cuantificación de los embriones con el fenotipo observado en (A) y (D). Los números dentro de las barras indican el número de embriones que presentaron los fenotipos observados. **(E)** Gráfico de puntos mostrando el número de células que exclusivamente son PAX7+, SOX2+ o PAX7+/SOX2+ en embriones tratados. Análisis estadístico para (B), (C) se realizó mediante una tabla de contingencia seguido de la prueba exacta de Fisher. Para (E), se realizó el análisis de ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

### 3.3.- Discusión y conclusiones

La especificación territorial y restricción de los destinos celulares desde una célula madre hasta los tipos celulares especializados a menudo involucran varios cambios epigenéticos, donde la metilación/demetilación del ADN juega un rol crítico. Durante el desarrollo temprano, los progenitores que residen en el BPN se segregan de la placa neural y el ectodermo no neural, pero mantienen la potencialidad para diferenciarse en células neurales, de la cresta neural, placodales y epidermales<sup>237</sup>. Estos estados de linaje entremezclados han sido también descritos durante la determinación del destino celular en el sistema hematopoyético<sup>300–302</sup>. En mamíferos, la transición que sufre una célula madre hacia un estado pluripotente-*primed* va acompañada de la metilación *de novo* generando una ganancia global de 5mC<sup>278,303–305</sup>. Este proceso también ocurre en cultivos *in vitro* durante la transición de las células en estado *naïve* hacia el estado *primed*<sup>283,306–308</sup>. Todos estos estudios muestran que la dinámica de la metilación/demetilación del ADN es un componente importante durante las transiciones que sufre una célula para adquirir una nueva potencialidad celular.

Durante nuestro trabajo, demostramos que el cambio de la metilación de ADN, llevados a cabo posiblemente por la presencia de DNMTs y las TETs, es requerido para segregar e inducir la especificación del BPN. Particularmente, demostramos que el transportador de folato RFC1 sería uno de los factores claves para proveer el sustrato de metilación requerido en regiones genómicas específicas durante el desarrollo del BPN. Es importante mencionar que la alta abundancia y variación de la marca 5hmC en el BPN podría estar ligada a un incremento y/o retención de la potencialidad celular<sup>27,30,280</sup>, así como en la reprogramación de la memoria epigenética<sup>28,29,309</sup> otorgándole la capacidad de poder generar diferentes linajes celulares. Además, los niveles de 5mC/5hmC en el

BPN podrían sugerir un sistema dinámico con un constante cambio de modificaciones de las citosinas que podría conllevar hacia un estado epigenético heterogéneo que puede afectar la expresión génica y por ende los destinos celulares. Esta idea es concordante con un estudio reciente que demostró que la heterogeneidad de la metilación del ADN se origina durante la transición de un estado de pluripotencia *naïve* hacia un estado *primed*<sup>31</sup>, indicando que los cambios dinámicos en la metilación podrían influenciar las decisiones tempranas del destino celular durante el desarrollo embrionario temprano. En este sentido, la falta de folato (fuente para la generación de grupos metilo) podría alterar esta heterogeneidad en los niveles de metilación del ADN de regiones genómicas específicas y por lo tanto en la potencialidad celular.

Entre las metilaciones no canónicas, la metilación en el contexto CA fue la que mostró mayor abundancia. Este tipo de modificación ha sido descrita con mayor preferencia en promotores<sup>310</sup> y se correlaciona negativamente con la expresión génica<sup>311,312</sup>. Aunque la metilación CA es afectada por la deficiencia de folato<sup>310</sup> y ha sido descrita como un componente que juega un rol crítico en otros contextos celulares<sup>311–313</sup>. Sin embargo, se requieren más experimentos para poder determinar el rol de este tipo de metilación en el desarrollo del BPN.

El rol del folato en la metilación del ADN ha sido ampliamente estudiado en humanos, sin embargo, se ha descrito efectos contrarios<sup>163,298,314</sup>. Algunos estudios han mostrado que la deficiencia/suplementación de folato no siempre altera la metilación global del ADN<sup>298,314–319</sup>, en cambio, sí puede afectar la metilación en determinados tejidos<sup>298,319</sup>, población de células<sup>316</sup>, o genes específicos<sup>314,315,317,320</sup>. Estos estudios concuerdan con nuestros resultados en donde la deficiencia de *Rfc1* genera RDMs en genes específicos. Es importante destacar, que las RDMs representaban sitios hiper e hipometilados, siendo estos últimos los más abundantes, lo cual también fue descrito en madres con deficiencia

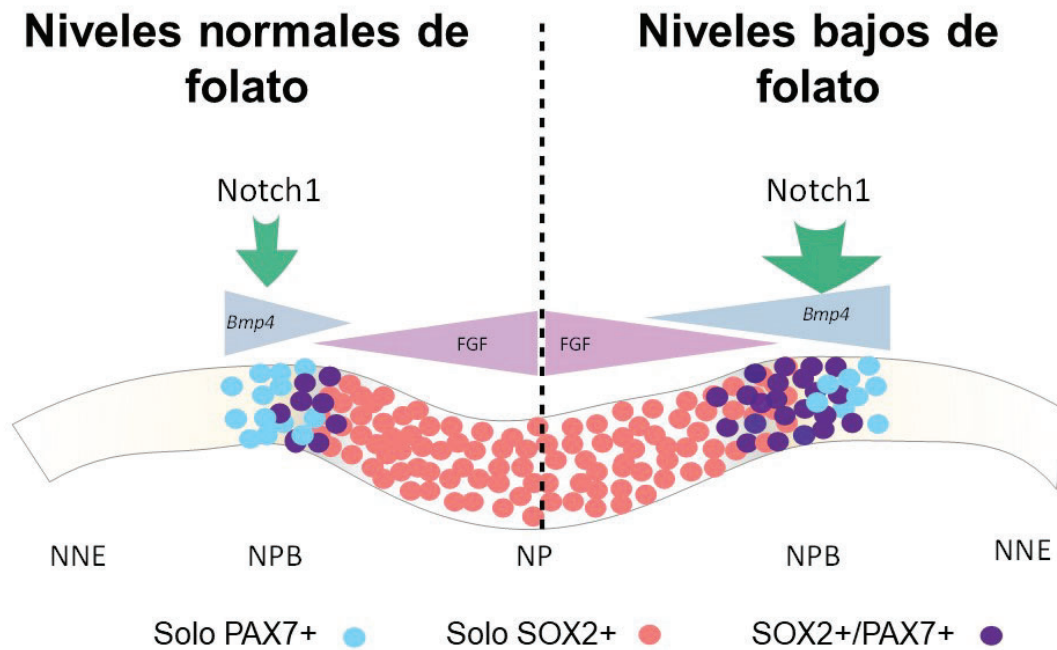
de folato <sup>318,320,321</sup>. Esto sugiere que la deficiencia/suplementación de folato puede afectar el estado de metilación de una manera heterogénea dependiendo de las regiones genómicas afectadas. Como se ha comentado previamente, la deficiencia de folato está asociada con defectos del tubo neural debido a la desregulación de genes implicados en su diferenciación <sup>310</sup>. En relación con esto, nuestro estudio demostró la presencia de RDMs en varios genes asociados con el desarrollo neuronal, con patrones de desarrollo embrionario, así como procesos epigenéticos. Particularmente, la especificación del BPN requiere la interacción de diferentes morfógenos como BMPs, FGFs y WNTs <sup>233,234,249,250</sup> que permiten la segregación molecular de los tejidos de la placa neural y el ectodermo no neural. En adición a esto, se ha visto que *Notch1* participa en la inducción del BPN mediante la regulación de los niveles de *Bmp4* y estableciendo un adecuado gradiente durante la formación de este territorio <sup>296,297,299</sup>. En relación con esto, nuestro estudio demostró que la deficiencia de *Rfc1* genera 7 RDMs en el gen de *Notch1*. Varios de estos RDMs están localizados en regiones genómicas que poseen un cambio en la accesibilidad a la cromatina, que son blancos del factor pionero TFAP2A o que contienen la marca H3K27ac (marca epigenética característica de regiones enhancer) durante la especificación del BPN <sup>93</sup>. Estos resultados, en conjunto con la observación de la expansión territorial de la expresión de *Notch1* y *Bmp4*, concuerdan con el rol descrito de la vía *Notch1-Bmp4* la cual es capaz de inducir la generación de células de la cresta neural en regiones ectópicas <sup>79,256,296,322,323</sup>. Es importante mencionar que la deficiencia de RFC1 puede alterar la disponibilidad de la molécula SAM, por lo que podría generar otros defectos relacionados con la metilación (histonas y/o ARNs) y de esta forma también alterar la vía *Notch1-Bmp4* o alguna otra vía relacionada.

Finalmente, nuestro modelo deficiente de RFC1 mostró que el territorio del BPN sufría una expansión en los embriones tratados; sin embargo, esta expansión no ocurrió a

expensas del territorio neural. Esta expansión generó un aumento significativo de células que coexpresaban los marcadores SOX2 (neural) y PAX7 (BPN). En ese aspecto, las células del BPN poseen inicialmente esta capacidad de coexpresar los marcadores de diferentes linajes celulares, conocido como estado *primed*<sup>69,237,266</sup>. Sin embargo, a medida que avanza el desarrollo pequeños cambios en los niveles de estos factores de transcripción linaje-específicos pueden desbalancearse e iniciar la salida del estado *primed* hacia un destino celular específico. Nuestros datos sugieren que la deficiencia de folato es capaz de mantener o expandir el estado *primed* de las células progenitoras que residen en los límites entre la placa neural y el BPN. Además, nuestros resultados concuerdan con la observación que la dinámica de la oscilación de la metilación/demetilación genera una heterogeneidad epigenética durante el desarrollo la cual es requerida para las transiciones de estadios *naïve*, *primed* y diferenciado<sup>31</sup>.

En conjunto, nuestros resultados caracterizaron la presencia de metilasas y demetilasas en el BPN durante su delimitación territorial. Además, proponemos un modelo en donde la pérdida de función de *Rfc1* generaría cambios en la metilación de regiones específicas del ADN, las cuales mantendrían el estado *primed* de los progenitores ubicados entre los límites de la placa neural y del BPN. **Los resultados que se obtuvieron en esta sección ya fueron publicados (Alata Jimenez, et al., Frontiers Cell and Developmental Biology 2022).** <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.834625>





**Fig. 25.- Esquema representativo del modelo propuesto.** Los niveles bajos de folato durante los estadios tempranos de desarrollo del BPN afecta la metilación del ADN y la expresión del gen Notch1 que genera un aumento y expande la expresión de Bmp4. Como consecuencia, un mayor número de progenitores en estado “primed” son mantenidos debido a la coexpresión de marcadores del BPN y la PN en los límites de estos territorios.

### 3.4.- Materiales y Métodos del Capítulo I y II

#### *Embriones*

Huevos fértiles de pollo fueron obtenidos comercialmente e incubados a 37°C hasta que los embriones alcanzaron los estadios deseados. Los embriones de pollo fueron clasificados acorde al criterio de Hamburger y Hamilton<sup>218</sup>. Para las hibridaciones *in situ*, los embriones fueron fijados toda la noche a 4°C en PBS (pH.7.4) que contenía 4% de para-formaldehído (PFA), deshidratados y almacenados en metanol. Para los ensayos de Inmunohistoquímica, los embriones fueron fijados por 15 min en 4% PFA en PBS e inmediatamente procesados.

### *Electroporación de morfolinos y vectores*

Se usó dos sets de morfolinos anti-sentido contra el receptor *FoIR1* y el transportador *Rfc1*: FoIR1-MO; Rfc1-MO; FoIR1-spMO y Rfc1-spMO)<sup>206</sup>. La inyección de los morfolinos marcados con el fluorescente verde FITC (0.8mM FoIR1-spMO; 0.75 mM Rfc1-spMO; 1mM FoIR1-MO; 1mM Rfc1-MO y 0.7mM Control-MO) más 300ng/μL de ADN plasmídico (usado como *carrier*) fue realizada de manera unilateral en estadio de gástrula. La electroporación fue realizada con 5 pulsos de 50ms a 5.5V y con intervalos de 100ms entre cada pulso. Los embriones fueron cultivados en albumina en placas de cultivo de tejidos hasta los estadios deseados. Todos los embriones fueron monitoreados y aquellos con poca y/o parchada fluorescencia o con anomalías morfológicas fueron descartados.

### *Hibridación in situ (ISH)*

Las ISH de embriones completos fue llevada a cabo según descripciones anteriores<sup>324</sup>. Brevemente, sondas marcadas con digoxigenina fueron sintetizadas a partir de ADNc de los genes *FoIR1*, *Rfc1*, *Sox10*, *Fgf8*, *Sox2*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Tet1*, *Tet2*, *Tet3*, *Bmp4* y *Notch1* usando plásmidos lineales. Las sondas hibridadas fueron detectadas usando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (1:2000, Roche) en presencia de los sustratos NBT/BCIP (Roche). Los embriones fueron fotografiados usando un estereoscopio ZEISS SteReo Discovery V20 Stereomicroscope (AxioCam 512 color) y el software ZEISS ZEN2 (blue edition).

### *Crioseccionamiento*

Para los análisis histológicos, los embriones fueron incubados en sucrosa 5% (en PBS) por 2 h a temperatura ambiente y subsecuentemente transferidos a sucrosa 15% e incubados toda la noche a 4°C. Finalmente, fueron incubados en 7.5% gelatina/15%

sucrosa por 3 h a 37°C y congelados con nitrógeno líquido y guardados a -80°C para el criocorte. Se obtuvieron cortes transversales de 10-15µm que fueron usados para la obtención de fotos o para inmunotinción. Para la obtención de fotos, los cortes fueron lavados dos veces por 10 min en PBS con 5% Tritón (PBS-T) a 42°C, luego lavados por 5 min en PBS-T y montados con Perma-Fluor Mounting Medium (Thermo Electron Corporation).

### *Inmunohistoquímica (IHQ)*

Cortes transversales de embriones electroporados fueron desgelatinizados, lavados en PBS-T y subsecuentemente bloqueados con 5% SBF (Suero Fetal Bovino) en PBS-T por 3 h a temperatura ambiente. Para la **Fig. 5, 10, 11 y 12**, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios toda la noche: conejo anti-H3K4me3, -H3K9me3, -H3K27me3 y -H3K36me3 (1:500, todos de Abcam), conejo anticaspasa 3 clivada (1:250, Cell Signaling), ratón anti-PAX7 IgG<sub>1</sub> (1:20; Developmental Studies Hybridoma Bank). Los anticuerpos secundarios usados fueron: cabra anti-conejo Alexa Fluor 594 (1:1000; Molecular Probes) y cabra anti-mouse IgG<sub>1</sub> Alexa Fluor 568 (1:300; Molecular Probes), los cortes transversales fueron montados y fotografiados utilizando el software NIS-Elements AR (Nikon) en un microscopio (Eclipse E600; Nikon) usando objetivos de planos de 10x0.25 y 40x0.65.

Para la **Fig. 18** los embriones completos y las secciones transversales fueron incubadas con el anticuerpo primario por 2 días a 4°C. Se usaron: ratón monoclonal anti-5mC (1:500, Abcam, ab10805), conejo policlonal anti-5hmC (1:500, Active Motif, Cat N°39791), cabra policlonal anti-hSOX2 (1:500, Santa Cruz, Y-17). Para la **Fig. 24** se usó conejo monoclonal anti-SOX2 (1:1000, Abcam, ab92494) y ratón monoclonal IgG<sub>1</sub> anti-PAX7 (1:10, Developmental Studies Hybridoma Bank). Los anticuerpos secundarios

usados fueron burro anti conejo 594, burro anti-ratón 488, burro anti-cabra 647, cabra anti-conejo 594, y cabra anti-ratón IgG1 647 (1:500, todos de Molecular Probes) y se incubaron durante 1 día a 4°C. Después de varios lavados, los embriones y las secciones transversales fueron montadas y fotografiadas usando el microscopio invertido Carl Zeiss Axio observer 7 (Axio observer Colibri 7, Axiocam 305 color, Axiocam 503 mono) y el software Carl ZEISS ZEN2 (blue edition).

### *Western blot*

Embriones electroporados unilateralmente fueron cortados a la mitad, las mitades inyectadas y no inyectadas de los embriones fueron lisadas y homogenizadas usando un *pestle* y 150 µL de buffer de extracción (50mM Tris-HCl, pH 7.5; 100mM NaCl; 5mM EDTA) que fue suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Protease Inhibitor, Roche) y 1% de NP-40. Subsecuentemente, las muestras fueron centrifugadas por 5 min a 1000g a 4°C, y el sobrenadante que contenía las proteínas fue colectado. Las proteínas fueron cuantificadas por Bradford, una cantidad igual proteínas totales fue corrida en un SDS-PAGE y transferidas a una membrana para el *blotting*. Los anticuerpos primarios conejo anti-H3K4me3, -H3K9me3, H3K9me3, H3K36me3 (1:1000, todos de Abcam) y ratón anti-tubulina (control de carga, 1:2000, Sigma-Aldrich) fueron incubados toda la noche a 4°C. Finalmente, los anticuerpos secundarios conjugados cabra anti-ratón HRP o anti-conejo HRP (1:10000, ambos) fueron incubados por 45 min a temperatura ambiente para el posterior revelado usando los reactivos ECL Plus de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare).

### *DNA Dot-Blot*

El ADN genómico (ADNg) de los lados inyectados y no inyectados con los morfolinós (del mismo embrión) fue denaturado y se realizó diluciones seriadas que fueron colocadas en una membrana de nylon (Amershan Hybon-N+ Nylon Membrane, GE Healthcare). La membrana fue crosslinkada con luz ultravioleta, bloqueada con 5% de leche (libre de grasa) en TBS-T (TBS + 0.1% Tritón) por 1 h a temperatura ambiente, y se incubó con el anticuerpo primario ratón anti-5mC (1:1000, Abcam) toda la noche a 4°C. Después de varios lavados con TBS-T, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG conjugado con HRP (1:10000, Molecular Probes) durante 1 h a temperatura ambiente, el revelado se realizó utilizando el reactivo ECL Plus (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para asegurar el uso de cantidades iguales de ADNg total en la membrana, el mismo blot fue incubado con Bromuro de Etidio, visualizado por exposición a luz UV y fotografiado.

### *Tratamientos químicos*

El experimento de rescate se realizó mediante la adición de ácido folínico (FA, Sigma F7878) diluido en la solución de Ringer y añadida a la albumina (concentración final 45uM) durante el cultivo de embriones después de la electroporación <sup>325</sup>. El Metotrexato (MTX, Sigma A6770) fue diluido en 0.1% de DMSO (Dimetilsulfóxido) en solución de Ringer y añadido a la albumina (concentración final 10uM) durante el cultivo de embriones.

### *Secuenciación por bisulfito*

El tratamiento con bisulfito y la recuperación de las muestras se realizó con el kit EpiTect Plus Bisulfite Conversion (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, seis tubos neurales dorsales de lados tratados con Control-, FolR1-, Rfc1-

spMO o rescatados con AF fueron lisados y convertidos con bisulfito y el ADN obtenido fue recuperado en una columna EpiTect. Se realizó una PCR tiempo final anidada o semi anidada <sup>206</sup> para analizar tres regiones en el locus Sox2. Los productos obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa, purificados y clonados en el vector pGEM-T Easy (Promega). 8 clones individuales fueron secuenciados para cada muestra.

### *Cuantificación de intensidades de las marcas 5hmC y 5mC*

La cuantificación de la intensidad de las marcas 5hmC y 5mC para la **Fig. 17** fue realizada utilizando el programa ZEN 3.0 blue edition. Brevemente, usando los archivos Zeiss.czi se generó una figura oval fija (46.09  $\mu\text{m}^2$ ) que fue colocada sobre los núcleos a lo largo de la placa neural y del borde de la placa neural (se utilizó la tinción con DAPI para identificar los núcleos). Se midieron las intensidades de fondo y se definió un área de referencia (ovalito de 167.61  $\mu\text{m}^2$ ) ubicada cerca de la línea primitiva para la marca 5mC y en la parte media del borde de la placa neural para la marca 5hmC; adicionalmente, se midió la intensidad del fondo para. Todos los datos de cada sección se colocaron en una hoja de cálculo de Excel donde el fondo fue sustraído tanto de las marcas y del área de referencia. La intensidad fue normalizada a la intensidad del área de referencia ( $\frac{\text{Intensidad experimental}}{\text{Intensidad de la referencia}}$ ). Los valores de todas las células por embrión (2-3 secciones por embrión, n=4) fueron promediados y la significancia fue calculada utilizando la prueba t de Student.

La cuantificación de la intensidad de las marcas 5hmC y 5mC para la **Fig. 19** fue realizada utilizando el programa Fiji usando los archivos Zeiss.czi de los lados inyectados con los morfolinós y sus respectivos lados no inyectados. Brevemente, usando los archivos Zeiss.czi se trazó una línea - longitud era de 9100  $\mu$  y un ancho de 150 - desde la línea

media del corte transversal hasta la región del ENN. Se calculó el ruido de fondo y se sustrajo de las lecturas obtenidas, adicionalmente se seleccionó el área de referencia generando una región de 5128  $\mu\text{m}^2$  de manera similar a como se mencionó previamente. La intensidad fue normalizada a la intensidad del área de referencia ( $\frac{\text{Intensidad experimental}}{\text{Intensidad de la referencia}}$ ), una vez obtenidos los valores se procedió a hallar el ratio entre el lado inyectado y el lado no inyectado del mismo corte. Se utilizaron de 3-6 cortes transversales por embrión con un n=5 para los Control-MO y n=4 para los Rfc1-spMO. Se promedió los valores obtenidos por embrión y se calculó la significancia utilizando la prueba múltiple de t Student con un Q de 1%.

#### *Representación Reducida de la Secuenciación por Bisulfito (RRBS-Seq)*

El ADN<sub>g</sub> de dos replicas independientes y compuestas por ~18 embriones electroporados con Rfc1-spMO y Control-MO (cada replica) fue extraído utilizando Purelink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN<sub>g</sub> fue enviado a la empresa CD Genomics para la construcción de la librería, la secuenciación y el análisis bioinformático. Brevemente, las muestras de ADN fueron digeridas con la enzima MspI. Los fragmentos de ADN fueron reparados en los extremos por la adición de una cola de Adeninas y ligadas con el *linker* de secuenciamiento, donde todas las citosinas se encontraban metiladas. Los fragmentos de ADN entre 150-300 pb fueron seleccionados y tratados con bisulfito utilizando EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research). Finalmente, la amplificación por PCR fue realizada para obtener la librería final de ADN y el secuenciado fue realizado con el equipo Illumina HiSeq PE150. La conversión con bisulfito fue >99.5% para todas las muestras. Los estadísticos básicos de calidad de las lecturas crudas fueron generados con FastQC tool

(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastq>). Los adaptadores de secuenciación y los datos de baja calidad (secuencias en los cuales el contenido de N era mayor del 5% del total de la longitud de la secuencia) fueron removidos utilizando el software Trimmomatic (V0.36)<sup>326</sup>. Las secuencias obtenidas fueron mapeadas al genoma de referencia galGal5 con el software BSMAP<sup>327</sup>. La información estadística de los alineamientos fue colectada y solamente las lecturas que tuvieron un mapeado único fueron mantenidas para los siguientes análisis; adicionalmente, sólo las citosinas metiladas con una profundidad de cobertura de la secuencia de al menos 5 fueron usadas. Los niveles de metilación de las citosinas individuales fueron calculados como la relación de la profundidad secuenciada de las citosinas CpG (metiladas y verificadas) respecto a la profundidad total secuenciada de las citosinas CpG individuales. El software metilene (V0.2-7) fue usado para identificar RDMs (regiones diferencialmente metiladas) por un algoritmo de segmentación binaria combinado con un test estadístico de dos dimensiones<sup>328</sup>. El análisis de enriquecimiento de la Ontología Génica (GO, <http://www.geneontology.org/>) -de los genes relacionados con los RDMs- fue aplicada para determinar procesos biológicos de interés. Se eligió la ruta de estimación con un valor  $Q < 0.05$  como enriquecimiento significativo con los genes relacionados a los RDMs. Basados en los resultados de la anotación de los RDMs y la base de datos de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)<sup>329</sup>, el análisis de enriquecimiento funcional fue realizado en los genes cuyo cuerpo génico, sus regiones aguas arriba (upstream) y aguas abajo (downstream) (ambas de 2kb de longitud) se superpusieron con los RDMs. Los datos obtenidos del secuenciamiento se encuentran en el repositorio del NCBI bajo el número de acceso PRJNA784944 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/784944>).



### *Análisis diferencial de unión (DiffBind) de la vecindad del locus Notch1*

El análisis diferencial de las marcas H3K27ac, ATAC-seq se realizó usando los archivos .BED y .BAM para los estadios HH6 y HH9 que fueron proporcionados por Rothstein (2020). Se usó el programa DiffBind en R y se realizó acorde al manual del programa usando la versión galGal5 del genoma de pollo. Brevemente, se creó una tabla que contenía los nombres y las rutas de ubicación de los archivos. Se filtraron las regiones genómicas que no brindan datos confiables usando el comando `>dba.blacklist`. Una vez filtrada estas regiones, se realizó el conteo de picos que se superponen con el genoma el comando `>dba.counts`. Seguidamente se realizó la normalización de datos con el comando `>dba.normalize` y el modelado con el comando `>dba.contrast`. Finalmente, el análisis diferencial se realizó usando el comando `>dba.analyze` usando los métodos de edgeR y DESeq2 que están incluidos en el paquete DiffBind. Los resultados fueron exportados en un archivo .csv y se buscó aquellas zonas que presentaban una diferencia significativa entre los estadios HH6 y HH9 y que estuvieran cerca de la vecindad del gen *Notch1* usando las coordenadas cromosómicas.

## **IV.- CAPÍTULO III: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PATERNA A METOTREXATO EN EL DESARROLLO DE LA DESCENDENCIA Y ABUNDANCIA DE sncRNAs ESPERMÁTICOS DEL PADRE**

### **4.1.- Marco Teórico**

#### **4.1.1 El folato y el efecto materno en el desarrollo**

El embarazo representa un periodo de crecimiento tisular rápido tanto de la madre como del feto, el cual está altamente asociado con un incremento en los requerimientos energéticos y nutricionales. La nutrición materna durante el embarazo, como parte de “los primeros 1000 días”, es una ventana de tiempo crítica para el óptimo desarrollo del feto<sup>330</sup>. Durante este período, el folato juega un rol importante como sustrato fundamental para el metabolismo C1 (red de vías metabólicas que involucra la síntesis de nucleótidos, reparación del ADN, reacciones de metilación y síntesis de neurotransmisores). Además, a medida que avanza el embarazo, existen períodos donde los niveles maternos de folato caen abruptamente hasta un 50% - debido a la demanda que tiene esta vitamina para promover el crecimiento tisular- por lo que el consumo de suplementos es necesario para evitar una serie de defectos congénitos<sup>331,332</sup>.

En humanos, el efecto adverso de la deficiencia de folato fue establecido inicialmente por Lucy Wills cuando determinó que extractos de levadura eran efectivos para el tratamiento de anemia macrocítica en mujeres embarazadas<sup>333</sup>. Además, como se mencionó en el capítulo I, la deficiencia del folato ha sido ampliamente vinculada con la alta frecuencia de defectos craneofaciales<sup>150,153,156</sup>. Así como el hecho que la suplementación periconcepcional con ácido fólico es capaz de reducir esta prevalencia a nivel mundial<sup>32,33,209,210,334</sup>. Estas observaciones realizadas en humanos también fueron corroboradas en ratones, donde la deficiencia materna de folato o ácido fólico generaba

malformaciones craneofaciales como fisuras del labio y/o paladar <sup>32,33,150,334,335</sup>.  
Interesantemente, las ratonas que recibían suplementación con ácido fólico tenían crías que se caracterizaban por tener un mejor neurodesarrollo, así como un incremento en la proliferación y diferenciación neuronal de los progenitores neurales <sup>336,337</sup>. En conjunto, todas estas observaciones indicaban que niveles adecuados de folato tenían la capacidad de proteger el desarrollo del embrión.

De manera general, la fortificación con ácido fólico ha permitido reducir la incidencia de estos defectos a nivel global: en Estados Unidos se logró reducir un 35%, en Canadá un 46%, mientras que en Latinoamérica y el caribe la reducción solo llegó hasta un 10% <sup>35,338</sup>. En ese sentido, en Argentina se estableció la fortificación de harina con 2.2mg/kg ácido fólico observándose una reducción de un 50% en relación con los defectos del tubo neural <sup>339</sup>. Si bien la fortificación fomentó la reducción de estos defectos, todavía existe una prevalencia de 1.69% de defectos orofaciales (fisura del labio y/o paladar) y del tubo neural mientras que a nivel mundial es de 4.5% <sup>340-342</sup>. Estas altas prevalencias, aún luego de la fortificación en harinas y las suplementaciones maternas, nos indica que podrían existir otros factores que podría estar actuando como agentes etiológicos.

#### **4.1.2 Herencia epigenética paterna**

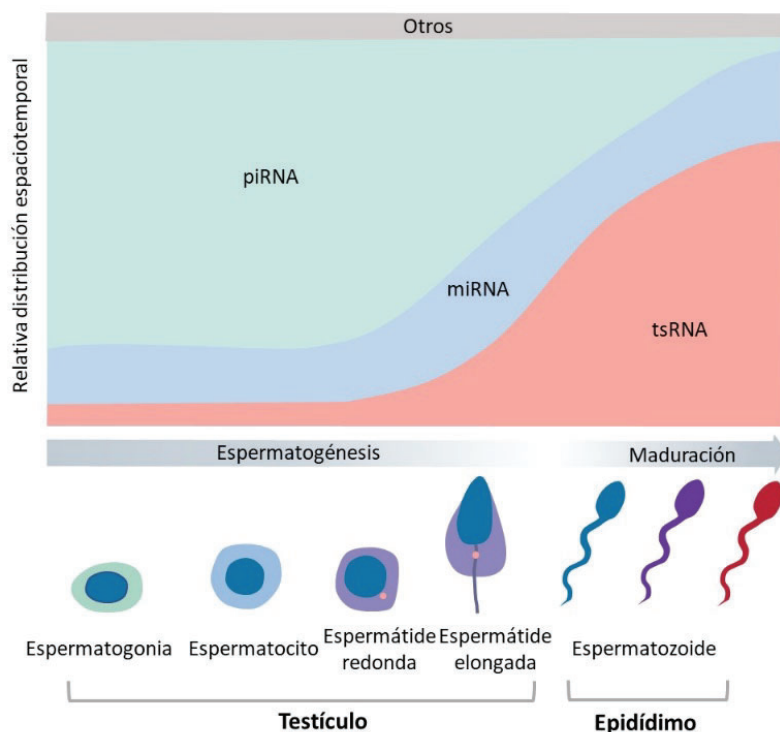
Un factor importante en el desarrollo de un organismo es la interacción con el ambiente, el cual es uno de los mayores mecanismos de evolución que potencia las variaciones fenotípicas que pueden ser transmitidas de generación en generación. Este tipo de herencia de padres a hijos es denominada herencia transgeneracional y puede ser inducida por contaminantes, alimentación o traumas <sup>38,43,54,57,343,344</sup>. Considerando que los defectos parentales son transmitidos a la descendencia a través de los gametos, el

desarrollo de la herencia transgeneracional requiere que la línea germinal sea afectada y transmita las “vivencias” de los padres.

Durante décadas se ha relacionado la salud de la descendencia con el nivel nutricional de la madre antes, durante y después del periodo de gestación, y por lo tanto las suplementaciones alimenticias para su cuidado están muy bien establecidas <sup>35,148,331,345</sup>. A pesar de estos esfuerzos y sin contar defectos genéticos, aún existe una prevalencia de los defectos asociados con la deficiencia de folato <sup>338–342,346,347</sup>. Por lo tanto, debe existir otro agente etiológico con la capacidad de generar un anormal desarrollo de la descendencia. En ese sentido, el genoma del esperma ha sido considerado transcripcionalmente quiescente y solamente ha sido visto como contribuyente para restaurar la diploidía del cigoto. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que las experiencias paternas pueden afectar el normal desarrollo de la descendencia sugiriendo la presencia de un posible mecanismo no genético de herencia paterna <sup>48,348</sup>.

Esta idea de la herencia de caracteres adquiridos fue inicialmente debatida, sin embargo, comenzó a adquirir interés debido a la acumulación de evidencias obtenidas en diferentes animales <sup>40,44,349–351</sup>. En estos estudios se demostró que la exposición ancestral a toxinas, estrés mental y cambios en la dieta pueden ser heredados. La hipótesis de herencia de caracteres adquiridos ha estado bajo debate principalmente por la existencia del evento de reprogramación epigenética que sufre tanto el cigoto como las células germinales <sup>51</sup>. Si bien se ha observado que la metilación del ADN del esperma puede sufrir alteración después de una exposición a un estresor ambiental, la presencia de dichos cambios no llegaba a mantenerse en las siguientes generaciones <sup>352</sup>. Además, se observó que las concentraciones paternas de folato (fuente dietaria de grupos metilo) tienen la capacidad de afectar el epigenoma del esperma y por ende podrían afectar el desarrollo de la descendencia <sup>353,354</sup>. Sin embargo, se sabe que muchas de las regulaciones

epigenéticas, tales como las modificaciones postraduccionales de las histonas y las metilaciones del ADN, tendrían poca influencia debido al cambios de histonas por protaminas y al reinicio de la metilación del ADN durante la espermatogénesis y el desarrollo temprano <sup>51,272,355</sup>. Además, se determinó la existencia de variaciones estocásticas en la metilación del ADN espermático capaces de generar una mayor variación que un estresor externo <sup>356,357</sup>. Por lo tanto, deben existir otras moléculas capaces de transmitir esta información a la descendencia. En ese sentido, en la última década, las nuevas tecnologías han permitido descubrir y evidenciar que el gameto masculino posee información hereditaria en forma de ARNs pequeños no codificantes (sncRNAs, del inglés *small non-coding RNAs*) <sup>49,50,52,358</sup>. Las principales poblaciones de sncRNAs identificadas en el espermatozoides son: microARNs (miARNs), fragmentos de tARNs (tsARNs), piwiARNs (piARNs) y fragmentos de ARNr y de ARNm (Fig. 26) <sup>50,359,360</sup>.



**Fig. 26.- Abundancia de sncRNAs durante la espermatogénesis de mamíferos.** Esquema representativo mostrando la abundancia de los principales biotipos de sncRNAs a lo largo de la espermatogénesis. En las primeras etapas de la espermatogénesis la población de piRNAs es la más abundante en comparación con los miARNs y los tsARNs. Sin embargo, a medida que la espermatogénesis progresa, la abundancia de los piARNs disminuye y la población de tsARNs aumenta drásticamente llegando a su pico durante la maduración en el epidídimo. Por otro lado, la abundancia de los microARNs se mantiene estable durante todo este proceso. miARN: microARN. Adaptado de Qi Chen et al 2016 <sup>49</sup>

Uno de los primeros experimentos que directamente demostró la relación entre los ARNs espermáticos y la herencia de caracteres fue realizado en ratones donde inyecciones cigóticas de ARN espermáticos del padre generaban una descendencia que reproducía las alteraciones metabólicas y conductuales observadas en los padres <sup>57</sup>. Es decir, los sncARNs son potenciales y atractivos transportadores de la información no genética en el espermatozoide. Particularmente, los tsARNs y microARNs son los biotipos de sncARNs más abundantes en los espermatozoides maduros <sup>49,359</sup>, postulándolos como mediadores moleculares de las experiencias paternas tales como dietas hipergrasas <sup>41,42,54</sup>, hipoproteicas <sup>40</sup>, estrés <sup>46,47</sup> y la sensibilidad odorífica ante químicos <sup>57</sup> capaces de afectar a la descendencia <sup>41,46,54,56,57,360,361</sup>. Los tsARNs incrementan su abundancia a medida que la espermatogénesis avanza y en ratones se ha determinado que los mismos serían cargados en el epidídimo, mediante epididismos (vesículas extracelulares) <sup>359,360,362</sup>. Todos estos estudios desafían la ampliamente aceptada teoría de la barrera de Weismann donde se dictaba la imposibilidad de un flujo de información desde el soma a la línea germinal, mientras que a la una vez desacreditada teoría de pangénesis de Darwin comienza a recibir atención <sup>363,364</sup>. Así mismo, se pone en evidencia el rol de la nutrición paterna en relación con la calidad espermática como una rama emergente con potencial mediador de la salud de la descendencia <sup>365,366</sup>.

### **Biogénesis y función de los tsARNs**

Los tsARNs han sido identificados en un amplio rango de especies a lo largo de los tres dominios incluyendo Archea, Bacteria y organismos unicelulares donde las vías de sncARNs tipo miARNs, siARNs (del inglés “*small interference RNA*”) o piARNs no estaban presentes <sup>367,368</sup>. Estas observaciones han posicionado a los tsARNs como la más antigua clase de sncARNs para la funcionalidad y comunicación intra e intercelular previo a la

emergencia de sncARNs más especializados <sup>368</sup>. Los tsARNs se encuentran dentro de la familia de tRFs (del inglés *tRNA Fragments*) o fragmentos derivados de tARN. En general, los tRFs se pueden categorizar en seis grupos (dependiendo de su sitio de inicio y el final de su posición): tRF-5, tRF-3, mitad 5' de tARN, mitad 3' de tARN, tRF-1, y tRF interno <sup>369</sup>. Los tRF-5s comienzan en el extremo 5' del tRNA maduro hasta el brazo D o hasta el tallo previo al anticodón, los tRF-3s derivan del extremo del 3'-CCA del tARN maduro. Las mitades 5' y 3' de tARN también son llamados ARN derivados del tARN o tsARNs son generadas por el clivaje en el anticodón de los tARNs maduros. Los tRF-1s son generados a partir del 3' trailer precursor de tARNs y lo tRF internos provienen del loop anticodón (**Fig. 27 A, B**). La formación de los tsARNs está mediada principalmente por la actividad de la RNasa angiogenina (presente solo en mamíferos), así como por otras RNasas tipo Dicer, RNasa T2, L; las cuales actúan preferentemente sobre el anticodón y el codo del tRNA bajo condiciones de estrés <sup>368,370-378</sup>.

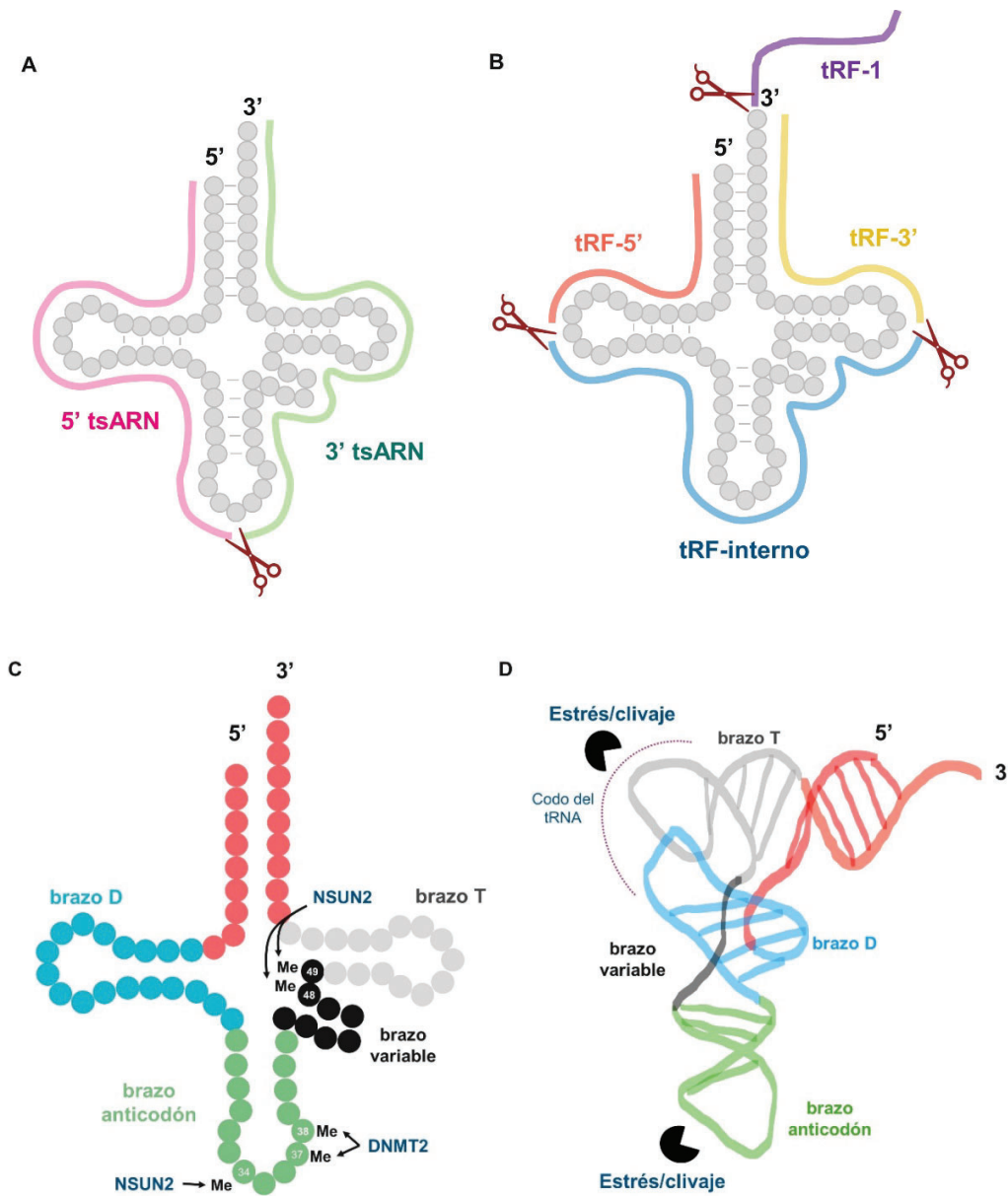
Los tsARNs son ubicuamente expresados y su generación es conservada entre organismos como respuesta ante condiciones de estrés tales como el estrés oxidativo, falta de nutrientes, estrés hiperosmótico, e infección viral <sup>374,376,379,380</sup>. Sin embargo, estos tsARNs también existen en condiciones homeostáticas como en el sistema hematopoyético, hígado fetal y placenta, fluidos espermáticos, cerebrospinal y orina así como en vesículas extracelulares <sup>369</sup>. Los tsARNs generados bajo condiciones homeostáticas y de estrés pueden ser diferenciados por la longitud de su secuencia: los primeros poseen una longitud corta de 15-22nt, mientras que los generados bajo estrés se encuentra entre los 31-40nt <sup>367,374,375,378,379</sup>. El rol funcional de los tsARNs ha sido vinculado con la regulación negativa de la traducción y formación de gránulos de estrés, el silenciamiento de ARN mensajeros, regulación positiva de la traducción promoviendo la biogénesis de los ribosomas o estimulando la traducción global <sup>378,381-384</sup>. Todas estas

características le dan un importante rol a los tsRNAs como mecanismo de respuesta biológico ante diferentes condiciones<sup>277-279</sup>.

Por otro lado, se ha visto que la biogénesis, estabilidad y funcionalidad de los ARNs es altamente dependiente de su estado de modificaciones postranscripcionales, principalmente metilaciones (**Fig. 27 C, D**)<sup>56,62,63</sup>. Los tARN poseen más de 90 diferentes modificaciones y en promedio (en humanos) cada molécula posee de 11-13 modificaciones permitiéndoles tener toda una variedad de regulación postranscripcional<sup>385</sup>. Las diferentes modificaciones presentes en el tARN pueden ser clasificadas en dos grupos: modificaciones del núcleo y del anticodón. Esta clasificación se origina por el rearreglo que adquiere el tARN en su forma 3D-L<sup>386</sup>. Las modificaciones del núcleo son simples (metilaciones) y están mayormente implicadas en el plegamiento y estabilidad de los tARNs; mientras que las del anticodón son complejas (inosina, isopentil) y están más implicadas en la regulación de la síntesis de proteínas<sup>387-389</sup>. Entre las modificaciones del núcleo se puede mencionar m<sup>1</sup>G9, m<sup>2</sup>G10, m<sup>2'2</sup>G26, m<sup>5</sup>C37, m<sup>5</sup>C48, m<sup>5</sup>C49, m<sup>7</sup>G46, m<sup>7</sup>G49, m<sup>5</sup>C52, m<sup>1</sup>A57, m<sup>1</sup>A58; mientras que en el anticodón se tiene m<sup>5</sup>C34, t<sup>6</sup>A37 (t: treonilcarbamoil), i<sup>6</sup>A37 (i: isopentil), l37(l: Inosina), m<sup>5</sup>C38<sup>390</sup>.

En eucariotas, las metilaciones observadas en los tARNs son generadas principalmente por 3 enzimas: la NSUN2, 6 (NOL1/NOP2/SUN) y la homóloga a la metiltransferasa de ADN DNMT2 (del inglés DNA MethylTransferase 2)<sup>391,392</sup>. Una de las grandes diferencias entre estas metiltransferasas de ARN es su especificidad a nivel de la posición del nucleótido, como a nivel del biotipo de tARN que metila. La DNMT2 genera metilaciones en las posiciones C37 y C38 mientras que la NSUN2 genera una metilación más ubicua (C34, C40, C48, C49 y C50). Por otro lado, la actividad de la DNMT2 es específica de los tARNs-Asp<sup>GUC</sup>, -Gly<sup>GCC</sup>, -Val<sup>AAC</sup> mientras que la NSUN2 actúa sobre diferentes tARNs<sup>392</sup>.





**Fig. 27.- Biogénesis de tsARNs y modificaciones postranscripcionales del tARN.** Esquema representativo de la formación de los diferentes tipos de tRFs que se genera por el clivaje del tARN. Los 3' y 5' tsARNs se generan por un clivaje en el anticodón (A) mientras que los otros tipos de tRF se generan por clivaje en los brazos T y D (B). (C) Ubicación de las principales metilaciones tARN involucradas en la respuesta a estrés. Las principales metilaciones que son susceptibles al estrés se encuentran en el brazo variable (C48, C49) y en el brazo del anticodón (C34, C37, C38) y son generadas por NSUN2 y DNMT2. (D) La estructura 3D del tARN posee dos regiones expuestas que son susceptibles al clivaje por ARNs bajo condiciones de estrés: el codo del tARN y el anticodón. Adaptado de Chen et al 2021 <sup>389</sup>.

La importancia de estas modificaciones ha sido observada en los tsRNAs espermáticos al incrementar tanto su estabilidad así como su funcionalidad. Es más, la transmisión de desórdenes metabólicos adquiridos por vía paterna es dependiente de la presencia de modificaciones postranscripcionales <sup>54,56</sup>. Específicamente, se observó que las modificaciones m<sup>1</sup>A y m<sup>5</sup>C son las más abundantes en la fracción de tsRNAs y su abundancia se ve afectada como respuesta ante un estrés <sup>49,56</sup>. Así mismo, se determinó que el incremento de estas metilaciones está acompañado por un incremento en la expresión de la metiltransferasa *Dnmt2*, destacando el importante rol que posee esta enzima. Esto último fue corroborado cuando se observó que la pérdida de la *Dnmt2* suprime la habilidad del espermatozoide de recapitular los desórdenes del padre en la descendencia <sup>56,393</sup>.

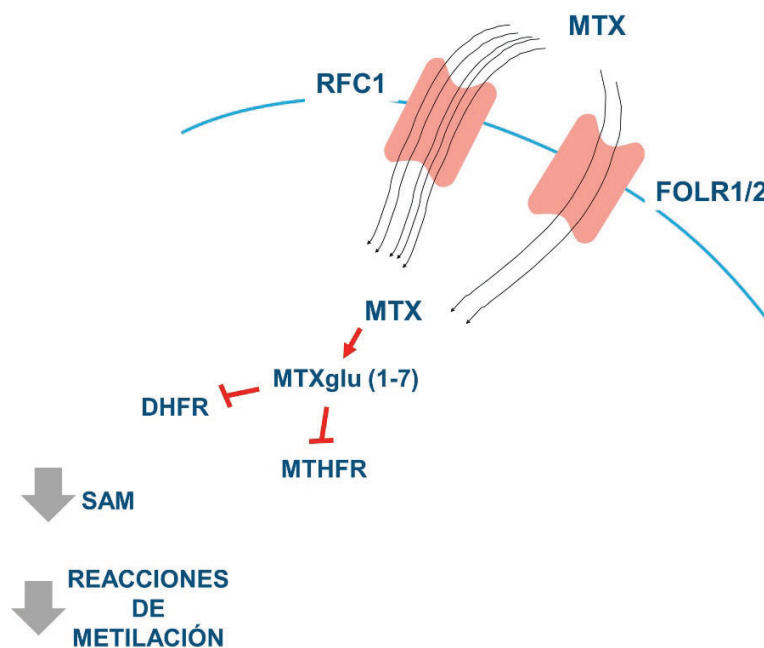
Todos estos antecedentes nos fomentan a explorar la intrigante posibilidad que la deficiencia paterna de folato pueda impactar en el desarrollo de la descendencia, y que esto pueda ser debido a cambios en la metilación y abundancia de los sncRNAs espermáticos.

#### **4.1.3 Metotrexato, folato y desarrollo embrionario**

El metotrexato (MTX, formalmente conocido como amenofterin y su análogo cercano aminopterin) fue una de las primeras drogas diseñadas de manera inteligente para el tratamiento contra el cáncer e inhibir enzimas dependientes de folato. Sin embargo, hoy en día es una droga de primera línea contra la artritis reumatoidea, artritis idiopática juvenil y psoriasis, así como enfermedades inflamatorias, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades conectivas <sup>394,395</sup>. La forma nativa del metotrexato posee un glutamato; sin embargo, dentro de la célula, el metotrexato puede sufrir la adición de varios glutamatos (poli glutamato) y permanecer en el tejido por semanas <sup>395-398</sup>. La versión

con poli glutamato es la forma activa de esta droga e inhibe proteínas dependientes de folato como MTHFR (Metilen-tetrahidrofolato reductasa), RFC1 (Transportador de folato reducido) y DHFR (dihidrofolato reductasa) <sup>395,399,400</sup>.

El uso del MTX ha sido relacionado con un elevado índice de anomalías congénitas en niños nacidos de madres expuestas. La exposición intrauterina a MTX ha sido ligada con defectos craneofaciales y de extremidades, así como también retardo en el desarrollo <sup>224</sup>. El uso de drogas anti-folato también contribuye a la generación de anomalías cardiovasculares, del tubo neural, y del tracto urinario <sup>401,402</sup>. Particularmente, el MTX es un potente agente abortivo utilizado en embarazos ectópicos, y por lo tanto su utilización está completamente contraindicada al menos 3 meses antes de la concepción <sup>403</sup>.



**Fig. 28.- Mecanismos de transporte del metotrexato y enzimas diana.** El transporte del metotrexato a través de las membranas biológicas es mediado por el transportador de folato reducido (RFC1) y los receptores de folato (FR). Dentro de la célula, el metotrexato es convertido a su forma de poli glutamato (MTXglu) lo cual reduce su flujo incrementando su tiempo de vida media. El poli glutamato intracelular inhibe varias enzimas del ciclo del folato como la dihidrofolato reductasa (DHFR), metileno tetrahidrofolato reductasa (MTHFR) culminando finalmente con una reducción de la molécula SAM y por lo tanto de reacciones de metilación. *Adaptado de Yosha Bedoui et al 2019*<sup>417</sup>

Por otro lado, investigaciones previas han identificado una variedad de hechos relacionados con el uso de MTX y un probable efecto genotóxico en el espermatozoides, el cual

puede resultar en enfermedades crónicas o anomalías congénitas <sup>37,404</sup>. Sin embargo, la mayoría de los estudios realizados son de carácter epidemiológico o recopilación de datos, por lo que la etiología investigada podría enmascarar otros factores externos no controlados como la dieta, el consumo de alcohol y estilo de vida en general <sup>36,404–406</sup>. Además, son muy pocos los estudios en animales modelos por lo que existe la necesidad de entender los posibles efectos del MTX en la descendencia de manera *in vivo* <sup>407</sup>. Hasta la fecha no hay ningún tipo de contraindicación que haya sido sugerida para los hombres que toman MTX mientras tratan de concebir un hijo. En ese sentido, el uso de animales modelos, como el pez medaka (*Oryzias latipes*), ofrecen una alternativa para estudiar el efecto paterno de la exposición a metotrexato en la descendencia.

El pez medaka posee un corto periodo generacional por lo que el estudio del efecto paterno del MTX en la descendencia es sumamente factible. Esta especie posee un desarrollo embrionario de aproximadamente 9 días, luego del cual se convierten en larvas juveniles y llegan a la madurez a los 3-4 meses <sup>408</sup>. Durante el desarrollo temprano, los embriones de medaka se caracterizan por poseer un corión translucido permitiendo hacer un seguimiento a su desarrollo. Esta característica - similar al pez cebra- ha permitido que sea utilizado como un modelo para el estudio del desarrollo embrionario, toxicología, carcinogénesis y comportamiento <sup>408–413</sup>. La popularidad de este modelo se incrementó cuando su genoma estuvo disponible <sup>414</sup>. Una característica importante de los peces es la fecundación externa, que permite evaluar el efecto directo de la línea germinal quitando el componente de interacción madre-feto como ocurre en mamíferos. En general, medaka se ha convertido en un interesante modelo para el estudio del efecto epigenético transgeneracional <sup>413,415</sup>.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, *hipotetizamos que el tratamiento con drogas anti folato, como el metotrexato, es capaz de alterar la abundancia y las modificaciones*

*postranscripcionales de los sncRNAs espermáticos capaces de afectar el desarrollo de la descendencia.* Para ello utilizaremos como modelo animal al pez medaka y planteamos el siguiente **objetivo general: Determinar el efecto del tratamiento con metotrexato sobre la abundancia y modificaciones postranscripcionales de sncRNAs espermáticos y sus consecuencias en el desarrollo de la descendencia.**

**Objetivos específicos:**

- 1.- Analizar el efecto de la exposición paterna a metotrexato en el desarrollo de la descendencia.
- 2.- Determinar el efecto de la exposición paterna a metotrexato en la abundancia de sncRNAs espermáticos y sus modificaciones postranscripcionales.
- 3.- Evaluar el impacto de los sncARNs paternos (afectados) en el desarrollo de la descendencia

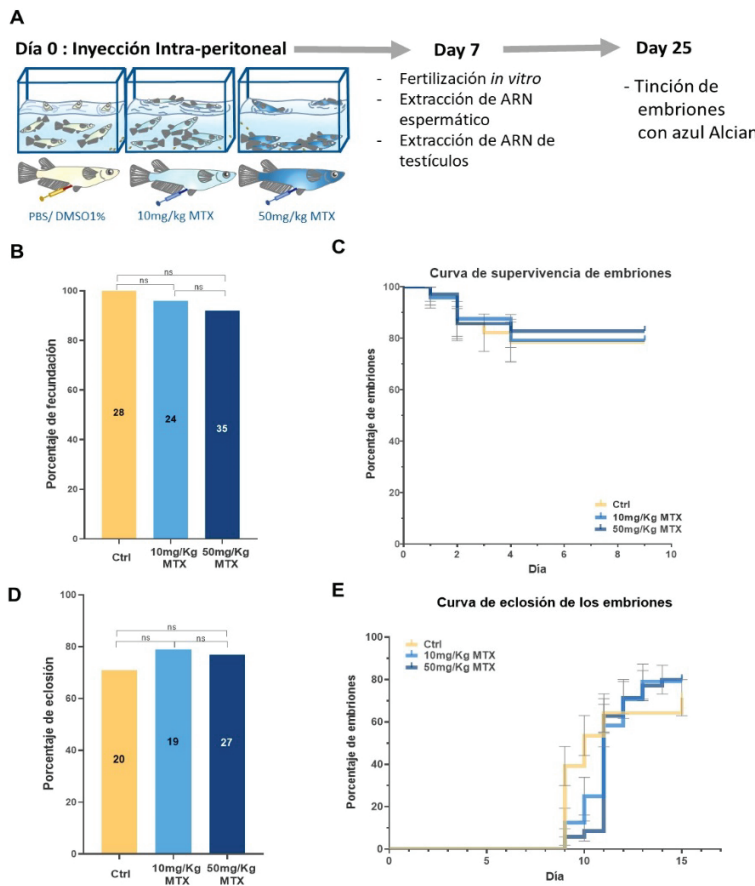
**4.2.- Resultados**

**4.2.1 Efecto de la exposición paterna a metotrexato en el desarrollo de la descendencia**

**a.- La exposición paterna a metotrexato induce malformaciones de los cartílagos craneales en la descendencia**

Para investigar el impacto del tratamiento paterno con drogas anti-folato sobre la progenie, decidimos realizar inyección intraperitoneal de MTX<sup>222,395,416</sup> en peces machos adultos de medaka en las dosis de 10mg de MTX por Kg de peso corporal (10MTX) y 50mg/Kg (50MTX). Después de 7 días, fecundamos oocitos obtenidos de hembras control (sin contacto con los machos) con el esperma extraído de machos tratados y control (**Fig. 29 A**). Lo primero que nos preguntamos fue si el tratamiento con MTX podría afectar la fecundidad, sobrevivencia y eclosión de la descendencia (**Fig. 29 B-E**). Nuestros resultados

mostraron que ninguno de estos parámetros se veía afectados significativamente ante los tratamientos con MTX.

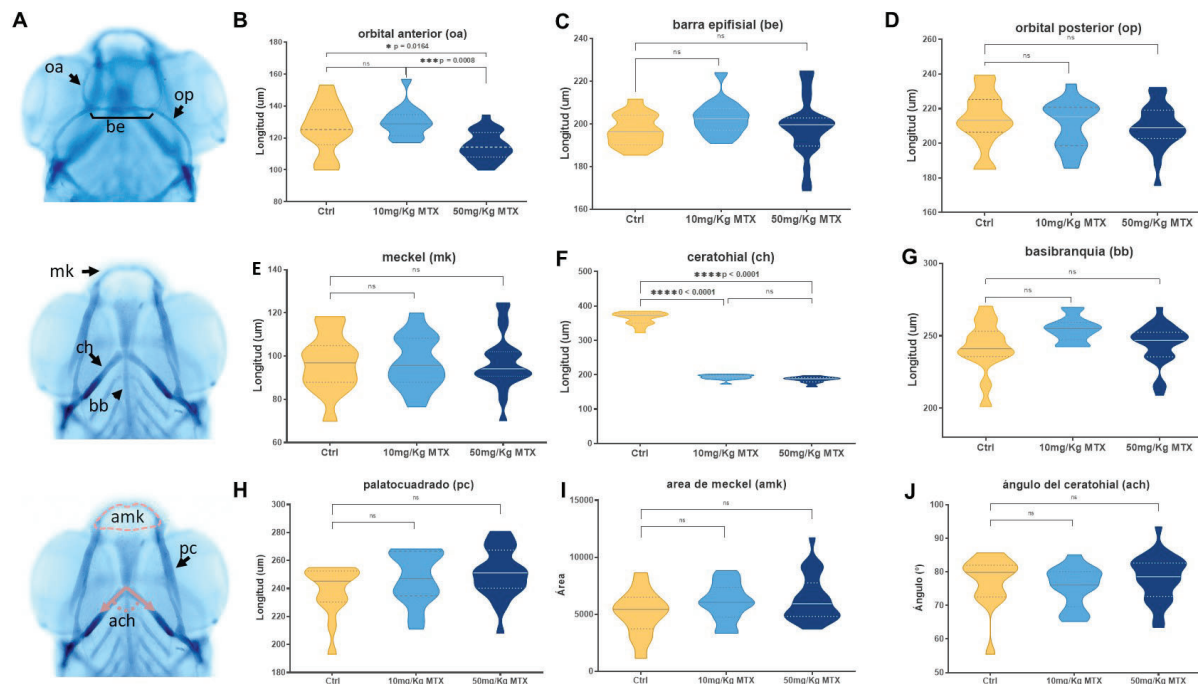


**Fig. 29.- Exposición paterna a MTX no afecta parámetros poblacionales de la descendencia.**

(A) Representación esquemática del diseño experimental. (B) Gráfico de barras representando el porcentaje de fecundación in vitro. No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos. (C) Gráfica de Kaplan-Meier representando la supervivencia de los embriones en el tiempo. (D) Gráfica de barras representando el porcentaje de eclosión de los embriones. (E) Representación gráfica de la eclosión de los embriones en el tiempo. Los números dentro de las barras (B, D) representan el número de huevos y embriones analizados, respectivamente. Ns:  $p > 0.05$

Como mencionamos anteriormente, es sabido que el tratamiento con MTX y/o la deficiencia materna de folato generan defectos craneofaciales <sup>144,147,148,159,224,401,417</sup>. Teniendo en consideración esto, decidimos evaluar en primera medida si el tratamiento paterno con MTX es capaz de afectar los cartílagos craneales en la descendencia. Para ello, realizamos tinciones con azul alcian en larvas provenientes de la fecundación *in vitro* que tenían 3 días pos-eclosión (dpe) y realizamos la medición de 3 cartílagos dorsales (orbital anterior, barra epifisial y orbital anterior), 4 cartílagos ventrales (Meckel, ceratohial,

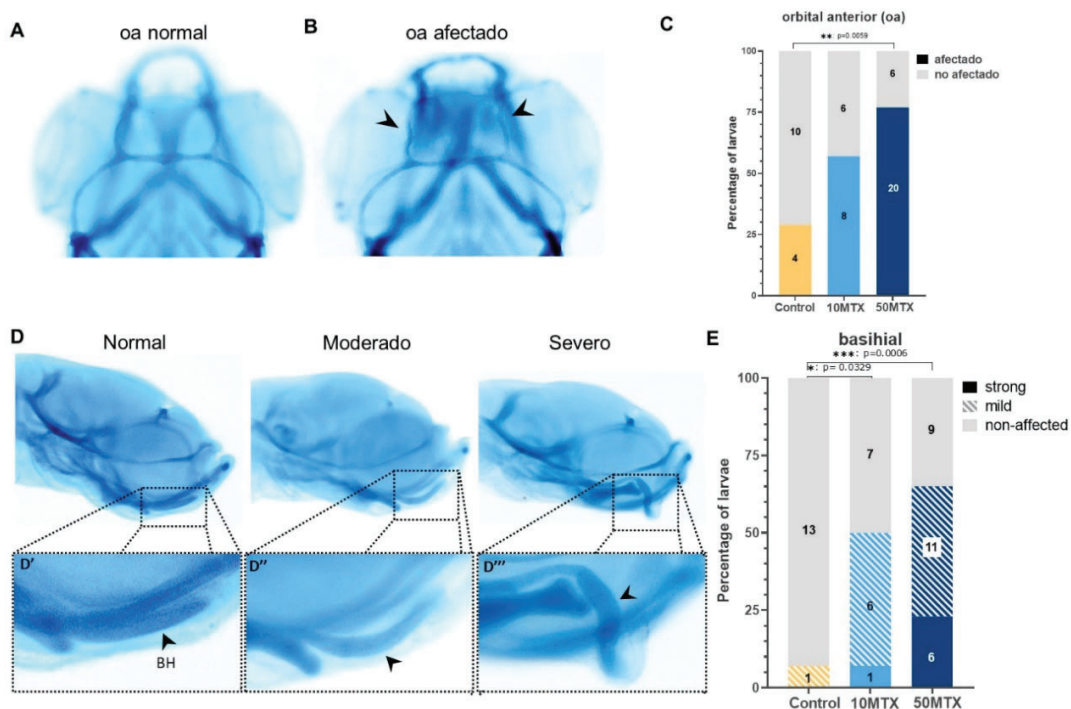
basibranchia y palatoc cuadrado), el área del cartílago de Meckel y el ángulo del ceratohial (Fig. 30 A-J).



**Fig. 30.- La exposición paterna a MTX reduce la longitud de cartílagos craneales de la descendencia.** (A) Vistas dorsal y ventral de la cabeza de medaka mostrando los cartílagos analizados. (B-J) Gráficos de violín representando la longitud de los diferentes cartílagos craneales, ángulos y áreas en el control (Ctrl), 10MTX y 50MTX. El análisis estadístico fue desarrollado usando ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Número de embriones analizados: Control (n=14), 10MTX (n=14), 50MTX (n=26). NS: p > 0.05

De los cartílagos dorsales, pudimos observar una reducción significativa en la longitud del orbital anterior (también conocida como taenia marginalis anterior) en el grupo de 50MTX ( $115.02 \mu\text{m} \pm 9.03$ ) cuando era comparado con el grupo 10MTX ( $130.02 \mu\text{m} \pm 10.22$ ) y el control ( $125.98 \mu\text{m} \pm 15.77$ ). En el lado ventral, el ceratohial se encontraba reducido casi en la mitad de su longitud tanto en el grupo 10MTX ( $192.99 \mu\text{m} \pm 7.55$ ), como en el grupo 50MTX ( $185.42 \mu\text{m} \pm 8.71$ ) comparado con el control ( $363.64 \mu\text{m} \pm 18.96$ ). No encontramos diferencias significativas en las demás mediciones realizadas.

Lo siguiente que evaluamos fue la morfología de los cartílagos seleccionados y encontramos que tanto el orbital anterior y el basiial presentaban una forma anormal (**Fig. 31**). El orbital anterior presentaba una forma serpenteante en lugar de una forma curvada (**Fig. 31 B**). Este fenotipo fue significativamente prevalente en el grupo de 50MTX (**Fig. 31 C**). Sin embargo, el cartílago afectado de manera más drástica fue el basiial, cuyos fenotipos presentaban una forma de espátula curvada (moderado) o una forma de garfio (severo) (**Fig. 31 D**, punta de flecha). La cuantificación de los fenotipos observados reveló que la severidad del fenotipo incrementaba significativamente tanto en el grupo 10MTX como 50MTX comparado con el control (**Fig. 31 E**). Además, observamos que el fenotipo moderado y severo presentaban una mayor prevalencia en el grupo 50MTX en comparación con el grupo 10MTX.



**Fig. 31.- La exposición paterna a MTX genera malformaciones en los cartílagos craneales de la descendencia. (A, B)** Vistas dorsales de un embrión normal y afectado en el orbital anterior (oa). El embrión afectado (B) presenta un orbital anterior con forma curvada. **(C)** Histograma representado la cuantificación de los porcentajes de embriones que presentaron los fenotipos de (A) y (B). **(D)** Vista lateral de una larva mostrando el cartílago basiial normal (forma de pala), con deformidad moderada (forma curvada) y severa (forma de garfio). **(E)** Histograma representando la cuantificación del porcentaje de embriones que presentaron los fenotipos observados en (D). Los números en las barras en (C) y (E) representan el número de larvas analizadas. El análisis estadístico fue realizado usando una tabla de contingencia seguida de la prueba exacta de Fisher y cada tratamiento fue comparado con el control independientemente.



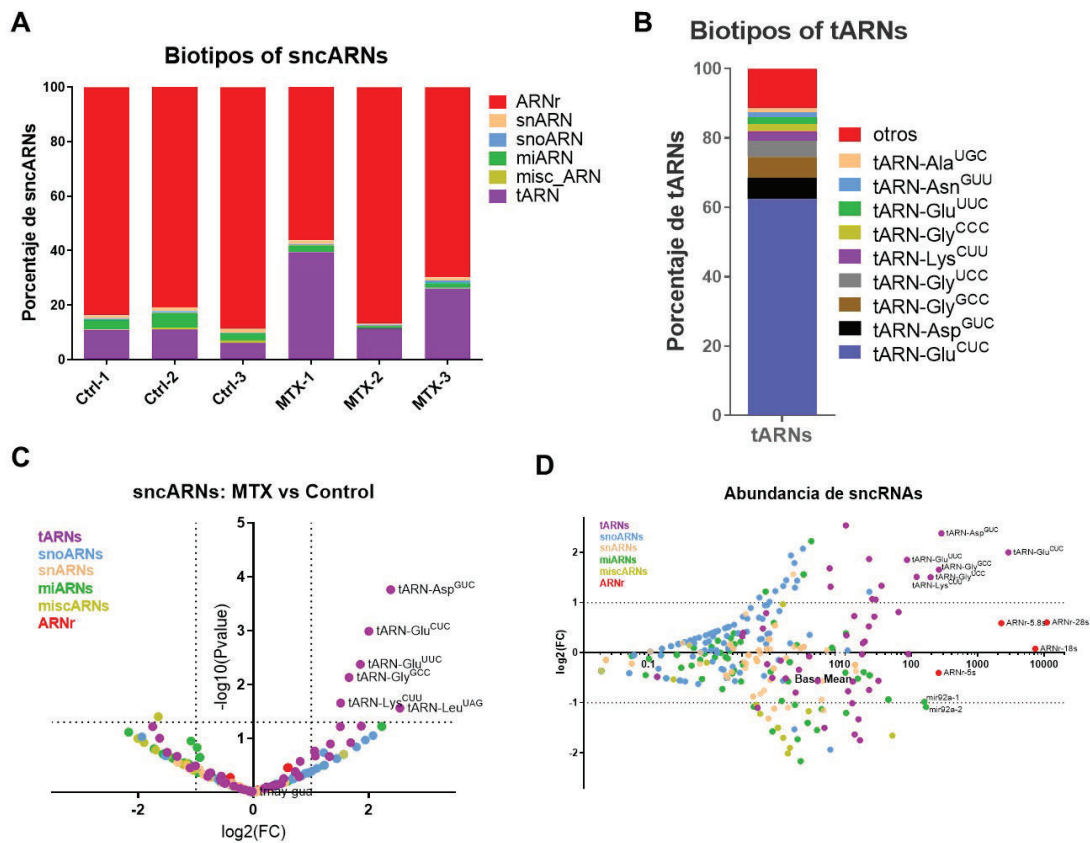
De manera general, todos estos resultados soportan la idea que la exposición paterna a MTX puede afectar el desarrollo de los cartílagos craneales de la descendencia, indicando que el esperma puede transportar información que estaría involucrada en la herencia de los fenotipos observados.

#### **4.2.2 Efecto de la exposición paterna a metotrexato en la abundancia de sncARNs espermáticos y sus modificaciones postranscripcionales.**

##### **a.- La exposición paterna a MTX altera la abundancia de sncARNs en el esperma**

En la última década, los sncARNs han sido indicados como portadores de información epigenética a través de generaciones y como mediadores de los atributos heredados por vía paterna <sup>41,46,56,57,360,361,418</sup>. Para evaluar si el tratamiento con MTX es capaz de afectar el contenido de sncARNs, realizamos secuenciados masivos de ARNs pequeños (~18-30 nt de longitud) a partir del esperma de machos control y 10MTX. Nuestros resultados identificaron diferentes biotipos de sncRNAs que incluyen: ARNr (ARN ribosomales), tARNs (ARN de transferencia), miARNs (microARNs), ARNs pequeños nucleolares (snoARNs), ARNs pequeños nucleares (snARNs) y otros ARNs (miscARN) (**Fig. 32 A**). El análisis comparativo mostró que los ARNr eran los más abundantes tanto en el control ( $84.39\% \pm 3.90$ ) como en el tratamiento con 10MTX ( $70.96\% \pm 15.27$ ). El segundo biotipo más abundante fue el de los tARN, este biotipo mostró un enriquecimiento en respuesta al tratamiento ( $25.68\% \pm 13.99$ ) comparado con el control ( $9.37\% \pm 2.80$ ). Por otro lado, los miARNs se encontraban reducidos en el tratamiento con 10MTX ( $1.62\% \pm 0.75$ ) comparado con el control ( $3.84\% \pm 1.48$ ). Al observar que los tARNs eran una de las poblaciones de sncRNAs más afectadas, decidimos evaluar cuáles eran los más abundantes (**Fig. 32 B**). Nuestros resultados mostraron que de los 625 tARNs identificados

en el genoma de medaka (<http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/Olati2/>), 9 tARNs eran los más abundantes: tARN-Glu<sup>CUC</sup>, -Asp<sup>GUC</sup>, -Gly<sup>GCC</sup>, -Gly<sup>UCC</sup>, -Lys<sup>CUU</sup>, -Gly<sup>CCC</sup>, -Glu<sup>UUC</sup>, -Asn<sup>GUU</sup> y -Ala<sup>UGC</sup>. Los demás tARNs poseían una abundancia menor al 1% que en conjunto sumaban 11%. Algunos de los más abundantes correspondían al del ácido aspártico (con el anticodón Asp<sup>GUC</sup>), ácido glutámico (Glu<sup>CUC</sup> y Glu<sup>UUC</sup>), lisina (Lys<sup>CUU</sup>) y glicina (Gly<sup>GCC</sup>), los cuales fueron significativamente enriquecidos ante el tratamiento con MTX (**Fig. 32 C-D**). Todos estos resultados demuestran que la exposición paterna a MTX afecta la abundancia relativa de tRNA específicos en el esperma.



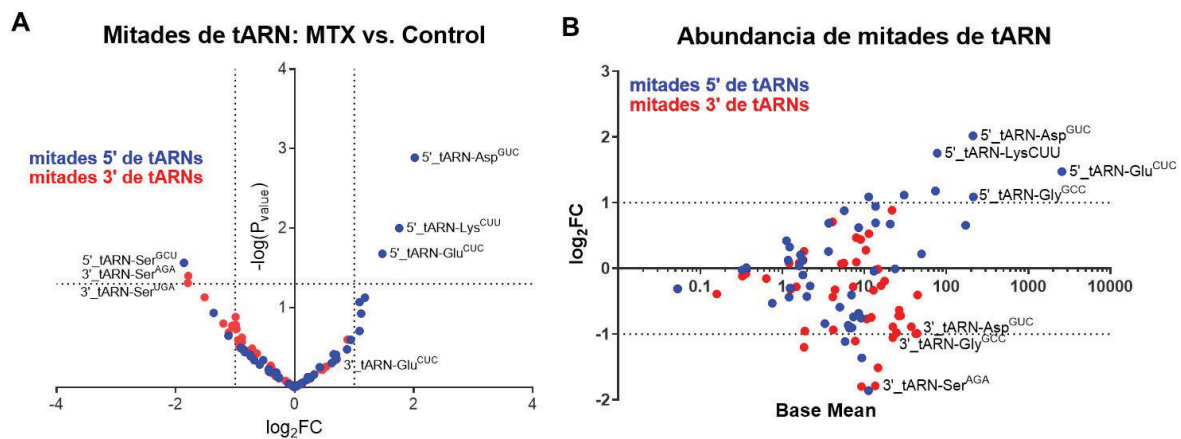
**Fig. 32.- Exposición paterna a MTX afecta los sncARNs espermáticos.** (A) Histograma representando la comparación de los sncRNAs espermáticos entre los machos control (Ctrl) y 10MTX (MTX1-3). (B) Histograma mostrando los biotipos de tARNs del esperma de machos tratados con MTX. (C) Gráfico de volcano representando los sncARNs diferencialmente expresados entre el control y MTX. El análisis de expresión fue realizado usando DESeq2 el cual usa la prueba de Wald con dos colas. (D) Gráfico MA mostrando las cuentas normalizadas (base mean) para los diferentes sncARNs. Las líneas punteadas representan los valores umbrales para los valores significativos de regulación positiva y negativa ( $\pm \geq 1\log_2\text{fold change}$  y  $-\log_{10}\text{Pvalue} \geq 1.3$ ).

**b.- Las mitades 5' tsARNs son preferencialmente acumuladas en el espermatozoide ante el tratamiento con MTX**

Uno de los mecanismos de respuesta de las células ante estrés, u otros factores externos, es el clivaje de los tARN en mitades 5' y 3' (5'tsARNs y 3'tsARNs) <sup>54,56,62,419</sup>. Particularmente, el ARN espermático posee una gran abundancia de fragmentos de tsARN los cuales poseen potenciales roles regulatorios en el desarrollo embrionario temprano <sup>49,54,56,359,361</sup>. Teniendo en cuenta esto; evaluamos la presencia de 5' y 3'tsARNs y observamos que los fragmentos 5'tsARN correspondientes a los tres tRNAs más abundantes (5' tsARN de Asp<sup>GUC</sup>, Lys<sup>CUU</sup> y Gly<sup>GCC</sup>) se encontraban significativamente incrementados en el espermatozoide del grupo tratado con 10MTX; mientras que los fragmentos 3'tsARN no presentaban cambios (**Fig. 33**). Adicionalmente, evaluamos el porcentaje de abundancia de las mitades 5' respecto a sus correspondientes mitades 3' y observamos un incremento significativo para el tARN-Asp<sup>GUC</sup> y -Gly<sup>GCC</sup> en el tratamiento con metotrexato (**Fig. 34 A**). Es importante mencionar que para algunos tARNs (por ejemplo: tARN-Glu<sup>CUC</sup>, -Glu<sup>UUC</sup> y -Gly<sup>UCC</sup>) las lecturas mapeadas para el control y MTX estaban conformadas mayoritariamente por sus mitades 5', mientras que sus correspondientes mitades 3' eran casi indetectables. En otros casos, los porcentajes de abundancia de mitades 5' y 3' era similares y no cambiaban ante el tratamiento (tARNs-Pro<sup>UGG</sup> y -Arg<sup>UCU</sup>) o bien disminuían significativamente las mitades 5' (**Fig. 34 B**).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con MTX podría estar cambiando el procesamiento o estabilidad de tARNs específicos que culminaría con una abundancia diferencial de sus mitades 5' y 3'. Los fragmentos 5'tsARNs pueden ser generados en diversos tejidos y líneas celulares con un tamaño que se encuentra entre los 15-22 nt <sup>367</sup>. Sin embargo, cuando los tejidos o líneas celulares están expuestas a un factor estresante,

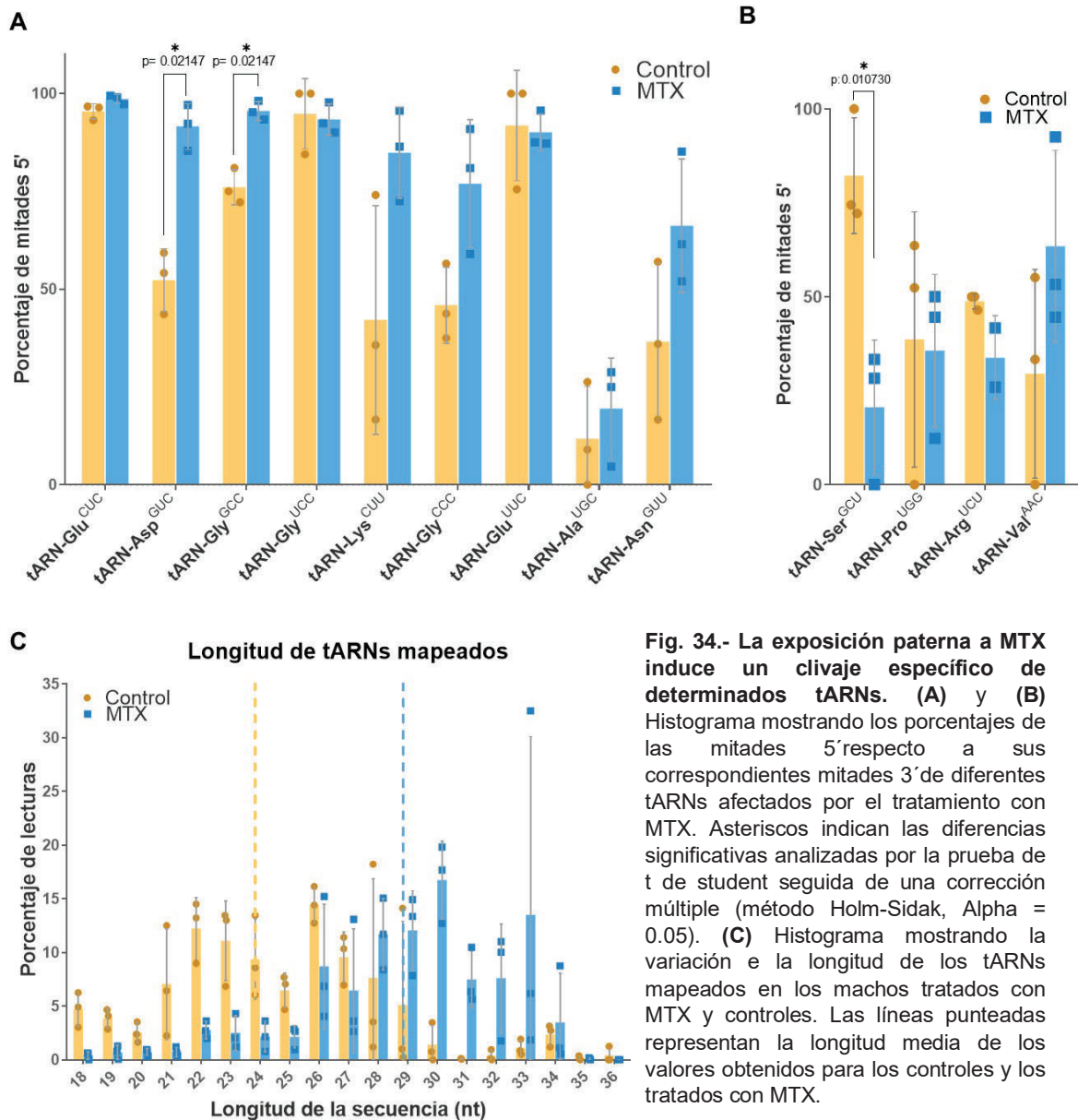
los 5' tsARNs generados poseen un mayor tamaño (31-40 nt)<sup>374,375</sup>. Para evaluar esto, comparamos la distribución de la longitud de los fragmentos derivados de tARNs en ambas condiciones y observamos un cambio hacia fragmentos más largos en el grupo tratado con MTX (promedio 29nt) en relación con el control (promedio 24nt) (**Fig. 34 C**).



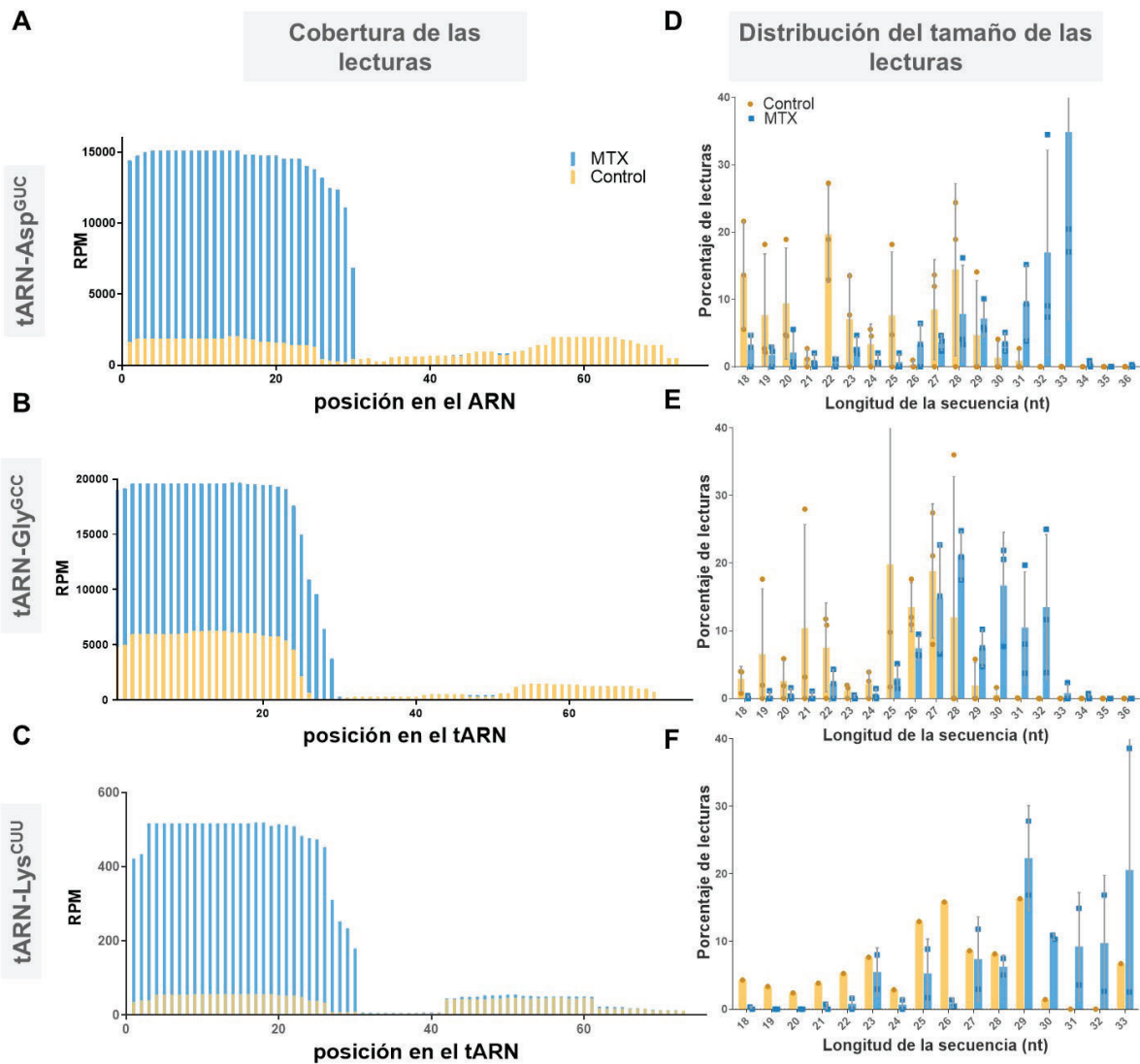
**Fig. 33.- La exposición paterna a MTX induce una expresión diferencial de tARNs específicos.** (A) Gráfico de volcano representando la abundancia de las mitades 5' y 3' de los tARNs que fueron diferencialmente expresado en los machos tratados versus los controles. El análisis diferencial de expresión fue realizado usando DESeq2 el cual usa la prueba de Wald con dos colas. (B) Gráfico MA mostrando las cuentas normalizadas (base mean) para las diferentes mitades 5' y 3' de los tARNs. Las líneas punteadas representan los valores umbrales para los valores significativos de regulación positiva y negativa ( $\pm 1 \log_2$  fold change y  $-\log_{10}$  Pvalue  $\geq 1.3$ ).

Esto puede visualizarse si analizamos de manera individual los tARNs Glu<sup>CUC</sup>, Asp<sup>GUC</sup>, y Lys<sup>CUU</sup> donde sus mitades 5'tsARNs se encontraban incrementados significativamente (**Fig. 35 A-C**) y el tamaño de las lecturas mapeadas era mayor que en los controles (**Fig. 35 D-F**). Para poder descartar que esta diferencia en los tamaños entre el grupo 10MTX y el control se deba a un sesgo en la selección de tamaño cuando se realizaron las bibliotecas, evaluamos la distribución de tamaños de las lecturas que mapean ARNr en ambos grupos (**Fig. 36**). El análisis mostró que la cobertura y la longitud de los fragmentos más abundantes derivados de ARNr eran ligeramente más largos (dos nucleótidos más grandes en promedio) en el tratamiento con MTX (**Fig. 36 B**), pero no tan

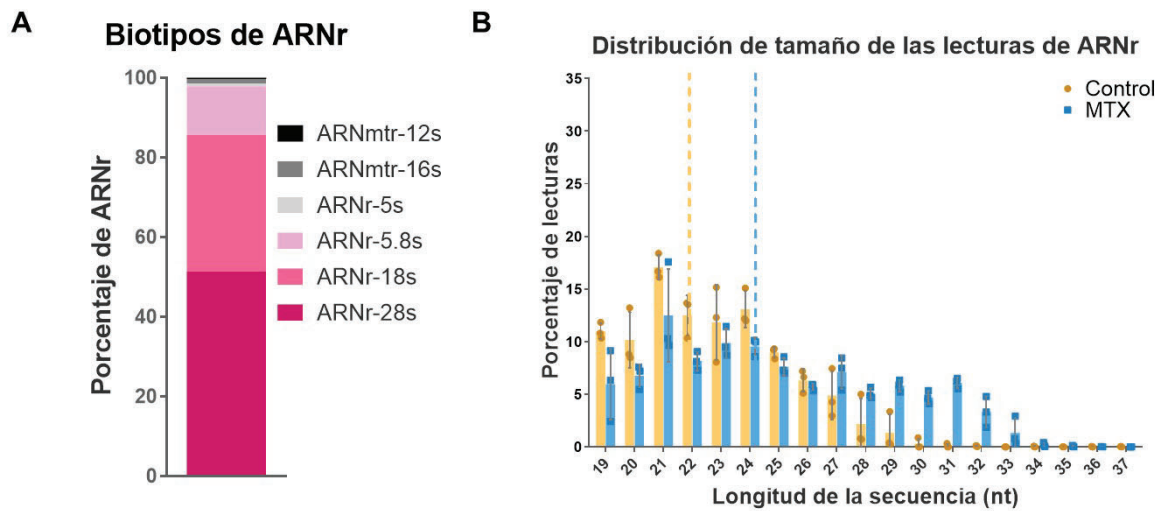
dramático como lo observado para los tsARNs. Todos estos resultados sugieren que la exposición paterna a MTX altera la abundancia y el sitio de clivaje de tARNs en el esperma.



**Fig. 34.- La exposición paterna a MTX induce un clivaje específico de determinados tARNs. (A) y (B)** Histograma mostrando los porcentajes de las mitades 5' respecto a sus correspondientes mitades 3' de diferentes tARNs afectados por el tratamiento con MTX. Asteriscos indican las diferencias significativas analizadas por la prueba de t de student seguida de una corrección múltiple (método Holm-Sidak, Alpha = 0.05). **(C)** Histograma mostrando la variación e la longitud de los tARNs mapeados en los machos tratados con MTX y controles. Las líneas punteadas representan la longitud media de los valores obtenidos para los controles y los tratados con MTX.



**Fig. 35.- La exposición paterna a MTX induce un clivaje diferencial en los tARNs con expresión diferencial.** (A-C) Histogramas mostrando la cobertura de lectura de los tARNs más abundantes y con un incremento significativo de las mitades 5'. El histograma muestra una mayor lectura para la mitad 5' en los machos tratados con MTX. (D-F) Histogramas representando la distribución de las longitudes de los tARNs mapeados en (A-C). La longitud de la secuencia es mucho mayor en los tratados con MTX que los controles. Los gráficos representan tres réplicas biológicas independientes (n=3) compuesta de un pool de esperma de 9 machos. Los valores son las medias  $\pm$  SD.

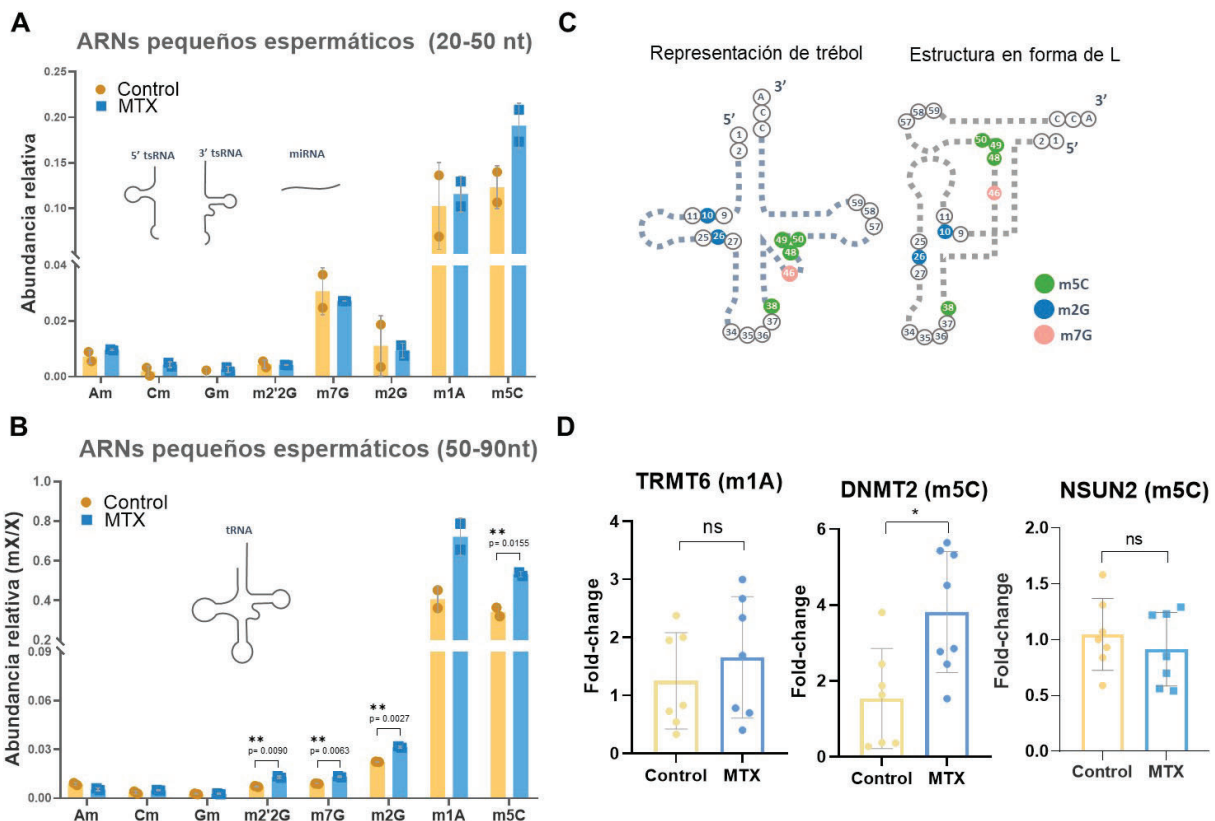


**Fig. 36.- La exposición paterna a MTX no afecta el clivaje de los ARNr.** (A) Histograma mostrando los biotipos de ARNr del esperma de machos control y tratados con MTX. (B) Histograma mostrando la variación de la longitud de los ARNr mapeados en los controles y machos tratados con MTX. La línea punteada representa la longitud media de los ARNr para los controles y tratados con MTX. Los gráficos representan tres réplicas biológicas independientes (n=3) compuesta de un pool de esperma de 9 machos. Los valores son las medias  $\pm$  SD.

### c.- La exposición paterna a MTX incrementa la modificación m5C en ARNs pequeños

Los tRNAs sufren diferentes modificaciones postranscripcionales que son importantes para su clivaje específico, estabilidad y funcionalidad <sup>387,420</sup>, así como para la transmisión de experiencias paternas hacia la descendencia <sup>61-63,421,422</sup>. Por lo tanto, decidimos evaluar por UHPLC-MS-MS el estatus de metilación de dos poblaciones de ARNs aislados a partir de machos tratados con MTX y control: 1- ARNs de 20-50 nt (mayoritariamente enriquecida en miARN y tsARNs), y 2- ARNs de 50-90 nt (mayoritariamente enriquecida en tRNAs maduros). Dentro de la población de 20-50 nt, no observamos diferencias significativas entre los grupos MTX y control (**Fig. 37 A**). Sin embargo, en la población de 50-90 nt, encontramos que el tratamiento con MTX generaba un incremento significativo en la abundancia relativa de diferentes modificaciones (**Fig. 37**

**B).** Entre las modificaciones más abundantes analizadas (m1A y m5C), solamente m5C se encontraba incrementada significativamente en las muestras tratadas con MTX. Entre las otras modificaciones menos abundantes, observamos que m2G, m7G y m2'2G estaban incrementadas significativamente en el grupo MTX.



**Fig. 37.-La exposición paterna a MTX altera las modificaciones postranscripcionales en la fracción de tARNs espermáticos y la expresión testicular de las metiltransferasas de ARN.** Histogramas comparando la metilación del ARN en controles y tratados con MTX usando HPLC-MSMS en las fracciones de 20-50 nt (**A**) y 50-90nt (**B**). Los datos representan dos réplicas biológicas independientes (n=2) compuesta por ARN aislado del esperma de 9 machos. El análisis estadístico fue realizado usando la prueba no pareada y de dos colas de t de student. Los valores representan media  $\pm$  SD. (**C**) Representación esquemática de la ubicación de los nucleótidos modificados en la estructura secundaria y terciaria del tRNA. (**D**) RT-qPCR para las metiltransferasas de m1A (TRMT6), m5C (DNMT2 y NSUN2) en el testículo de controles y machos tratados con MTX. La expresión génica fue normalizada usando los genes de expresión constitutiva Rpl7 y Ef1. El análisis estadístico se realizó usando la prueba no pareada y de dos colas t de student. Cada punto representa una muestra biológica independiente compuesta del ARN aislado del testículo de un macho. Los valores son la media  $\pm$  SD.

Es importante mencionar que los tRNAs presentan 4 sitios susceptibles a metilarse en 5mC (**Fig. 36 C**) en la región 3' y que los mismos están relacionados con el clivaje enzimático en mitades tsARNs<sup>390,423</sup>. Dada las diferencias observadas en algunas

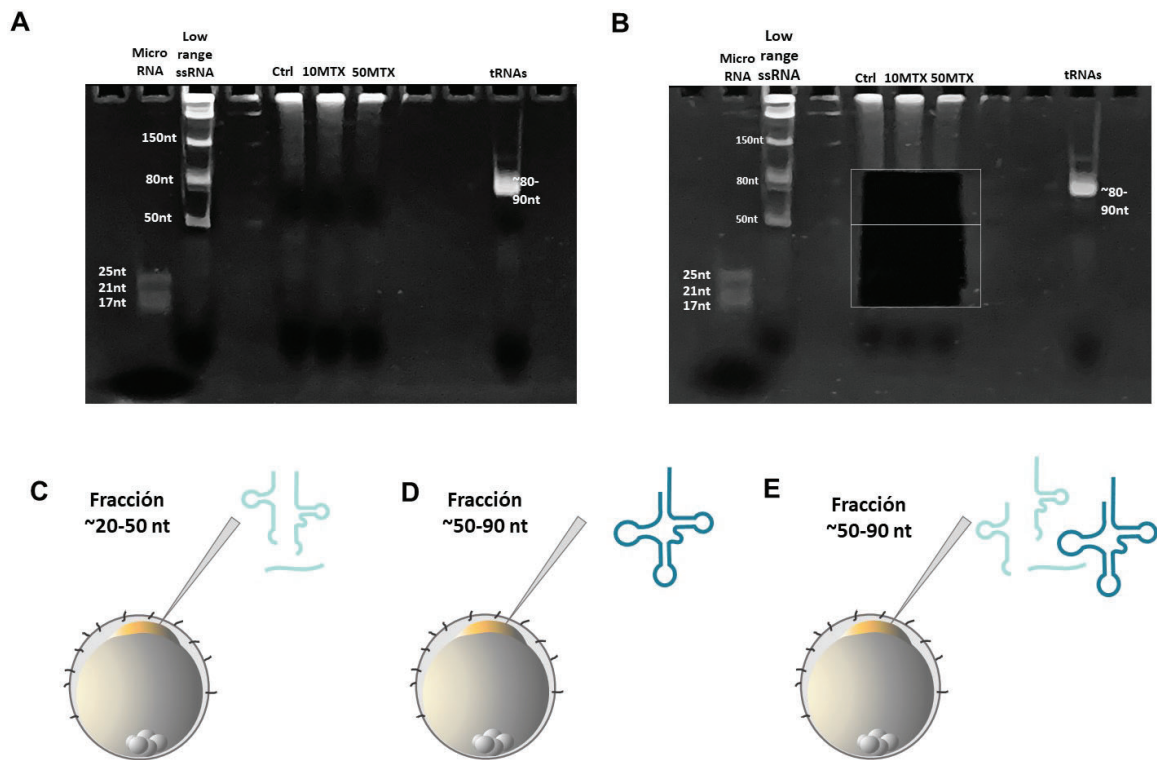


modificaciones postranscripcionales, decidimos evaluar la expresión de metiltransferasas de ARN en el testículo de machos control y tratados con MTX (**Fig. 36 D**). Particularmente, nos enfocamos en las metiltransferasas de ARN que generan las marcas más abundantes. La expresión de la *Trmt6* -la cual cataliza la metilación m1A- no presentaba un cambio significativo. Por otro lado, al evaluar la expresión de la *Dnmt2* y *Nsun2* (ambas catalizan la metilación m5C), observamos que la *Dnmt2* se encontraba sobre expresada significativamente, pero no la *Nsun2*. En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con MTX incrementaría la expresión de *Dnmt2* y por ende la metilación en 5mC de los tRNAs, lo cual podría conllevar a un aumento en el clivaje de los tARNs en mitades tsRNAs, siendo las mitades 5'tsARNs las más estables respecto a las mitades 3'tsARNs.

#### **4.2.3 Impacto de los sncARNs paternos (afectados) en el desarrollo de la descendencia**

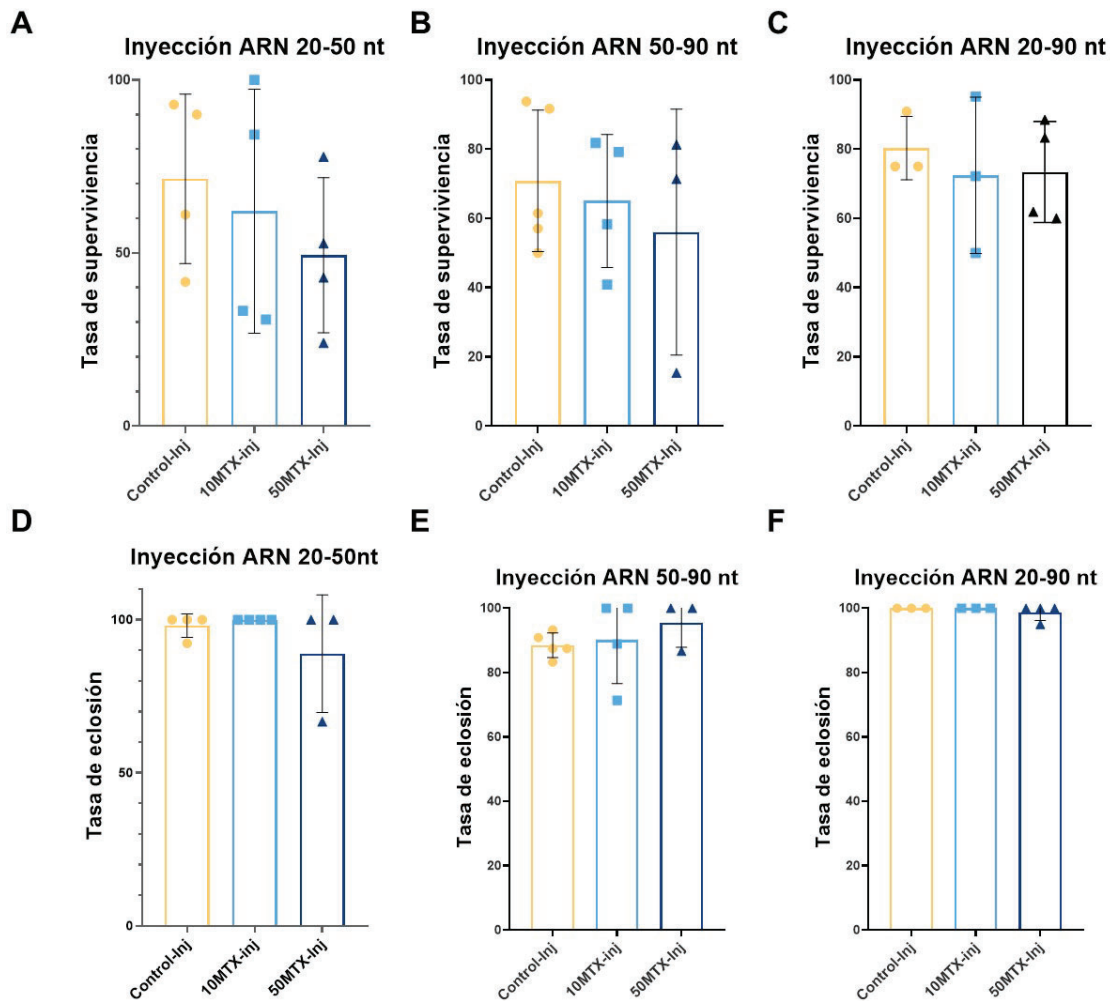
##### **a.- Inyección cigótica del ARN espermático procedente de machos tratados con MTX recapitula parcialmente el fenotipo craneofacial.**

Para poder determinar el potencial rol de los ARNs pequeños espermáticos alterados como posible causante de los defectos craneofaciales observados, realizamos inyecciones cigóticas de diferentes fracciones de ARN. Para ello, el ARN extraído de machos tratados con MTX y controles fue corrido en un gel de poliacrilamida y las fracciones correspondientes a 20-50 nt y 50-90 nt fueron recuperadas (**Fig. 38 A, B**). Posteriormente, estas fracciones fueron inyectadas independientemente o en combinación (20-90nt) en oocitos fertilizados provenientes de parejas *wild type* (**Fig. 38 C-E**).



**Fig. 38.- Aislamiento de las fracciones de ARN espermático e inyección cigótica.** Geles de poliacrilamida representado la corrida electroforética antes (A) y después (B) del aislamiento de las fracciones de ARN de 20-50nt y 50-90nt. (C-D) Representación esquemática de la inyección cigótica de las diferentes fracciones de ARN aislado de machos control y tratados con MTX.

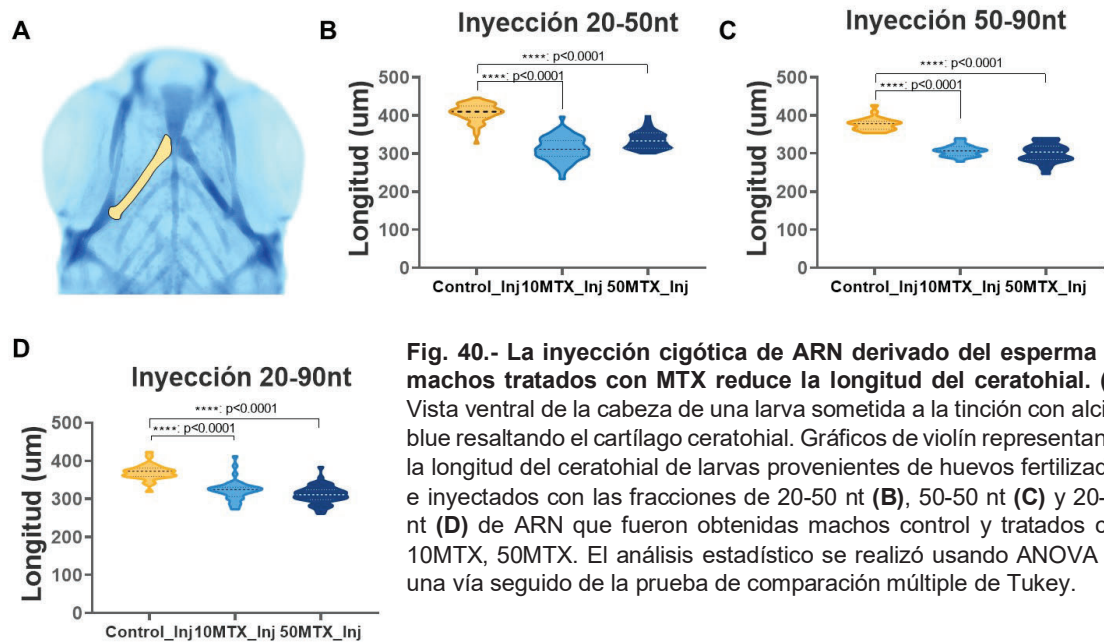
Inicialmente, no observamos diferencias en los porcentajes de eclosión (Fig. 39 A-C) y de supervivencia (Fig. 39 D-F) entre las inyecciones cigóticas de ARN provenientes del esperma de machos tratados con MTX o los controles. Considerando que nuestros resultados anteriores mostraron que los cartílagos ceratohial y basihial eran los más afectados, nos enfocamos en analizar estos cartílagos. Pudimos observar que la inyección de las fracciones 20-50 nt, 50-90 nt o la combinación (20-90 nt) generaba una reducción significativa de la longitud del ceratohial (Fig. 40) en las dos dosis de tratamiento con MTX comparadas con el control.



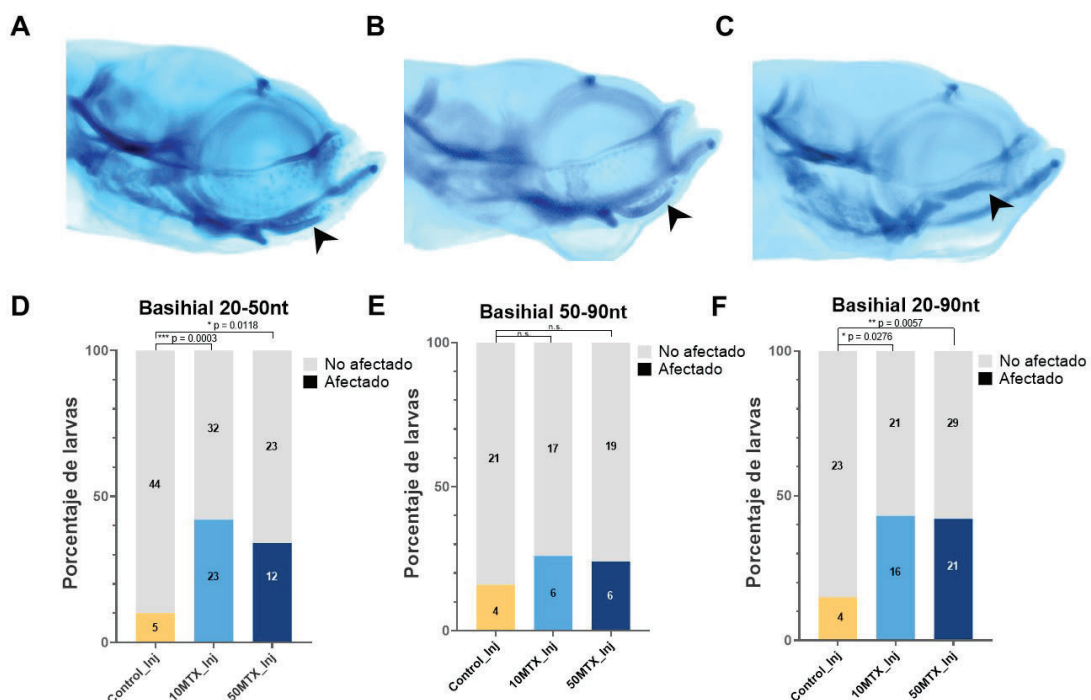
**Fig. 39.- La inyección cigótica de ARNs espermático paterno no afecta los parámetros poblacionales.** Histograma representando la tasa de supervivencia (A-C) y de eclosión (D-F) de los embriones después de la inyección cigótica de las fracciones de 20-50, 50-90 y 20-90 nt de ARN asiladas de machos control y tratados con MTX. El análisis estadístico se realizó usando la prueba de dos colas t de student comparado con el control de manera independiente. Cada punto representa una réplica biológica independiente. Los valores son la media  $\pm$  SD

Por otro lado, cuando evaluamos el fenotipo del basiial no pudimos observar la malformación severa (forma de garfio – **Fig. 31 D''**); sin embargo, observamos que las larvas poseían el cartílago curvado (afectado) con la punta del basiial hacia arriba o abajo (**Fig. 41**). Notablemente, la inyección de la fracción 20-50 nt de los tratamientos 10MTX y 50MTX, pero no la de 50-90 nt, incrementó significativamente el número de larvas

afectadas (**Fig. 41 D, E**). De manera similar, la inyección de la fracción de ARN 20-90nt generó un efecto similar que la fracción 20-50nt (**Fig. 41 F**).



**Fig. 40.- La inyección cigótica de ARN derivado del esperma de machos tratados con MTX reduce la longitud del ceratohial. (A)** Vista ventral de la cabeza de una larva sometida a la tinción con alcian blue resaltando el cartilago ceratohial. Gráficos de violín representando la longitud del ceratohial de larvas provenientes de huevos fertilizados e inyectados con las fracciones de 20-50 nt (**B**), 50-50 nt (**C**) y 20-90 nt (**D**) de ARN que fueron obtenidas machos control y tratados con 10MTX, 50MTX. El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.



**Fig. 41.- La inyección cigótica de ARN derivado del esperma de machos tratados con MTX recapitula parcialmente la deformación del ceratohial. (A-C)** Vistas laterales de las larvas mostrando el basihial con su forma normal (A) o afectado con la punta hacia arriba (B) o hacia abajo (C). Histogramas representando la cuantificación del porcentaje de larvas que presentaron los fenotipos descritos en (A-C) de cigotos inyectados con las fracciones de 20-50 nt (**D**), 50-50 nt (**E**) y 20-90 nt (**F**) de ARN que fueron obtenidas machos control y tratados con 10MTX, 50MTX. Los números en las gráficas representan el número de larvas analizadas. El análisis estadístico se realizó usando una tabla de contingencia seguida de la prueba de Fisher.

Todos estos resultados sugieren que los ARNs espermáticos provenientes de machos expuestos a MTX son suficientes para alterar el desarrollo de cartílagos craneales específicos en la descendencia.

### 4.3.- Discusión y conclusiones

El MTX es un antagonista del folato que inhibe el ingreso/metabolismo de folato previniendo que este cumpla su rol biológico. Por más de 30 años, esta droga ha sido usada para tratar enfermedades inmunológicas (incluyendo la artritis reumatoidea), cáncer de sangre y órganos, enfermedades dermatológicas, y terminación del embarazo <sup>224,424</sup>. El MTX se encuentra completamente contraindicado en mujeres embarazadas debido al riesgo de aborto y al aumento de la incidencia de generar anomalías congénitas. El efecto directo del MTX sobre el desarrollo embrionario ha sido bien documentado en diversos modelos biológicos, incluyendo peces <sup>134,402,425,426</sup>. Sin embargo, no existen estudios que demuestren la influencia paterna de la exposición al MTX en la descendencia.<sup>301</sup> En ese sentido, nuestro estudio es uno de los primeros que se enfoca en evaluar el posible efecto paterno del MTX en el desarrollo de la descendencia.

Nuestro estudio demostró que el tratamiento paterno con MTX, al menos durante el tiempo y las dosis utilizadas, no era capaz de afectar la fertilidad de los mismo ni tampoco la supervivencia hasta el momento de la eclosión de la progenie. Estudios realizados en ratones, los cuales fueron sometidos a dietas deficientes de folato durante toda su vida, generó un bajo conteo de espermatozoides, así como también consecuencias negativas en la progenie y cambios epigenéticos <sup>427,428</sup>. Sin embargo, esos resultados podrían deberse a que los individuos tuvieron una deficiencia de folato durante el desarrollo embrionario y

post embrionario, lo cual podría haber comprometido la formación de las células germinales y la espermatogénesis adulta.

Por muchos años, se consideró que el espermatozoide solamente contribuía en la restitución del genoma diploide en el cigoto y que las experiencias paternas, a diferencia del rol materno, no afectaban el normal desarrollo de la descendencia. Además, se consideraba que el esperma era transcripcionalmente quiescente y que su contribución era exclusivamente genómica. Sin embargo, en los últimos años se ha revelado que los espermatozoides contienen y transfieren al oocito una variedad de ARNs <sup>50,360,362,429</sup> capaces de transmitir experiencias paternas <sup>41,42,54,56,57</sup>. En este aspecto, nuestro trabajo aporta más evidencias que valorizan el rol que tienen los ARN presentes en el esperma y su rol en el desarrollo embrionario. Particularmente, los ARNs pequeños, incluyendo tsarns y miRNAs, fueron algunos de los más abundantes y cambiantes ante el tratamiento con MTX. Estos mismos sncARNs han sido propuestos como mediadores de las experiencias paternas en mamíferos <sup>49,56,358,359,362</sup>. En especial, y al igual que lo evidenciado en nuestro trabajo, la abundancia de las mitades de tsARNs serían poblaciones dinámicas que responderían a una variedad de estresores ambientales <sup>54,56,376</sup>. Particularmente, observamos una alta abundancia de ciertos 5'tsRNAs, siendo 5'tsARN-Asp<sup>GUC</sup> el más abundante. Este mismo tsARN se encontró aumentado en el esperma de machos sometidos a diferentes factores externos tales como dieta alta en proteína, dieta alta en grasa, estrés odorífico, entre otros <sup>54,359</sup>. Estos resultados resaltan que ciertos tRNAs presentan una mayor susceptibilidad a ser clivados, y que sus mitades 5' presentarían una mayor vida media comparado a sus respectivas mitades 3'.

Los tsARNs pueden ser generados a través de múltiples clivajes, donde factores regulatorios como las modificaciones del ARN o ARNasas específicas tienen un rol importante en la especificidad y estabilidad <sup>362</sup>. Notablemente, encontramos que los

5'tsARNs de Asp<sup>GUC</sup> y Gly<sup>GCC</sup> son más largos (~35nt) en el esperma de machos tratados con MTX. Esta observación se correlaciona con estudios previos que han mostrado que en promedio las mitades de tsARNs rondan entre los 15-22 nucleótidos, mientras que en respuesta a un agente estresor el tamaño de los mismo cambia a un rango de 31-40 nucleótidos<sup>367,374,375</sup>. Es importante destacar que los tsARNs presentan un alto número de modificaciones que contribuyen a su función, biogénesis, estabilidad, carga de aminoácidos y traducción<sup>422</sup>. En este contexto, diversos estudios han demostrado que la adición de 5mC -controlada por la actividad de la DNMT2 y NSUN2- incrementa la estabilidad de los tARNs mientras que su delección hace que los tARNs tengan mayor probabilidad de ser clivados bajo condiciones de estrés<sup>56,61,63</sup>. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que las fracciones de 50-70 nucleótidos (conteniendo mayoritariamente tARNs) del esperma de machos tratados con MTX poseían niveles significativamente mayores de metilación en m5C, m2G, m7G, y m2'2G; mientras que la fracción que contenía a los tsARNs/miARNs (20-50 nt) no mostraba diferencias en la metilación. Estos resultados, y el hecho que la mayoría de las modificaciones en m5C han sido descritas en el extremo 3' del tARN (posición 38C, 48C, 49C, 50C), nos hacen especular que después de ser clivados, los fragmentos 3'tsARNs podrían ser preferentemente degradados debido a la presencia de dichas modificaciones<sup>430</sup>. La observación de un aumento significativo en la abundancia de 5mC en nuestra fracción de 50-90nt de los machos tratados con MTX fue en concordancia con los altos niveles de expresión de *Dnmt2* (también conocida como *Trdmt1*), pero no de *Nsun2*. La *Dnmt2* está estructuralmente relacionado con otras DNA metiltransferasas, aunque solamente metila al tARN-Asp en la posición 38 de loop anticodón<sup>431</sup>. Notablemente, encontramos que el 5'tsARN-Asp<sup>GUC</sup> era el segundo tARN más abundante en los machos tratados con MTX y presentaba un incremento significativo en relación con su mitad 3'tsARN. De manera

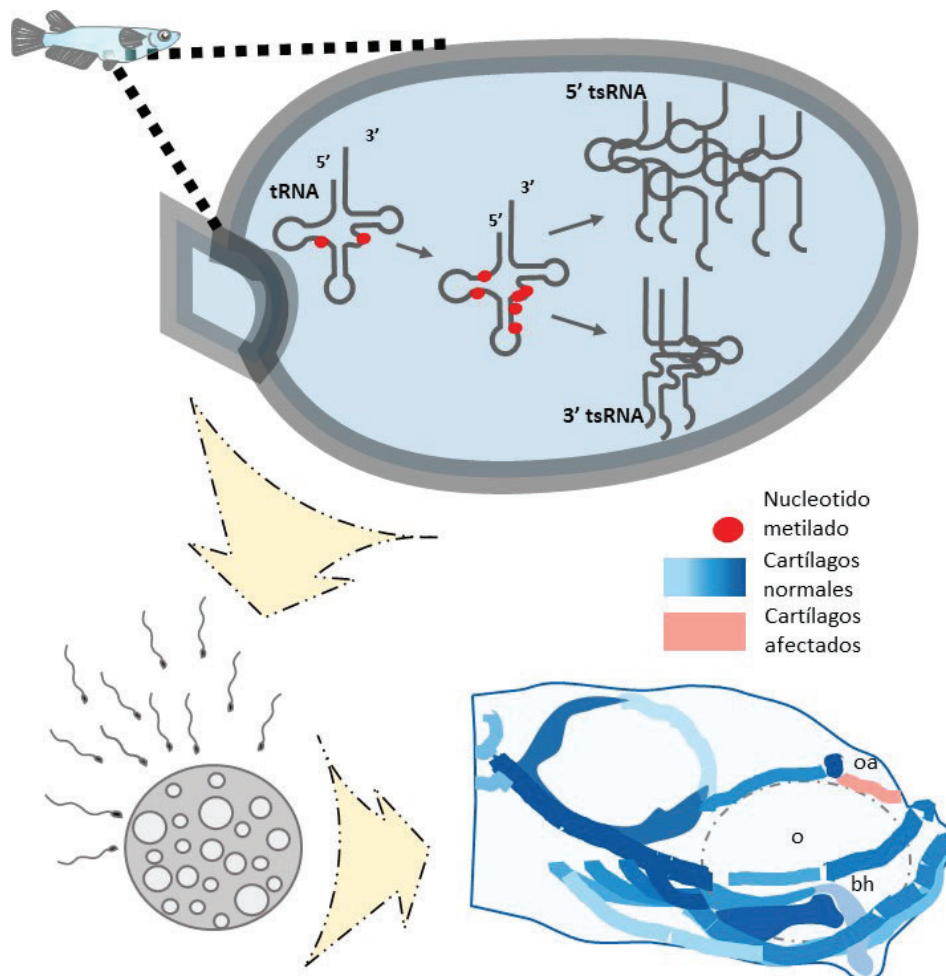
opuesta, estudios realizados en mosca y mamíferos demostraron que la modificación m5C, mediada por la DNMT2, aumenta la estabilidad de los tARNs y protege al tARN-Asp del clivaje realizado por angiogenina <sup>56,61,63</sup>. Sin embargo, es importante mencionar que la endonucleasa evaluada en *Drosophila* fue una angiogenina humana recombinante, lo cual no refleja las condiciones fisiológicas reales. Además, se ha demostrado que la presencia de angiogenina no es suficiente para la generación de tsARNs y que otras ARNasas (Dicer, ARNasa T2, L) pueden también clivar a los tARNs <sup>368,369,432</sup>. En ese sentido, los peces no poseen angiogenina y por lo tanto otras ARNasas cumplirían esta función <sup>433–435</sup>. Finalmente, es importancia mencionar que la actividad, estructura y los dinucleótidos blancos en donde ocurre el clivaje son diferentes entre las ARNasa de peces y mamíferos <sup>433–436</sup>. Por otro lado, la presencia de m5C u otras modificaciones puede afectar de manera diferencial la actividad de ARNasas, siendo en algunos casos activadora y en otros inhibidora <sup>386</sup>. Como resultado, las modificaciones podrían actuar como una especie de “código de barras” capaces de regular el clivaje y estabilidad de tARNs específicos, resultando en la acumulación de tsARNs en el esperma capaces de afectar el fenotipo de la descendencia.

En resumen, nuestros datos sugieren que la exposición paterna a MTX influencia la metilación de los tARNs espermáticos debido a una alteración en la expresión de ciertas metiltransferasas de ARN. Estos cambios epitranscriptómicos podrían causar el clivaje selectivo de los tARNs y el mantenimiento de las mitades 5' de los tARNs. La acumulación de estas mitades, y posiblemente las modificaciones presentes en ellas, podrían afectar cascadas transcripcionales en el cigoto, que culminaría afectando el normal desarrollo de las estructuras craneofaciales (**Fig. 42**). La comprensión de cómo las modificaciones de los tARNs y sus fragmentos derivados impacta en las cascadas transcripcionales que



ocurren durante el desarrollo embrionario temprano proveerá conocimientos importantes para la prevención y/o tratamiento de diferentes enfermedades.

**Todos estos resultados ya fueron publicados (Alata Jimenez, N., Castellano, M., Santillan, E.M. et al. Alata Jimenez et al., Nature Communications (2023), <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37427-7>).**



**Fig. 42.- Modelo propuesto.** La exposición paterna a MTX mediante inyección genera un incremento en la metilación de los ARN de transferencia ocasionando un incremento en el clivaje de este y posterior generación de mitades 5'. Finalmente, La fecundación de un ovocito por los espermatozoides cargados diferencialmente con las mitades 5' de los tARN genera un defectos en el desarrollo de algunos cartílagos craneales

#### 4.4.- Materiales y Métodos

*Oryzias latipes* (medaka): adultos y larvas

##### *Crianza del pez medaka*

Los peces medaka (*Oryzias latipes*) (línea hi-medaka ID:MT835) suministrados por el National BioResource Project (NBRP) Medaka (<http://www.shingen.nig.ac.jp/medaka/>) fueron mantenidos y alimentados de acuerdo a los protocolos estándares para medaka <sup>408</sup>. Los peces fueron manipulados acorde a Care and Management of Laboratory Animals (<http://www.ufaw.org.uk>) y regulaciones internas (CICUAE-UNSAM 33/2022). Los peces adultos fueron divididos y climatizados en peceras de 4L durante 3 semanas bajo un constante fotoperiodo de (14L:10O) y temperatura controlada ( $26\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ), antes de los procedimientos experimentales.

##### *Diseño experimental*

Peces adultos fueron divididos en 3 grupos compuestos por 3 réplicas independientes que tenían 9 machos y 2 hembras cada pecera (~200 mg de peso corporal). Después del periodo de aclimatación, cada macho fue inyectado intra-peritonealmente con la solución control (PBS/1%DMSO), 10mg/Kg de peso corporal de Metotrexato (MTX) (10mg/Kg MTX) o 50mg/Kg MTX (Sigma-Aldrich, A6770, diluido en PBS/1%DMSO). Los machos fueron anestesiados con 1% de solución de benzocaína (Parafarm), secados gentilmente con un papel toalla, colocados (con la parte ventral hacia arriba) en una esponja con la aleta anal y la papila urogenital expuesta. Inmediatamente, utilizando una jeringa de 10 $\mu\text{L}$  (Hamilton), los peces fueron inyectados con la ayuda de un estereoscopio binocular (Nikon, SMZ745)

y luego regresados a sus respectivas peceras. El séptimo día post inyección se realizó la recolección de esperma para la fertilización *in vitro* y para la extracción de ARN.

### *Fertilización In Vitro*

Para la recolección de esperma se anestesió al pez y se le colocó en una esponja con el lado ventral hacia arriba de acuerdo al protocolo publicado para medaka <sup>408</sup>. Una micro pinza fue usada para aplastar gentilmente la región abdominal del pez; el semen liberado fue colectado mediante el uso de una micropipeta (~0.5µL/pez), y juntado para una posterior fertilización *in vitro* y extracción de ARN. Para la fertilización *in vitro*, 0.2µL de esperma fue usado para fertilizar un pool de 24-37 oocitos los cuales fueron colectados de hembras maduras y no tratadas. Los oocitos fecundados fueron inmediatamente transferidos e incubados en placas Petri de 60mm que contenían medio para embriones (17mM NaCl, 0.4mM KCl, 0.27mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, y 0.66mM MgSO<sub>4</sub>; pH 7) hasta el día 3 post eclosión (dpe).

### *Tinción azul Alcian*

Los cartílagos de los embriones procedentes de la fertilización *in vitro* fueron analizados en el día 3 post eclosión utilizando la tinción con azul Alcian. Para ello, las larvas fueron fijadas en 4% de para-formaldehído en PBS durante toda la noche, posteriormente se realizó 3 lavados con PBSw (PBS-0.1% Tween-20). Los embriones fueron incubados en la solución de blanqueamiento (0.5X SSC, 5% formamida, 10% peróxido de hidrogeno) y expuestas a la luz durante 2 h. Posteriormente, las larvas fueron lavadas varias veces con PBSw e inmediatamente incubadas en una solución de azul Alcian (01% p/v azul Alcian, 0.37% v/v HCl, 70% v/v etanol) por 1h en agitación, luego se realizó 5 lavados con 10% v/v HCl, 70% v/v etanol por 30 min cada lavado y en agitación;

el último lavado se realizó toda la noche a temperatura ambiente. Después, las larvas fueron lavadas 6 veces con 50% v/v glicerol, 0,5% v/v KOH por 30 min cada lavado y en agitación, el último lavado también se realizó toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, las larvas fueron lavadas 4 veces con la misma solución y se dejaron en 90% glicerol y, 10% etanol para la obtención de fotografías y el análisis de fenotipos. Las larvas fueron fotografiadas con vista ventral, lateral y dorsal utilizando un estereoscopio trinocular (SteReo Discovery v20. Zeiss) y el análisis de las imágenes se hizo usando el software ImageJ <sup>437</sup>.

#### *Extracción de ARNs pequeños y preparación de la librería*

Los ARNs pequeños fueron aislados del esperma utilizando Illustra RNAspin Mini RNA isolation kit (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los adaptadores 3' fueron ligados utilizando adaptadores *barcode* SRBC para cada muestra, adicionalmente marcadores de 18-mer y 30-mer fueron ligados y usados como control de ligación y marcadores para el tamaño correcto del producto. Los ARN pequeños ligados en el 3' fueron seleccionados por tamaño mediante el uso de un gel de 15% poliacrilamida desnaturizante con urea a potencia constante de 40-50 W durante 30 min y teñidos con SYBR Gold (0.05% v/v en TBE 0.5X); los ARN ligados en el 3' con tamaños entre 18-30 mers fueron cortados. Los ARNs fueron purificados utilizando Zymo PAGE Elution kit (ZR™ small RNA PAGE recovery kit) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La muestra con los RNAs pequeños fue eluída en el mix 5' *linker* que contenía los adaptadores 5'. Los ARN ligados en el 3' + adaptador 5' fueron desnaturizados por 5 min a 70°C, colocados en hielo inmediatamente, ligados con T4 RNA ligasa (NEB) e incubados a 16 grados toda la noche. Los ARNs pequeños y ligados fueron purificados usando perlas MBS, brevemente: el buffer MBS y las perlas MBS fueron mezcladas en un vórtex, se

añadió isopropanol y se incubó a temperatura ambiente. Las perlas fueron separadas en un magneto y el sobrenadante fue removido, después de varios lavados con etanol, el ARN fue eluído con agua ultrapura y transferido a tubos de PCR.

Para la transcripción reversa, se usó small-RNAseq RT primer para cada muestra y un control negativo se incluyó (sin transcriptasa reversa); para la obtención de la síntesis de la primera cadena se utilizó Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). La amplificación de la librería de ADNc (ADN complementario) se realizó mediante el uso de KAPA HiFi Real Time Library Amplification Kit (Roche), la PCR se realizó usando TruSeq Universal Adapter primer (Solex\_PCR\_fwd) y TruSeq Index reverse primer (Solexa\_IDX\_rev), este último incluye la identificación para cada muestra. Brevemente, el master mix, los primers TruSeq Index reverse primer fueron añadidos a los tubitos de PCR que contenían los ADNc, luego el KAPA HiFi HS RM y los TruSeq Universal Adapter fueron añadidos al mix. El programa de ciclado fue: desnaturalización a 98°C por 45 s; 20 ciclos de 98°C por 15s, 65°C por 30s, 72°C por 30s, 72°C por 10s; y una extensión final a 72°C por 1 min. Los ADNc amplificados fueron purificados usando un gel de agarosa Low-Range Ultra Agarose (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante a voltaje constante de 80-100 V y usando el marcado de peso molecular GeneRuler 50bp DNA Ladder (ThermoFischer Scientific). El gel fue visualizado en un transiluminador UV de onda larga, las bandas de ADN entre 150-200pb fueron cortadas usando una hoja de bisturí limpia y colocadas en un tubo Falcon de 15ml. Finalmente, el ADN fue purificado usando Zymoclean Gel DNA recovery kit (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó usando el equipo Illumina HiSeqV4 SR50

### *Análisis Bioinformático*

Los adaptadores fueron removidos de las lecturas usando CUTADAPT y el resultado fueron lecturas  $\geq 15$ pb; las lecturas cuyos adaptadores no fueron identificados se descartaron. El resultado de 15bp fue usado para el análisis diferencial de la expresión de sncRNAs (miRNAs, tRNAs, snRNAs, snoRNAs y rRNAs), la expresión diferencial de tRNAs, mitades 5' y 3' de tRNAs por estrategias diferentes.

Primero, la expresión diferencial de sncRNAs fue analizada en las lecturas donde los nucleótidos al azar en el 5' (4pb) y 3' (6pb) fueron cortados usando FASTQ Trimmer. Las lecturas obtenidas que poseían  $<19$ pb fueron descartadas usando Filter Fastq y las lecturas restantes fueron alineadas contra el genoma del pez medaka (Assembly ASM00223467v1) con RNA STAR (permitiendo multimapeo de lecturas, 1 *mismatch*, y no permitiendo intrones). La expresión de sncRNAs fue analizada usando FeatureCounts (permitiendo multimapeo de lecturas para el conteo, y asignando la fracción  $1/n$  para las lecturas multimapeadas) con Ensemble annotation (Release v102). La expresión diferencial de los sncRNAs fue calculada usando DESEQ2.

Segundo, para analizar la expresión de las mitades 5' y 3' de los tRNAs, 3 pares de bases adicionales fueron removidas del extremo 3' de las lecturas mediante el uso de FASTQ Trimmer. Las lecturas que tenían menos de 15pb fueron descartadas usando Filter Fastq. El resultado fue alineado y analizado como se mencionó previamente usando archivos GTF con coordenada genómicas para las mitades 5' o 3' del tRNA. Para determinar la longitud de la secuencia mapeada, archivos BAM fueron filtrados (usando archivos GTF que contenían coordenadas genómicas para la longitud total de los tRNAs), las lecturas fueron extraídas, convertidas a fasta y sus longitudes computarizadas con un script desarrollado en el laboratorio. La cobertura de las lecturas de los tRNAs fue calculada con BamCoverage (bin size 1, no smoothing).

## UHPLC-MS-MS

El análisis de los ribonucleótidos modificados del ARN espermático fue realizado mediante el uso de UHPLC-MS-MS. Para tal fin, ~1.5µg de ARN total fue extraído de dos replicas independientes las cuales estaban conformadas por un *pool* de espermatozoides procedente de ~ 9 machos control y ~ 9 machos tratados con 10MTX, y corrido en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (15%, 7M Urea). El gel fue teñido con Bromuro de Etidio (Invitrogen) y los ARNs que tenían un tamaño entre 20-50nt y 50-90nt fueron cortados y recuperados usando ZR small-RNA™ PAGE Recovery Kit (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Aproximadamente 100ng de ARN fue obtenido de cada fracción y fue utilizado para el análisis por UHPLC-MS-MS. El ARN purificado (de cada muestra) fue digerido hasta nucleósido por 2h a 37°C usando Nucleoside Digestion mix (NEB, M069S). La cuantificación fue desarrollada como se menciona previamente<sup>438</sup>. La detección por espectrometría de masa fue realizada usando un espectrómetro de masa triple de cuatro polos Agilent 6470 en un electro spray ionizante en modo positivo, y los datos fueron cuantificados en el modo monitoreo de reacción dinámica múltiple (dMRM), por el monitoreo de las transiciones 268☉II136 para adenosina (A), 282☉II150 for N6-metiladenosina (m1A), 244☉II112 para citidina (C), 258☉II126 for C5-metilcitidina (m5C), 284☉II152 para guanosina (G), 298☉II166 para N7'-metiladenosina (m7G) y N2-metilguanosina (m2G), 312☉II180 para N2,N2-dimetilguanosina (m2'2G), 282☉II136 para 2'-O-metiladenosina (Am), 258☉II112 para 2'-O-metilcitidina (Cm) y 298☉II152 para 2'-O-metilguanosina (Gm). Para cuantificar las concentraciones de varias modificaciones de metilación, se usó nucleósidos puros de A, C, G, m1A, m5C, m7G, m2G m2'2G, Am, Cm y Gm para generar las curvas estándares de calibración a través de diluciones seriadas

### *Cuantificación de ARN por RT-PCR*

Para la cuantificación de la expresión génica se utilizó testículos disectados de machos adultos (control y 10MTX). Para este propósito, cada testículo completo fue individualmente triturado (n= 8 machos) en 300µL de TRIzol Reagent (Life Technologies) y el ARN total (~800ng/testículo) fue extraído y retrotranscripto <sup>439</sup>. La expresión de los genes seleccionados fue medida por qPCR usando Fast Start Universal SYBR green Supermix (Roche Diagnostics, USA) en un Thermal Cycler StepOne Plus (Applied Biosystem, USA), usando la proteína ribosomal L7 (*rpl7*) y el factor de elongación alfa (*ef1α*) como genes de referencia y con el cálculo de la media geométrica descrito por Arias Padilla et al. <sup>439</sup>. Cada muestra fue corrida en duplicado y una reacción de PCR sin la adición de templado fue usada como control negativo. El protocolo de amplificación consistió de un ciclo inicial de 1 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de: 15 s a 95°C y 30 s a 60°C. Después de la amplificación, una curva de melting fue realizada para 1 ciclo de: 15s a 95°C. 60s a 60°C y 15s a 95°C permitiendo la confirmación de la amplificación de un solo producto. Los niveles de expresión génica fueron calculados por el método comparativo de ciclo umbral (Ct)  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (donde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ referencia}$ ). La eficiencia de amplificación estuvo en el rango de 95-100% para todos los genes estudiados. Los niveles de expresión en cada grupo fueron normalizados al control y fue representada como veces de cambio <sup>440</sup>.

### *Inyección cigótica de ARN*

El ARN fue extraído de un pool proveniente del esperma de machos (n=9 para Control, 10MTX y 50MTX) y corrido en un gel denaturante de poliacrilamida (15%, 7M Urea). Los ARNs que se encontraban entre los 20-50nt y 50-90nt fueron cortados y



recuperados del gel usando ZR small-RNA™ PAGE Recovery Kit (Zymo Research) siguiendo las indicaciones del fabricante. Huevos fertilizados (provenientes de parejas wild type) fueron inyectados en el estadio de 1 célula con 45.1pg de ARN purificado de 20-50nt, 50-90nt o una combinación de ambos (20-90nt). Después de esto, los cigotos inyectados fueron transferidos a una placa Petri que contenía medio embrionario y se les dejó crecer hasta los 3 días post eclosión. Los embriones fueron monitoreados cada día y la tinción con alcian blue se realizó para las larvas de manera similar a como se mencionó previamente. Las larvas teñidas fueron analizadas como previamente se describió.

## V.- RELEVANCIA DEL ESTUDIO

El folato es una vitamina que ha sido ampliamente estudiada debido a los defectos generados ante su deficiencia. Sin embargo, los mecanismos involucrados en la generación de los defectos asociados a la carencia de folato aún no han sido comprendidos completamente. En ese sentido, los estudios básicos son una fuente invaluable de conocimiento para poder comprender el rol funcional de esta vitamina.

Esta tesis resalta la importancia que tiene el folato en la regulación epigenética del desarrollo de la cresta neural, cuyos derivados orofaciales son altamente afectados. Además, demostramos que la eficiencia de folato es capaz de generar un cambio en los destinos celulares a través de la alteración de la metilación en regiones genómicas específicas en etapas tempranas del desarrollo embrionario. Todos estos resultados permiten comprender que durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario las células son susceptibles a sufrir un cambio de sus destinos ante la presencia de niveles subóptimos de folato, lo que finalmente conlleva a defectos en estructuras derivadas de la cresta neural.

Por otro lado, los defectos congénitos asociados al folato han sido relacionados con la salud de la madre y el rol del padre ha sido poco estudiado. En ese sentido, nuestro estudio es uno de los primero en demostrar que la exposición a metotrexato, un potente antagonista del folato puede generar la aparición de defectos congénitos a través de mecanismos epitranscriptómicos. Considerando que el metotrexato es una droga ampliamente utilizada para el tratamiento de diferentes enfermedades, nuestro estudio pone en evidencia el efecto intergeneracional del metotrexato a través del padre. Con esta premisa, resaltamos la importancia que tiene la salud nutricional paterna en el desarrollo de la descendencia, así como la necesidad de profundizar los estudios para establecer pautas clínicas para hombres que estén siendo tratados con el metotrexato y deseen tener hijos.

## VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bohnsack, B. L. & Hirschi, K. K. NUTRIENT REGULATION OF CELL CYCLE PROGRESSION. *Annu Rev Nutr* (2004) doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073203.
2. Ratnam, M., Marquardt, H., Duhring, J. L. & Freisheim, J. H. Homologous Membrane Folate Binding Proteins in Human Placenta: Cloning and Sequence of a cDNA. *Biochemistry* **28**, (1989).
3. Kur, E., Mecklenburg, N., Cabrera, R. M., Willnow, T. E. & Hammes, A. LRP2 mediates folate uptake in the developing neural tube. *J Cell Sci* (2014) doi:10.1242/jcs.140145.
4. Zhao, R., Matherly, L. H. & Goldman, I. D. Membrane transporters and folate homeostasis: Intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Reviews in Molecular Medicine* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1017/S1462399409000969> (2009).
5. Antony, A. C. & Hansen, D. K. Hypothesis: Folate-responsive neural tube defects and neurocristopathies. *Teratology* (2000) doi:10.1002/1096-9926(200007)62:1<42::AID-TERA9>3.0.CO;2-U.
6. Beaudin, A. E. & Stover, P. J. Folate-mediated one-carbon metabolism and neural tube defects: Balancing genome synthesis and gene expression. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* Preprint at <https://doi.org/10.1002/bdrc.20100> (2007).
7. Blom, H. J., Shaw, G. M., Den Heijer, M. & Finnell, R. H. Neural tube defects and folate: Case far from closed. *Nature Reviews Neuroscience* Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrn1986> (2006).
8. Li, J., Shi, Y., Sun, J., Zhang, Y. & Mao, B. Xenopus reduced folate carrier regulates neural crest development epigenetically. *PLoS One* **6**, (2011).
9. Finnell, R. H. *et al.* Neural tube and craniofacial defects with special emphasis on folate pathway genes. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* Preprint at <https://doi.org/10.1177/10454411980090010201> (1998).
10. Benish, B. M. Letter: 'The neurocristopathies: a unifying concept of disease arising in neural crest development'. *Hum Pathol* **6**, (1975).
11. Bolande, R. P. Neurocristopathy: Its growth and development in 20 years. *Pediatric Pathology and Laboratory Medicine* **17**, (1997).
12. Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H. & De Robertis, E. M. Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in Xenopus. *Nature* **376**, (1995).
13. Sadler, T. W. Embryology of neural tube development. in *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics* vol. 135 C (2005).
14. Colas, J. F. & Schoenwolf, G. C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental Dynamics* vol. 221 Preprint at <https://doi.org/10.1002/dvdy.1144> (2001).
15. Groves, A. K. & LaBonne, C. Setting appropriate boundaries: Fate, patterning and competence at the neural plate border. *Dev Biol* (2014) doi:10.1016/j.ydbio.2013.11.027.

16. Nieto, M. A. The early steps of neural crest development. *Mechanisms of Development* Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00394-X](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00394-X) (2001).
17. Khudyakov, J. & Bronner-Fraser, M. Comprehensive spatiotemporal analysis of early chick neural crest network genes. *Developmental Dynamics* (2009) doi:10.1002/dvdy.21881.
18. Hall, B. K. The neural crest and neural crest cells: Discovery and significance for theories of embryonic organization. *Journal of Biosciences* Preprint at <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0098-4> (2008).
19. Hall, B. K. The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evolution and Development* vol. 2 Preprint at <https://doi.org/10.1046/j.1525-142X.2000.00032.x> (2000).
20. Crider, K. S., Yang, T. P., Berry, R. J. & Bailey, L. B. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. *Advances in Nutrition* (2012) doi:10.3945/an.111.000992.
21. Bouzas, S. O. *et al.* Epigenetic activation of Sox2 gene in the developing vertebrate neural plate. *Mol Biol Cell* **27**, (2016).
22. Hu, N., Strobl-Mazzulla, P., Sauka-Spengler, T. & Bronner, M. E. DNA methyltransferase3A as a molecular switch mediating the neural tube-to-neural crest fate transition. *Genes Dev* (2012) doi:10.1101/gad.198747.112.
23. Hu, N., Strobl-Mazzulla, P. H., Simoes-Costa, M., Sánchez-Vásquez, E. & Bronner, M. E. DNA methyltransferase 3B regulates duration of neural crest production via repression of Sox10. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, (2014).
24. Strobl-Mazzulla, P. H. & Bronner, M. E. A PHD12-Snail2 repressive complex epigenetically mediates neural crest epithelial-to-mesenchymal transition. *Journal of Cell Biology* (2012) doi:10.1083/jcb.201203098.
25. Strobl-Mazzulla, P. H., Marini, M. & Buzzi, A. Epigenetic landscape and miRNA involvement during neural crest development. *Developmental Dynamics* (2012) doi:10.1002/dvdy.23868.
26. Strobl-Mazzulla, P. H., Sauka-Spengler, T. & Bronner-Fraser, M. Histone demethylase JmjD2A regulates neural crest specification. *Dev Cell* (2010) doi:10.1016/j.devcel.2010.08.009.
27. Chen, J. *et al.* Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nat Genet* (2013) doi:10.1038/ng.2807.
28. Hore, T. A. *et al.* Retinol and ascorbate drive erasure of Epigenetic memory and enhance reprogramming to naïve pluripotency by complementary mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2016) doi:10.1073/pnas.1608679113.
29. Hore, T. A. Modulating epigenetic memory through vitamins and TET: Implications for regenerative medicine and cancer treatment. *Epigenomics* (2017) doi:10.2217/epi-2017-0021.
30. Yu, X. X. *et al.* Ascorbic acid induces global epigenetic reprogramming to promote meiotic maturation and developmental competence of porcine oocytes. *Sci Rep* (2018) doi:10.1038/s41598-018-24395-y.

31. Rulands, S. *et al.* Genome-Scale Oscillations in DNA Methylation during Exit from Pluripotency. *Cell Syst* **7**, (2018).
32. Maldonado, E. *et al.* Tongue abnormalities are associated to a maternal folic acid deficient diet in mice. *Nutrients* **10**, (2018).
33. Maldonado, E. *et al.* Craniofacial structure alterations of foetuses from folic acid deficient pregnant mice. *Annals of Anatomy* **218**, (2018).
34. Kim, J. *et al.* The Association between Maternal Folate Status and Childhood Obesity-Systematic Review and Meta-Analysis. *Exercise Science* vol. 31 Preprint at <https://doi.org/10.15857/ksep.2022.00129> (2022).
35. Caffrey, A., McNulty, H., Irwin, R. E., Walsh, C. P. & Pentieva, K. Maternal folate nutrition and offspring health: Evidence and current controversies. in *Proceedings of the Nutrition Society* vol. 78 (2019).
36. Hoek, J., Steegers-Theunissen, R. P. M., Willemsen, S. P. & Schoenmakers, S. Paternal Folate Status and Sperm Quality, Pregnancy Outcomes, and Epigenetics: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecular Nutrition and Food Research* vol. 64 Preprint at <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900696> (2020).
37. Winter, R. W. *et al.* Birth outcomes after preconception paternal exposure to methotrexate: A nationwide cohort study. *Reproductive Toxicology* **74**, (2017).
38. Daxinger, L. & Whitelaw, E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nature Reviews Genetics* Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg3188> (2012).
39. Rechavi, O. *et al.* Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*. *Cell* (2014) doi:10.1016/j.cell.2014.06.020.
40. Carone, B. R. *et al.* Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* (2010) doi:10.1016/j.cell.2010.12.008.
41. Fullston, T. *et al.* Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB Journal* (2013) doi:10.1096/fj.12-224048.
42. Grandjean, V. *et al.* RNA-mediated paternal heredity of diet-induced obesity and metabolic disorders. *Sci Rep* (2015) doi:10.1038/srep18193.
43. Huypens, P. *et al.* Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. *Nat Genet* (2016) doi:10.1038/ng.3527.
44. Ng, S. F. *et al.* Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$  2-cell dysfunction in female rat offspring. *Nature* (2010) doi:10.1038/nature09491.
45. Rodgers, A. B., Morgan, C. P., Bronson, S. L., Revello, S. & Bale, T. L. Paternal stress exposure alters sperm MicroRNA content and reprograms offspring HPA stress axis regulation. *Journal of Neuroscience* (2013) doi:10.1523/JNEUROSCI.0914-13.2013.

46. Rodgers, A. B., Morgan, C. P., Leu, N. A. & Bale, T. L. Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015) doi:10.1073/pnas.1508347112.
47. Wu, L. *et al.* Paternal Psychological Stress Reprograms Hepatic Gluconeogenesis in Offspring. *Cell Metab* (2016) doi:10.1016/j.cmet.2016.01.014.
48. Rando, O. J. Daddy issues: Paternal effects on phenotype. *Cell Preprint* at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.020> (2012).
49. Chen, Q., Yan, W. & Duan, E. Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nature Reviews Genetics* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.106> (2016).
50. Zhang, Y., Shi, J., Rassoulzadegan, M., Tuorto, F. & Chen, Q. Sperm RNA code programmes the metabolic health of offspring. *Nat Rev Endocrinol* **15**, (2019).
51. Feng, S., Jacobsen, S. E. & Reik, W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science Preprint* at <https://doi.org/10.1126/science.1190614> (2010).
52. Jodar, M., Selvaraju, S., Sendler, E., Diamond, M. P. & Krawetz, S. A. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Hum Reprod Update* (2013) doi:10.1093/humupd/dmt031.
53. Holoch, D. & Moazed, D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics* Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg3863> (2015).
54. Chen, Q. *et al.* Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder. *Science* (1979) (2016) doi:10.1126/science.aad7977.
55. Donkin, I. *et al.* Obesity and bariatric surgery drive epigenetic variation of spermatozoa in humans. *Cell Metab* (2016) doi:10.1016/j.cmet.2015.11.004.
56. Zhang, Y. *et al.* Dnmt2 mediates intergenerational transmission of paternally acquired metabolic disorders through sperm small non-coding RNAs. *Nat Cell Biol* **20**, (2018).
57. Gapp, K. *et al.* Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat Neurosci* (2014) doi:10.1038/nn.3695.
58. Li, S. & Mason, C. E. The pivotal regulatory landscape of RNA modifications. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **15**, (2014).
59. Frye, M., Jaffrey, S. R., Pan, T., Rechavi, G. & Suzuki, T. RNA modifications: What have we learned and where are we headed? *Nature Reviews Genetics* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.47> (2016).
60. Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N. & Tavazoie, S. F. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* (2015) doi:10.1038/nature14281.
61. Tuorto, F. *et al.* RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat Struct Mol Biol* **19**, (2012).
62. Blanco, S. *et al.* Aberrant methylation of tRNA links cellular stress to neuro-developmental disorders. *EMBO J* (2014) doi:10.15252/embj.201489282.

63. Schaefer, M. *et al.* RNA methylation by Dnmt2 protects transfer RNAs against stress-induced cleavage. *Genes Dev* **24**, (2010).
64. Medeiros, D. M. The evolution of the neural crest: new perspectives from lamprey and invertebrate neural crest-like cells. *WIREs Developmental Biology* **2**, 1–15 (2013).
65. Prasad, M. S., Charney, R. M. & García-Castro, M. I. Specification and formation of the neural crest: Perspectives on lineage segregation. *Genesis* vol. 57 Preprint at <https://doi.org/10.1002/dvg.23276> (2019).
66. Simões-Costa, M. & Bronner, M. E. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development (Cambridge, England)* Preprint at <https://doi.org/10.1242/dev.105445> (2015).
67. Sauka-Spengler, T. & Bronner-Fraser, M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm2428> (2008).
68. Betancur, P., Bronner-Fraser, M. & Sauka-Spengler, T. Assembling Neural Crest Regulatory Circuits into a Gene Regulatory Network. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2010) doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113245.
69. Williams, R. M. *et al.* Reconstruction of the Global Neural Crest Gene Regulatory Network In Vivo. *Dev Cell* **51**, (2019).
70. Prasad, M. S., Sauka-Spengler, T. & LaBonne, C. Induction of the neural crest state: Control of stem cell attributes by gene regulatory, post-transcriptional and epigenetic interactions. *Developmental Biology* vol. 366 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.03.014> (2012).
71. Williams, R. M., Lukoseviciute, M., Sauka-Spengler, T. & Bronner, M. E. Single-cell atlas of early chick development reveals gradual segregation of neural crest lineage from the neural plate border during neurulation. *Elife* **11**, (2022).
72. Albazerchi, A. & Stern, C. D. A role for the hypoblast (AVE) in the initiation of neural induction, independent of its ability to position the primitive streak. *Dev Biol* **301**, (2007).
73. Linker, C. & Stern, C. D. Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development* **131**, (2004).
74. Thomson, M. *et al.* Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* **145**, (2011).
75. Zhang, S. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells* **6**, (2014).
76. Zhao, S., Nichols, J., Smith, A. G. & Li, M. SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Molecular and Cellular Neuroscience* **27**, (2004).
77. Kinney, B. A. *et al.* Sox2 and Canonical Wnt Signaling Interact to Activate a Developmental Checkpoint Coordinating Morphogenesis with Mesoderm Fate Acquisition. *Cell Rep* **33**, (2020).
78. Wilson, S. I., Graziano, E., Harland, R., Jessell, T. M. & Edlund, T. An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. *Current Biology* **10**, (2000).

79. Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuriyama, S. & Mayor, R. Differential requirements of BMP and Wnt signalling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development* **136**, (2009).
80. Meulemans, D. & Bronner-Fraser, M. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Developmental Cell* Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.08.007> (2004).
81. van der Spuy, M., Wang, J. X., Kociszewska, D. & White, M. D. The cellular dynamics of neural tube formation. *Biochem Soc Trans* **51**, 343–352 (2023).
82. Blom, H. J. Folic acid, methylation and neural tube closure in humans. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology* vol. 85 Preprint at <https://doi.org/10.1002/bdra.20581> (2009).
83. Trevers, K. E. *et al.* A gene regulatory network for neural induction. *Elife* **12**, (2023).
84. Nikolopoulou, E., Galea, G. L., Rolo, A., Greene, N. D. E. & Copp, A. J. Neural tube closure: Cellular, molecular and biomechanical mechanisms. *Development (Cambridge)* vol. 144 Preprint at <https://doi.org/10.1242/dev.145904> (2017).
85. Hartenstein, V. & Wodarz, A. Initial neurogenesis in Drosophila. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* vol. 2 Preprint at <https://doi.org/10.1002/wdev.111> (2013).
86. Schoenwolf, G. C. Contributions of the chick embryo and experimental embryology to understanding the cellular mechanisms of neurulation. *International Journal of Developmental Biology* **62**, (2018).
87. Balaban, E., Teillet, M. A. & Douarin, N. L. E. Application of the quail-chick chimera system to the study of brain development and behavior. *Science (1979)* **241**, (1988).
88. Bush, K. T. *et al.* Neural tube formation in the mouse: a morphometric and computerized three-dimensional reconstruction study of the relationship between apical constriction of neuroepithelial cells and the shape of the neuroepithelium. *Anat Embryol (Berl)* **181**, (1990).
89. O’Rahilly, R. & Müller, F. Developmental stages in human embryos: Revised and new measurements. *Cells Tissues Organs* **192**, (2010).
90. Gilbert, S. F. *Developmental biology*. 8th ed. *Sinauer Associates, Inc* (2006).
91. Bae, C. J. & Saint-Jeannet, J. P. Induction and Specification of Neural Crest Cells: Extracellular Signals and Transcriptional Switches. in *Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease* (2014). doi:10.1016/B978-0-12-401730-6.00002-8.
92. Sauka-Spengler, T., Meulemans, D., Jones, M. & Bronner-Fraser, M. Ancient Evolutionary Origin of the Neural Crest Gene Regulatory Network. *Dev Cell* **13**, (2007).
93. Rothstein, M. & Simoes-Costa, M. Heterodimerization of TFAP2 pioneer factors drives epigenomic remodeling during neural crest specification. *Genome Res* **30**, (2020).
94. Rogers, C. D., Jayasena, C. S., Nie, S. & Bronner, M. E. Neural crest specification: Tissues, signals, and transcription factors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* vol. 1 Preprint at <https://doi.org/10.1002/wdev.8> (2012).
95. Smith, J. L. & Schoenwolf, G. C. Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation. *Journal of Experimental Zoology* **250**, (1989).



96. Hackett, D. A., Smith, J. L. & Schoenwolf, G. C. Epidermal ectoderm is required for full elevation and for convergence during bending of the avian neural plate. *Developmental Dynamics* **210**, (1997).
97. Ybot-Gonzalez, P., Cogram, P., Gerrelli, D. & Copp, A. J. Sonic hedgehog and the molecular regulation of mouse neural tube closure. *Development* **129**, (2002).
98. Lawson, A. & Schoenwolf, G. C. Neurulation. in *Encyclopedia of Neuroscience* (ed. Squire, L. R.) 1107–1113 (Academic Press, 2009). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.01081-0>.
99. Schoenwolf, G. C. Cell movements driving neurulation in avian embryos. *Development* **113**, 157–168 (1991).
100. Shimokita, E. & Takahashi, Y. Secondary neurulation: Fate-mapping and gene manipulation of the neural tube in tail bud. *Dev Growth Differ* **53**, (2011).
101. Zaganjor, I. *et al.* Describing the prevalence of neural tube defects worldwide: A systematic literature review. *PLoS One* **11**, (2016).
102. Mitchell, L. E. Epidemiology of neural tube defects. in *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics* vol. 135 C (2005).
103. Sánchez-Vásquez, E., Bronner, M. E. & Strobl-Mazzulla, P. H. Epigenetic inactivation of mir-203 as a key step in neural crest epithelial-to-mesenchymal transition. *Development (Cambridge)* **146**, (2019).
104. Theveneau, E. & Mayor, R. Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology* vol. 366 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.12.041> (2012).
105. Burstyn-Cohen, T. & Kalcheim, C. Association between the cell cycle and neural crest delamination through specific regulation of G1/S transition. *Dev Cell* **3**, (2002).
106. Betancur, P., Bronner-Fraser, M. & Sauka-Spengler, T. Genomic code for Sox10 activation reveals a key regulatory enhancer for cranial neural crest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, (2010).
107. Carmona-Fontaine, C. *et al.* Complement Fragment C3a Controls Mutual Cell Attraction during Collective Cell Migration. *Dev Cell* **21**, (2011).
108. Carmona-Fontaine, C. *et al.* Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature* **456**, (2008).
109. Richardson, J. *et al.* Leader Cells Define Directionality of Trunk, but Not Cranial, Neural Crest Cell Migration. *Cell Rep* **15**, (2016).
110. Theveneau, E. & Mayor, R. Neural Crest Cell Migration: Guidance, Pathways, and Cell-Cell Interactions. in *Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease* (2014). doi:10.1016/B978-0-12-401730-6.00004-1.
111. Dash, S. & Trainor, P. A. The development, patterning and evolution of neural crest cell differentiation into cartilage and bone. *Bone* **137**, 115409 (2020).
112. Bhatt, S., Diaz, R. & Trainor, P. A. Signals and switches in mammalian neural crest cell differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, (2013).

113. Takahashi, Y., Sipp, D. & Enomoto, H. Tissue interactions in neural crest cell development and disease. *Science* vol. 341 Preprint at <https://doi.org/10.1126/science.1230717> (2013).
114. Martik, M. L. & Bronner, M. E. Riding the crest to get a head: neural crest evolution in vertebrates. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00503-2> (2021).
115. Noden, D. M. The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev Biol* **96**, (1983).
116. Couly, G., Grapin-Botton, A., Coltey, P., Ruhin, B. & Le Douarin, N. M. Determination of the identity of the derivatives of the cephalic neural crest: Incompatibility between Hox gene expression and lower jaw development. *Development* **125**, (1998).
117. Kirby, M. L. & Waldo, K. L. Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation* vol. 82 Preprint at <https://doi.org/10.1161/01.CIR.82.2.332> (1990).
118. Le Lievre, C. S. & Le Douarin, N. M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* **34**, (1975).
119. Schlosser, G. Do vertebrate neural crest and cranial placodes have a common evolutionary origin? *BioEssays* vol. 30 Preprint at <https://doi.org/10.1002/bies.20775> (2008).
120. Watt, K. E. N. & Trainor, P. A. Neurocristopathies. The Etiology and Pathogenesis of Disorders Arising from Defects in Neural Crest Cell Development. in *Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease* (2014). doi:10.1016/B978-0-12-401730-6.00018-1.
121. Vega-Lopez, G. A., Cerrizuela, S., Tribulo, C. & Aybar, M. J. Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery. *Developmental Biology* vol. 444 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.05.013> (2018).
122. Lipton, J. M. & Ellis, S. R. Diamond-Blackfan Anemia: Diagnosis, Treatment, and Molecular Pathogenesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.01.004> (2009).
123. Gurney, J. G. *et al.* Infant cancer in the U.S.: Histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *J Pediatr Hematol Oncol* **19**, (1997).
124. Miller, A. J. & Mihm, M. C. mechanisms of disease Melanoma. *The new england journal of medicine* (2006).
125. Twigg, S. R. F. & Wilkie, A. O. M. A Genetic-Pathophysiological Framework for Craniosynostosis. *American Journal of Human Genetics* vol. 97 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.07.006> (2015).
126. Bohnsack, B. L. & Hirschi, K. K. NUTRIENT REGULATION OF CELL CYCLE PROGRESSION. *Annu Rev Nutr* (2004) doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073203.
127. Duthie, S. J., Narayanan, S., Brand, G. M., Pirie, L. & Grant, G. Impact of Folate Deficiency on DNA Stability. *J Nutr* **132**, 2444S-2449S (2002).

128. Alam, C., Kondo, M., O'Connor, D. L. & Bendayan, R. Clinical Implications of Folate Transport in the Central Nervous System. *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 41 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.02.004> (2020).
129. Schaevitz, L., Berger-Sweeney, J. & Ricceri, L. One-carbon metabolism in neurodevelopmental disorders: Using broad-based nutraceuticals to treat cognitive deficits in complex spectrum disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 46 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.04.007> (2014).
130. Lyon, P., Strippoli, V., Fang, B. & Cimmino, L. B vitamins and one-carbon metabolism: Implications in human health and disease. *Nutrients* **12**, (2020).
131. Grillo, M. A. & Colombatto, S. S-adenosylmethionine and its products. *Amino Acids* vol. 34 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0500-9> (2008).
132. Menezo, Y., Elder, K., Clement, A. & Clement, P. Folic Acid, Folinic Acid, 5 Methyl TetraHydroFolate Supplementation for Mutations That Affect Epigenesis through the Folate and One-Carbon Cycles. *Biomolecules* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom12020197> (2022).
133. Bailey, S. W. & Ayling, J. E. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, (2009).
134. Lee, M. S. *et al.* Disruption of the folate pathway in zebrafish causes developmental defects. *BMC Dev Biol* (2012) doi:10.1186/1471-213X-12-12.
135. Zhao, R., Diop-Bove, N., Visentin, M. & Goldman, I. D. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu Rev Nutr* **31**, (2011).
136. Desai, A., Sequeira, J. M. & Quadros, E. V. The metabolic basis for developmental disorders due to defective folate transport. *Biochimie* vol. 126 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.02.012> (2016).
137. Birn, H., Spiegelstein, O., Christensen, E. I. & Finnell, R. H. Renal tubular reabsorption of folate mediated by folate binding protein 1. *Journal of the American Society of Nephrology* **16**, (2005).
138. Grapp, M. *et al.* Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. *Nat Commun* **4**, (2013).
139. Zhao, R. & Goldman, I. D. Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and folate receptors. *Molecular Aspects of Medicine* vol. 34 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.006> (2013).
140. Iskandar, B. J. *et al.* Folate regulation of axonal regeneration in the rodent central nervous system through DNA methylation. *Journal of Clinical Investigation* (2010) doi:10.1172/JCI40000.
141. Frigerio, B. *et al.* Folate receptors and transporters: Biological role and diagnostic/therapeutic targets in cancer and other diseases. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **38**, (2019).
142. Radziejewska, A. & Chmurzynska, A. Folate and choline absorption and uptake: Their role in fetal development. *Biochimie* vol. 158 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.12.002> (2019).

143. Smithells, R. W., Sheppard, S. & Schorah, C. J. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Child* **51**, (1976).
144. Prevention of neural tube defects: Results of the Medical Research Council Vitamin Study. *The Lancet* **338**, (1991).
145. Copp, A. J., Stanier, P. & Greene, N. D. E. Neural tube defects: Recent advances, unsolved questions, and controversies. *The Lancet Neurology* vol. 12 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70110-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70110-8) (2013).
146. Czeizel, A. E., Dudás, I., Vereczkey, A. & Bánhidly, F. Folate deficiency and folic acid supplementation: The prevention of neural-tube defects and congenital heart defects. *Nutrients* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.3390/nu5114760> (2013).
147. Czeizel, A. E. & Dudás, I. Prevention of the First Occurrence of Neural-Tube Defects by Periconceptional Vitamin Supplementation. *New England Journal of Medicine* **327**, (1992).
148. Czeizel, A. E., Dudás, I., Paput, L. & Bánhidly, F. Prevention of neural-tube defects with periconceptional folic acid, methylfolate, or multivitamins? *Annals of Nutrition and Metabolism* vol. 58 Preprint at <https://doi.org/10.1159/000330776> (2011).
149. Mossey, P. Epidemiology underpinning research in the aetiology of orofacial clefts. *Orthod Craniofac Res* **10**, (2007).
150. Mossey, P. A., Little, J., Munger, R. G., Dixon, M. J. & Shaw, W. C. Cleft lip and palate. *The Lancet* **374**, 1773–1785 (2009).
151. Avagliano, L. *et al.* Overview on neural tube defects: From development to physical characteristics. *Birth Defects Research* vol. 111 Preprint at <https://doi.org/10.1002/bdr2.1380> (2019).
152. Cheng, Z., Gu, R., Lian, Z. & Gu, H. F. Evaluation of the association between maternal folic acid supplementation and the risk of congenital heart disease: a systematic review and meta-analysis. *Nutr J* **21**, (2022).
153. Dixon, M. J., Marazita, M. L., Beaty, T. H. & Murray, J. C. Cleft lip and palate: Understanding genetic and environmental influences. *Nature Reviews Genetics* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg2933> (2011).
154. Lie, R. T. *et al.* Maternal smoking and oral clefts the role of detoxification pathway genes. *Epidemiology* **19**, (2008).
155. Burgoon, J. M., Selhub, J., Nadeau, M. & Sadler, T. W. Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. *Teratology* **65**, (2002).
156. Croen, L. A., Shaw, G. M., Wasserman, C. R. & Tolarová, M. M. Racial and ethnic variations in the prevalence of orofacial clefts in California, 1983–1992. *Am J Med Genet* **79**, 42–47 (1998).
157. Leslie, E. J. & Marazita, M. L. Genetics of cleft lip and cleft palate. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **163**, (2013).
158. Van Rooij, I. A. L. M. *et al.* Periconceptional folate intake by supplement and food reduces the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Prev Med (Baltim)* **39**, (2004).

159. Wilcox, A. J. *et al.* Folic acid supplements and risk of facial clefts: National population based case-control study. *Br Med J* **334**, (2007).
160. Fazzari, M. J. & Grealley, J. M. Introduction to epigenomics and epigenome-wide analysis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 620 Preprint at [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-580-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-580-4_7) (2010).
161. Suzuki, M. M. & Bird, A. DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg2341> (2008).
162. Kundu, S. & Peterson, C. L. Role of chromatin states in transcriptional memory. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* vol. 1790 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.02.009> (2009).
163. Ba, Y. *et al.* Relationship of folate, vitamin B12 and methylation of insulin-like growth factor-II in maternal and cord blood. *Eur J Clin Nutr* **65**, (2011).
164. Kim, J. K., Samaranyake, M. & Pradhan, S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 66 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8432-4> (2009).
165. Goldberg, A. D., Allis, C. D. & Bernstein, E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* vol. 128 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006> (2007).
166. Law, J. A. & Jacobsen, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg2719> (2010).
167. Ramsahoye, B. H. *et al.* Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, (2000).
168. Lister, R. *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**, (2009).
169. Greenberg, M. V. C. & Bourc'his, D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0159-6> (2019).
170. Karpf, A. R. & Matsui, S. I. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res* **65**, (2005).
171. Chen, T. & Li, E. Structure and Function of Eukaryotic DNA Methyltransferases. *Curr Top Dev Biol* **60**, (2004).
172. Momparler, R. L. & Bovenzi, V. DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* **183**, 145–154 (2000).
173. Miranda, T. B. & Jones, P. A. DNA methylation: The nuts and bolts of repression. *Journal of Cellular Physiology* vol. 213 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jcp.21224> (2007).
174. Zhang, Y. *et al.* Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. *Nucleic Acids Res* **38**, (2010).
175. Dhayalan, A. *et al.* The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides DNA methylation. *Journal of Biological Chemistry* **285**, (2010).

176. Nady, N. *et al.* Recognition of multivalent histone states associated with heterochromatin by UHRF1 protein. *Journal of Biological Chemistry* **286**, (2011).
177. Bostick, M. *et al.* UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science (1979)* **317**, (2007).
178. Rothbart, S. B. *et al.* Multivalent histone engagement by the linked tandem tudor and PHD domains of UHRF1 is required for the epigenetic inheritance of DNA methylation. *Genes Dev* **27**, (2013).
179. Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (1979)* (2009) doi:10.1126/science.1170116.
180. Ito, S. *et al.* Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science (1979)* **333**, (2011).
181. He, Y. F. *et al.* Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science (1979)* **333**, (2011).
182. Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. CpG Islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**, (1987).
183. Jones, P. A. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg3230> (2012).
184. Chodavarapu, R. K. *et al.* Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature* **466**, (2010).
185. Shukla, S. *et al.* CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* **479**, (2011).
186. Yang, X. *et al.* Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell* **26**, (2014).
187. Varley, K. E. *et al.* Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res* **23**, (2013).
188. Feng, S. *et al.* Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, (2010).
189. Zemach, A., McDaniel, I. E., Silva, P. & Zilberman, D. Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science (1979)* **328**, (2010).
190. Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, (1999).
191. Baylin, S. B. & Jones, P. A. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, (2016).
192. Luger, K. & Hansen, J. C. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.03.006> (2005).
193. Kouzarides, T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* vol. 128 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005> (2007).
194. Allis, C. D. & Jenuwein, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59> (2016).

195. Wang, G. G. & Allis, C. D. 'Misinterpretation' of a histone mark is linked to aberrant stem cells and cancer development. *Cell Cycle* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.4161/cc.8.13.9106> (2009).
196. Jambhekar, A., Dhall, A. & Shi, Y. Roles and regulation of histone methylation in animal development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0151-1> (2019).
197. Dambacher, S., Hahn, M. & Schotta, G. Epigenetic regulation of development by histone lysine methylation. *Heredity* vol. 105 Preprint at <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.49> (2010).
198. Greer, E. L. & Shi, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* **13**, 343–357 (2012).
199. Bannister, A. J., Schneider, R. & Kouzarides, T. Histone methylation: Dynamic or static? *Cell* vol. 109 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00798-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00798-5) (2002).
200. Tsukada, Y. I. *et al.* Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* (2006) doi:10.1038/nature04433.
201. Whetstine, J. R. *et al.* Reversal of Histone Lysine Trimethylation by the JMJD2 Family of Histone Demethylases. *Cell* **125**, (2006).
202. Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C. & Cheng, X. The SET-domain protein superfamily: Protein lysine methyltransferases. *Genome Biology* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-227> (2005).
203. Jiang, S. & Mortazavi, A. Integrating ChIP-seq with other functional genomics data. *Brief Funct Genomics* **17**, (2018).
204. Ito, S., Das, N. D., Umehara, T. & Koseki, H. Factors and Mechanisms That Influence Chromatin-Mediated Enhancer–Promoter Interactions and Transcriptional Regulation. *Cancers* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers14215404> (2022).
205. Black, J. C., Van Rechem, C. & Whetstine, J. R. Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact. *Molecular Cell* vol. 48 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.006> (2012).
206. Alata Jimenez, N., Torres Pérez, S. A., Sánchez-Vásquez, E., Fernandino, J. I. & Strobl-Mazzulla, P. H. Folate deficiency prevents neural crest fate by disturbing the epigenetic Sox2 repression on the dorsal neural tube. *Dev Biol* (2018) doi:10.1016/j.ydbio.2018.08.001.
207. Qi, H. H. *et al.* Histone H4K20/H3K9 demethylase PHF8 regulates zebrafish brain and craniofacial development. *Nature* **466**, (2010).
208. Shaw, G. M., Schaffer, D., Velie, E. M., Morland, K. & Harris, J. A. Periconceptional vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* **6**, (1995).
209. Tolarova, M. PERICONCEPTIONAL SUPPLEMENTATION WITH VITAMINS AND FOLIC ACID TO PREVENT RECURRENCE OF CLEFT LIP. *The Lancet* vol. 320 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)91063-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)91063-7) (1982).
210. Murray, J. C. & Wehby, G. L. Folic acid and orofacial clefts: A review of the evidence. *Oral Diseases* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01587.x> (2010).

211. Maddox, D. M. *et al.* Reduced-folate carrier (RFC) is expressed in placenta and yolk sac, as well as in cells of the developing forebrain, hindbrain, neural tube, craniofacial region, eye, limb buds and heart. *BMC Dev Biol* **3**, (2003).
212. Zhu, H. *et al.* Differentially expressed genes in embryonic cardiac tissues of mice lacking Folr1 gene activity. *BMC Dev Biol* **7**, (2007).
213. Barber, R. C., Bennett, G. D., Greer, K. A. & Finnell, R. H. Expression patterns of folate binding proteins one and two in the developing mouse embryo. *Mol Genet Metab* **66**, (1999).
214. Saitsu, H., Ishibashi, M., Nakano, H. & Shiota, K. Spatial and temporal expression of folate-binding protein 1 (FBP 1) is closely associated with anterior neural tube closure in mice. *Developmental Dynamics* **226**, (2003).
215. Balashova, O. A., Visina, O. & Borodinsky, L. N. Folate receptor 1 is necessary for neural plate cell apical constriction during *Xenopus* neural tube formation. *Development (Cambridge)* **144**, (2017).
216. Waes, J. G. van *et al.* Embryonic development in the reduced folate carrier knockout mouse is modulated by maternal folate supplementation. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **82**, (2008).
217. Blount, B. C. *et al.* Medical Sciences Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, (1997).
218. Hamburger, V. & Hamilton, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics* **195**, (1992).
219. Wahl, S. E. *et al.* The role of folate metabolism in orofacial development and clefting. *Dev Biol* **405**, (2015).
220. Krysko, D. v., Berghe, T. vanden, Parthoens, E., D'Herde, K. & Vandenabeele, P. Chapter 16 Methods for Distinguishing Apoptotic from Necrotic Cells and Measuring Their Clearance. *Methods in Enzymology* vol. 442 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)01416-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)01416-X) (2008).
221. Hu, X. M. *et al.* Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.634690> (2021).
222. Kao, T. T. *et al.* Methotrexate-Induced Decrease in Embryonic 5-Methyl-Tetrahydrofolate Is Irreversible with Leucovorin Supplementation. *Zebrafish* **10**, (2013).
223. Zhao, J. *et al.* Influence of the antifolate drug methotrexate on the development of murine neural tube defects and genomic instability. *Journal of Applied Toxicology* **33**, (2013).
224. Hyoun, S. C., Običan, S. G. & Scialli, A. R. Teratogen update: Methotrexate. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **94**, (2012).
225. Scaglione, F. & Panzavolta, G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica* vol. 44 Preprint at <https://doi.org/10.3109/00498254.2013.845705> (2014).
226. Zhao, R. *et al.* Rescue of Embryonic Lethality in Reduced Folate Carrier-deficient Mice by Maternal Folic Acid Supplementation Reveals Early Neonatal Failure of Hematopoietic Organs. *Journal of Biological Chemistry* **276**, (2001).



227. Choi, S. W. & Friso, S. Interactions between folate and aging for carcinogenesis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* vol. 43 Preprint at <https://doi.org/10.1515/CCLM.2005.200> (2005).
228. Pufulete, M. *et al.* Influence of folate status on genomic DNA methylation in colonic mucosa of subjects without colorectal adenoma or cancer. *Br J Cancer* **92**, (2005).
229. Rampersaud, G. C., Kauwell, G. P. A., Hutson, A. D., Cerda, J. J. & Bailey, L. B. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *American Journal of Clinical Nutrition* **72**, (2000).
230. Momb, J. *et al.* Deletion of *Mthfd1l* causes embryonic lethality and neural tube and craniofacial defects in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, (2013).
231. Tang, L. S., Santillano, D. R., Wlodarczyk, B. J., Miranda, R. C. & Finnell, R. H. Role of *Folbp1* in the regional regulation of apoptosis and cell proliferation in the developing neural tube and craniofacies. in *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics* vol. 135 C (2005).
232. Basch, M. L., Bronner-Fraser, M. & García-Castro, M. I. Specification of the neural crest occurs during gastrulation and requires *Pax7*. *Nature* **441**, (2006).
233. Murdoch, B., DelConte, C. & García-Castro, M. I. *Pax7* lineage contributions to the mammalian neural crest. *PLoS One* **7**, (2012).
234. Milet, C., MacZkowiak, F., Roche, D. D. & Monsoro-Burq, A. H. *Pax3* and *Zic1* drive induction and differentiation of multipotent, migratory, and functional neural crest in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, (2013).
235. Wakamatsu, Y., Endo, Y., Osumi, N. & Weston, J. A. Multiple Roles of *SOX2*, an HMG-Box Transcription Factor in Avian Neural Crest Development. *Developmental Dynamics* **229**, (2004).
236. Xi, J. *et al.* *Mir-29b* Mediates the Neural Tube versus Neural Crest Fate Decision during Embryonic Stem Cell Neural Differentiation. *Stem Cell Reports* **9**, (2017).
237. Roellig, D., Tan-Cabugao, J., Esaian, S. & Bronner, M. E. Dynamic transcriptional signature and cell fate analysis reveals plasticity of individual neural plate border cells. *Elife* (2017) doi:10.7554/eLife.21620.
238. Thawani, A. & Groves, A. K. Building the Border: Development of the Chordate Neural Plate Border Region and Its Derivatives. *Frontiers in Physiology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.608880> (2020).
239. Fernández-Garre, P., Rodríguez-Gallardo, L., Gallego-Díaz, V., Álvarez, I. S. & Puelles, L. Fate map of the chicken neural plate at stage 4. *Development* **129**, (2002).
240. Rex, M. *et al.* Dynamic expression of chicken *Sox2* and *Sox3* genes in ectoderm induced to form neural tissue. *Developmental Dynamics* **209**, (1997).
241. Sanchez-Arrones, L., Stern, C. D., Bovolenta, P. & Puelles, L. Sharpening of the anterior neural border in the chick by rostral endoderm signalling. *Development* **139**, (2012).
242. Streit, A. *et al.* Preventing the loss of competence for neural induction: HGF/SF, *L5* and *Sox-2*. *Development* **124**, (1997).

243. Streit, A. The preplacodal region: An ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. *International Journal of Developmental Biology* vol. 51 Preprint at <https://doi.org/10.1387/ijdb.072327as> (2007).
244. Patthey, C. & Gunhaga, L. Specification and regionalisation of the neural plate border. *European Journal of Neuroscience* Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07871.x> (2011).
245. Saint-Jeannet, J. P. & Moody, S. A. Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities. *Dev Biol* **389**, (2014).
246. Moody, S. A. & LaMantia, A. S. Transcriptional regulation of cranial sensory placode development. in *Current Topics in Developmental Biology* (2015). doi:10.1016/bs.ctdb.2014.11.009.
247. Gans, C. & Northcutt, R. G. Neural crest and the origin of vertebrates: A new head. *Science* vol. 220 Preprint at <https://doi.org/10.1126/science.220.4594.268> (1983).
248. Graham, A. & Shimeld, S. M. The origin and evolution of the ectodermal placodes. *Journal of Anatomy* vol. 222 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01506.x> (2013).
249. Basch, M. L., Selleck, M. A. J. & Bronner-Fraser, M. Timing and competence of neural crest formation. *Dev Neurosci* **22**, (2000).
250. Murdoch, B., DelCzonte, C. & García-Castro, M. I. Embryonic Pax7-expressing progenitors contribute multiple cell types to the postnatal olfactory epithelium. *Journal of Neuroscience* **30**, (2010).
251. Papanayotou, C. *et al.* A mechanism regulating the onset of Sox2 expression in the embryonic neural plate. *PLoS Biol* **6**, (2008).
252. Rogers, C. D., Ferzli, G. S. & Casey, E. S. The response of early neural genes to FGF signaling or inhibition of BMP indicate the absence of a conserved neural induction module. *BMC Developmental Biology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.1186/1471-213X-11-74> (2011).
253. Pieper, M., Ahrens, K., Rink, E., Peter, A. & Schlosser, G. Differential distribution of competence for panplacodal and neural crest induction to non-neural and neural ectoderm. *Development* **139**, 1175–1187 (2012).
254. Ohyama, T. & Groves, A. K. Expression of mouse foxi class genes in early craniofacial development. *Developmental Dynamics* **231**, (2004).
255. Uchikawa, M., Ishida, Y., Takemoto, T., Kamachi, Y. & Kondoh, H. Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev Cell* **4**, (2003).
256. Patthey, C., Edlund, T. & Gunhaga, L. Wnt-regulated temporal control of BMP exposure directs the choice between neural plate border and epidermal fate. *Development* **136**, (2009).
257. Yardley, N. & García-Castro, M. I. FGF signaling transforms non-neural ectoderm into neural crest. *Dev Biol* **372**, (2012).
258. Prasad, M. S. *et al.* Blastula stage specification of avian neural crest. *Dev Biol* **458**, (2020).
259. Kwon, H. J., Bhat, N., Sweet, E. M., Cornell, R. A. & Riley, B. B. Identification of early requirements for preplacodal ectoderm and sensory organ development. *PLoS Genet* **6**, (2010).

260. Grocott, T., Tambalo, M. & Streit, A. The peripheral sensory nervous system in the vertebrate head: A gene regulatory perspective. *Developmental Biology* vol. 370 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.06.028> (2012).
261. Thiery, A. *et al.* A gradient border model for cell fate decisions at the neural plate border. *bioRxiv* (2022).
262. Chen, J. & Streit, A. Induction of the inner ear: Stepwise specification of otic fate from multipotent progenitors. *Hearing Research* vol. 297 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.11.018> (2013).
263. Ezin, A. M., Fraser, S. E. & Bronner-Fraser, M. Fate map and morphogenesis of presumptive neural crest and dorsal neural tube. *Dev Biol* **330**, (2009).
264. Xu, P. *et al.* Fox proteins are modular competency factors for facial cartilage and tooth specification. *Development (Cambridge)* **145**, (2018).
265. Buitrago-Delgado, E., Nordin, K., Rao, A., Geary, L. & LaBonne, C. Shared regulatory programs suggest retention of blastula-stage potential in neural crest cells. *Science (1979)* **348**, (2015).
266. Lignell, A., Kerosuo, L., Streichan, S. J., Cai, L. & Bronner, M. E. Identification of a neural crest stem cell niche by Spatial Genomic Analysis. *Nat Commun* **8**, (2017).
267. Buitrago-Delgado, E., Schock, E. N., Nordin, K. & LaBonne, C. A transition from SoxB1 to SoxE transcription factors is essential for progression from pluripotent blastula cells to neural crest cells. *Dev Biol* **444**, (2018).
268. Trevers, K. E. *et al.* Neural induction by the node and placode induction by head mesoderm share an initial state resembling neural plate border and ES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, (2017).
269. Groves, A. K. & Bronner-Fraser, M. Competence, specification and commitment in otic placode induction. *Development* **127**, (2000).
270. Smale, S. T. Pioneer factors in embryonic stem cells and differentiation. *Current Opinion in Genetics and Development* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.gde.2010.06.010> (2010).
271. Zaret, K. S. & Carroll, J. S. Pioneer transcription factors: Establishing competence for gene expression. *Genes and Development* vol. 25 Preprint at <https://doi.org/10.1101/gad.176826.111> (2011).
272. Santos, F., Hendrich, B., Reik, W. & Dean, W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* **241**, (2002).
273. Wang, L. *et al.* Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell* **157**, (2014).
274. Seisenberger, S. *et al.* The Dynamics of Genome-wide DNA Methylation Reprogramming in Mouse Primordial Germ Cells. *Mol Cell* **48**, (2012).
275. Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N. & Hanna, J. H. Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, 155–169 (2016).

276. Takahashi, S., Kobayashi, S. & Hiratani, I. Epigenetic differences between naïve and primed pluripotent stem cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 75 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2703-x> (2018).
277. Li, E., Bestor, T. H. & Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, (1992).
278. Seisenberger, S. *et al.* The Dynamics of Genome-wide DNA Methylation Reprogramming in Mouse Primordial Germ Cells. *Mol Cell* **48**, (2012).
279. Berdasco, M. & Esteller, M. DNA methylation in stem cell renewal and multipotency. *Stem Cell Research and Therapy* vol. 2 Preprint at <https://doi.org/10.1186/scrt83> (2011).
280. Blaschke, K. *et al.* Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* (2013) doi:10.1038/nature12362.
281. Jackson, M. *et al.* Severe Global DNA Hypomethylation Blocks Differentiation and Induces Histone Hyperacetylation in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol* **24**, (2004).
282. Lee, H. J., Hore, T. A. & Reik, W. Reprogramming the methylome: Erasing memory and creating diversity. *Cell Stem Cell* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.05.008> (2014).
283. Ficiz, G. *et al.* FGF signaling inhibition in ESCs drives rapid genome-wide demethylation to the epigenetic ground state of pluripotency. *Cell Stem Cell* **13**, (2013).
284. Maiti, A. & Drohat, A. C. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: Potential implications for active demethylation of CpG sites. *Journal of Biological Chemistry* **286**, (2011).
285. Zhang, L. *et al.* Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nat Chem Biol* **8**, (2012).
286. Chen, Z. *et al.* Role of Mammalian DNA Methyltransferases in Development. *Annual Review of Biochemistry* vol. 89 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-103019-102815> (2020).
287. Dai, H. Q. *et al.* TET-mediated DNA demethylation controls gastrulation by regulating Lefty-Nodal signalling. *Nature* **538**, (2016).
288. Ginno, P. A. *et al.* A genome-scale map of DNA methylation turnover identifies site-specific dependencies of DNMT and TET activity. *Nat Commun* **11**, (2020).
289. Parry, A., Rulands, S. & Reik, W. Active turnover of DNA methylation during cell fate decisions. *Nature Reviews Genetics* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00287-8> (2021).
290. Song, Y. *et al.* Dynamic Enhancer DNA Methylation as Basis for Transcriptional and Cellular Heterogeneity of ESCs. *Mol Cell* **75**, 905-920.e6 (2019).
291. Charlton, J. *et al.* TETs compete with DNMT3 activity in pluripotent cells at thousands of methylated somatic enhancers. *Nat Genet* **52**, (2020).
292. Spada, F. *et al.* Active turnover of genomic methylcytosine in pluripotent cells. *Nat Chem Biol* **16**, (2020).

293. Rulands, S. *et al.* Genome-Scale Oscillations in DNA Methylation during Exit from Pluripotency. *Cell Syst* **7**, (2018).
294. Izzo, F. *et al.* DNA methylation disruption reshapes the hematopoietic differentiation landscape. *Nat Genet* **52**, (2020).
295. Argilaguuet, J. *et al.* Systems analysis reveals complex biological processes during virus infection fate decisions. *Genome Res* **29**, (2019).
296. Endo, Y., Osumi, N. & Wakamatsu, Y. Bimodal functions of Notch-mediated signaling are involved in neural crest formation during avian ectoderm development. *Development* vol. 129 Preprint at <https://doi.org/10.1242/dev.129.4.863> (2002).
297. Glavic, A., Silva, F., Aybar, M. J., Bastidas, F. & Mayor, R. Interplay between Notch signaling and the homeoprotein Xiro1 is required for neural crest induction in *Xenopus* embryos. *Development* **131**, (2004).
298. Chang, H. *et al.* Tissue-specific distribution of aberrant DNA methylation associated with maternal low-folate status in human neural tube defects. *Journal of Nutritional Biochemistry* **22**, (2011).
299. Nagatomo, K. I. & Hashimoto, C. *Xenopus* hairy2 functions in neural crest formation by maintaining cells in a mitotic and undifferentiated state. *Developmental Dynamics* **236**, (2007).
300. Hu, M. *et al.* Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev* **11**, (1997).
301. Laslo, P. *et al.* Multilineage Transcriptional Priming and Determination of Alternate Hematopoietic Cell Fates. *Cell* (2006) doi:10.1016/j.cell.2006.06.052.
302. Olsson, A. *et al.* Single-cell analysis of mixed-lineage states leading to a binary cell fate choice. *Nature* (2016) doi:10.1038/nature19348.
303. Smith, Z. D. *et al.* A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* **484**, (2012).
304. Auclair, G., Guibert, S., Bender, A. & Weber, M. Ontogeny of CpG island methylation and specificity of DNMT3 methyltransferases during embryonic development in the mouse. *Genome Biol* **15**, (2014).
305. Wang, L. *et al.* Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell* **157**, (2014).
306. Habibi, E. *et al.* Whole-genome bisulfite sequencing of two distinct interconvertible DNA methylomes of mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **13**, (2013).
307. Leitch, H. G. *et al.* Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nat Struct Mol Biol* **20**, (2013).
308. von Meyenn, F. *et al.* Impairment of DNA Methylation Maintenance Is the Main Cause of Global Demethylation in Naive Embryonic Stem Cells. *Mol Cell* **62**, (2016).
309. Monfort, A. & Wutz, A. Breathing-in epigenetic change with vitamin C. *EMBO Rep* (2013) doi:10.1038/embor.2013.29.

310. Geng, Y. *et al.* Folate deficiency inhibits the PCP pathway and alters genomic methylation levels during embryonic development. *J Cell Physiol* **233**, (2018).
311. Guo, J. U. *et al.* Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci* **17**, (2014).
312. Price, A. J. *et al.* Divergent neuronal DNA methylation patterns across human cortical development reveal critical periods and a unique role of CpH methylation. *Genome Biol* **20**, (2019).
313. Ziller, M. J. *et al.* Genomic distribution and Inter-Sample variation of Non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet* **7**, (2011).
314. Hoyo, C. *et al.* Methylation variation at IGF2 differentially methylated regions and maternal folic acid use before and during pregnancy. *Epigenetics* **6**, (2011).
315. Steegers-Theunissen, R. P. *et al.* Periconceptional maternal folic acid use of 400 µg per day is related to increased methylation of the IGF2 gene in the very young child. *PLoS One* **4**, (2009).
316. Crider, K. S. *et al.* Genomic DNA methylation changes in response to folic acid supplementation in a population-based intervention study among women of reproductive age. *PLoS One* **6**, (2011).
317. Amarasekera, M. *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling identifies a folate-sensitive region of differential methylation upstream of ZFP57-imprinting regulator in humans. *FASEB Journal* **28**, (2014).
318. Tobi, E. W. *et al.* DNA methylation signatures link prenatal famine exposure to growth and metabolism. *Nat Commun* **5**, (2014).
319. Mahajan, A. *et al.* Effect of imbalance in folate and vitamin B12 in maternal/parental diet on global methylation and regulatory miRNAs. *Sci Rep* **9**, (2019).
320. Irwin, R. E. *et al.* A randomized controlled trial of folic acid intervention in pregnancy highlights a putative methylation-regulated control element at ZFP57. *Clin Epigenetics* **11**, (2019).
321. Joubert, B. R. *et al.* Maternal plasma folate impacts differential DNA methylation in an epigenome-wide meta-analysis of newborns. *Nat Commun* **7**, (2016).
322. Liem, K. F., Tremml, G., Roelink, H. & Jessell, T. M. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**, (1995).
323. Piacentino, M. L. & Bronner, M. E. Intracellular attenuation of BMP signaling via CKIP-1/Smurf1 is essential during neural crest induction. *PLoS Biol* **16**, (2018).
324. Kee, Y. & Bronner-Fraser, M. Id4 expression and its relationship to other Id genes during avian embryonic development. *Mech Dev* **109**, (2001).
325. Boot, M. J. *et al.* Folic acid and homocysteine affect neural crest and neuroepithelial cell outgrowth and differentiation in vitro. *Developmental Dynamics* **227**, (2003).
326. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, (2014).
327. Xi, Y. & Li, W. BSMAP: Whole genome bisulfite sequence MAPping program. *BMC Bioinformatics* **10**, (2009).

328. Jühling, F. *et al.* Metilene: Fast and sensitive calling of differentially methylated regions from bisulfite sequencing data. *Genome Res* **26**, (2016).
329. Kanehisa, M. *et al.* KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res* **36**, (2008).
330. McDonald, C. M. & Thorne-Lyman, A. L. The importance of the first 1,000 days: An epidemiological perspective. in *The Biology of the First 1,000 Days* (2017). doi:10.1201/9781315152950.
331. Ackurt, F., Wetherilt, H., Loker, M. & Hacibekiroglu, M. Biochemical assessment of nutritional status in pre- and post-natal Turkish women and outcome of pregnancy. *Eur J Clin Nutr* **49**, (1995).
332. Bailey, L. B. *et al.* Biomarkers of nutrition for development-Folate review. *Journal of Nutrition* vol. 145 Preprint at <https://doi.org/10.3945/jn.114.206599> (2015).
333. Wills, L. Treatment of “Pernicious Anaemia of Pregnancy” and “Tropical Anaemia” With Special Reference To Yeast Extract As A Curative Agent. *Br Med J* **1**, (1931).
334. Maldonado, E., Martínez-Sanz, E., Partearroyo, T., Varela-Moreiras, G. & Pérez-Miguelsanz, J. Maternal folic acid deficiency is associated to developing nasal and palate malformations in mice. *Nutrients* **13**, (2021).
335. Mossey, P. A., Clark, J. D. & Gray, D. Preliminary investigation of a modified Huddart/Bodenham scoring system for assessment of maxillary arch constriction in unilateral cleft lip and palate subjects. *Eur J Orthod* **25**, (2003).
336. Wang, X. *et al.* Maternal Folic Acid Supplementation During Pregnancy Improves Neurobehavioral Development in Rat Offspring. *Mol Neurobiol* **55**, (2018).
337. Wang, X. *et al.* Maternal Folic Acid Supplementation during Pregnancy Promotes Neurogenesis and Synaptogenesis in Neonatal Rat Offspring. *Cerebral Cortex* **29**, (2019).
338. Blencowe, H., Kancherla, V., Moorthie, S., Darlison, M. W. & Modell, B. Estimates of global and regional prevalence of neural tube defects for 2015: a systematic analysis. *Ann N Y Acad Sci* **1414**, (2018).
339. Bidondo, M. P., Liascovich, R., Barbero, P. & Groisman, B. Prevalence of neural tube defects and estimation of cases averted in the post-fortification period in Argentina. *Arch Argent Pediatr* **113**, (2015).
340. Bronberg, R., Groisman, B., Bidondo, M. P., Barbero, P. & Liascovich, R. Birth prevalence of congenital anomalies in Argentina, according to socioeconomic level. *J Community Genet* **12**, (2021).
341. Poletta, F. A. *et al.* Neural tube defects: Sex ratio changes after fortification with folic acid. *PLoS One* **13**, (2018).
342. Salari, N. *et al.* Global prevalence of cleft palate, cleft lip and cleft palate and lip: A comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg* **123**, (2022).
343. Daxinger, L. & Whitelaw, E. Transgenerational epigenetic inheritance: More questions than answers. *Genome Research* Preprint at <https://doi.org/10.1101/gr.106138.110> (2010).

344. Nohara, K., Suzuki, T. & Okamura, K. Gestational arsenic exposure and paternal intergenerational epigenetic inheritance. *Toxicol Appl Pharmacol* **409**, (2020).
345. Scholl, T. O. & Johnson, W. G. Folic acid: Influence on the outcome of pregnancy. in *American Journal of Clinical Nutrition* (2000). doi:10.1093/ajcn/71.5.1295s.
346. Sargiotto, C., Bidondo, M. P., Liascovich, R., Barbero, P. & Groisman, B. Descriptive study on neural tube defects in Argentina. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* **103**, (2015).
347. Impellizzeri, A., Giannantoni, I., Polimeni, A., Barbato, E. & Galluccio, G. Epidemiological characteristic of Orofacial clefts and its associated congenital anomalies: Retrospective study. *BMC Oral Health* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0980-5> (2019).
348. Krawetz, S. A. Paternal contribution: New insights and future challenges. *Nature Reviews Genetics* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrg1654> (2005).
349. Landman\*\*, O. E. THE INHERITANCE OF ACQUIRED CHARACTERISTICS. *Annu Rev Genet* **25**, 1–20 (1991).
350. Öst, A. *et al.* Paternal diet defines offspring chromatin state and intergenerational obesity. *Cell* **159**, (2014).
351. Dias, B. G. & Ressler, K. J. Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nat Neurosci* (2014) doi:10.1038/nn.3594.
352. Wei, Y. *et al.* Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, (2014).
353. Aarabi, M. *et al.* High-dose folic acid supplementation alters the human sperm methylome and is influenced by the MTHFR C677T polymorphism. *Hum Mol Genet* **24**, (2015).
354. Boxmeer, J. C. *et al.* Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. *Fertil Steril* **92**, (2009).
355. Wang, Y. *et al.* Reprogramming of Meiotic Chromatin Architecture during Spermatogenesis. *Mol Cell* **73**, (2019).
356. Radford, E. J. *et al.* In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. *Science (1979)* **345**, (2014).
357. Shea, J. M. *et al.* Genetic and Epigenetic Variation, but Not Diet, Shape the Sperm Methylome. *Dev Cell* **35**, 750–758 (2015).
358. Kawano, M., Kawaji, H., Grandjean, V., Kiani, J. & Rassoulzadegan, M. Novel Small Noncoding RNAs in Mouse Spermatozoa, Zygotes and Early Embryos. *PLoS One* **7**, (2012).
359. Sharma, U. *et al.* Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. *Science (1979)* **351**, (2016).
360. Sharma, U. *et al.* Small RNAs Are Trafficked from the Epididymis to Developing Mammalian Sperm. *Dev Cell* **46**, (2018).
361. Chen, X. *et al.* Early cleavage of preimplantation embryos is regulated by tRNAGln-TTG-derived small RNAs present in mature spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry* **295**, (2020).



362. Peng, H. *et al.* A novel class of tRNA-derived small RNAs extremely enriched in mature mouse sperm. *Cell Research* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.1038/cr.2012.141> (2012).
363. Surani, M. A. Breaking the germ line-soma barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**, (2016).
364. Liu, Y. A new perspective on Darwin's Pangenesis. *Biological Reviews* vol. 83 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00036.x> (2008).
365. Palmer, N. O., Bakos, H. W., Owens, J. A., Setchell, B. P. & Lane, M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **302**, E768–E780 (2012).
366. Sinclair, K. D. & Watkins, A. J. Parental diet, pregnancy outcomes and offspring health: Metabolic determinants in developing oocytes and embryos. *Reprod Fertil Dev* **26**, (2014).
367. Kumar, P., Anaya, J., Mudunuri, S. B. & Dutta, A. Meta-analysis of tRNA derived RNA fragments reveals that they are evolutionarily conserved and associate with AGO proteins to recognize specific RNA targets. *BMC Med* **12**, (2014).
368. Chen, Q., Zhang, X., Shi, J., Yan, M. & Zhou, T. Origins and evolving functionalities of tRNA-derived small RNAs. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 46 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.05.001> (2021).
369. Su, Z., Wilson, B., Kumar, P. & Dutta, A. Noncanonical Roles of tRNAs: TRNA Fragments and beyond. *Annual Review of Genetics* vol. 54 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-022620-101840> (2020).
370. Lee, Y. S., Shibata, Y., Malhotra, A. & Dutta, A. A novel class of small RNAs: tRNA-derived RNA fragments (tRFs). *Genes Dev* **23**, (2009).
371. Schimmel, P. RNA Processing and Modifications: The emerging complexity of the tRNA world: Mammalian tRNAs beyond protein synthesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.77> (2018).
372. Li, S., Xu, Z. & Sheng, J. tRNA-derived small RNA: A novel regulatory small non-coding RNA. *Genes* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/genes9050246> (2018).
373. Nechooshtan, G., Yunusov, D., Chang, K. & Gingeras, T. R. Processing by RNase 1 forms tRNA halves and distinct Y RNA fragments in the extracellular environment. *Nucleic Acids Res* **48**, 8035–8049 (2020).
374. Thompson, D. M., Lu, C., Green, P. J. & Parker, R. tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes. *RNA* **14**, (2008).
375. Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G. F. & Anderson, P. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *Journal of Cell Biology* **185**, (2009).
376. Fu, H. *et al.* Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Lett* **583**, (2009).
377. Soares, A. R. *et al.* Conserved and highly expressed tRNA derived fragments in zebrafish. *BMC Mol Biol* **16**, (2015).
378. Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P. & Anderson, P. Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Mol Cell* **43**, (2011).

379. Thompson, D. M. & Parker, R. Stressing Out over tRNA Cleavage. *Cell* vol. 138 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.001> (2009).
380. Tao, E. W., Cheng, W. Y., Li, W. L., Yu, J. & Gao, Q. Y. tiRNAs: A novel class of small noncoding RNAs that helps cells respond to stressors and plays roles in cancer progression. *Journal of Cellular Physiology* vol. 235 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jcp.29057> (2020).
381. Kuscu, C. *et al.* tRNA fragments (tRFs) guide Ago to regulate gene expression post-transcriptionally in a Dicer-independent manner. *RNA* **24**, (2018).
382. Luo, S. *et al.* Drosophila tsRNAs preferentially suppress general translation machinery via antisense pairing and participate in cellular starvation response. *Nucleic Acids Res* **46**, (2018).
383. Kim, H. K. *et al.* A transfer-RNA-derived small RNA regulates ribosome biogenesis. *Nature* **552**, (2017).
384. Fricker, R. *et al.* A tRNA half modulates translation as stress response in *Trypanosoma brucei*. *Nat Commun* **10**, (2019).
385. Boccaletto, P. *et al.* MODOMICS: A database of RNA modification pathways. 2021 update. *Nucleic Acids Res* **50**, (2022).
386. Barraud, P. & Tisné, C. To be or not to be modified: Miscellaneous aspects influencing nucleotide modifications in tRNAs. *IUBMB Life* vol. 71 Preprint at <https://doi.org/10.1002/iub.2041> (2019).
387. Lorenz, C., Lünse, C. E. & Mörl, M. Trna modifications: Impact on structure and thermal adaptation. *Biomolecules* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom7020035> (2017).
388. Motorin, Y. & Helm, M. TRNA stabilization by modified nucleotides. *Biochemistry* vol. 49 Preprint at <https://doi.org/10.1021/bi100408z> (2010).
389. El Yacoubi, B., Bailly, M. & de Crécy-Lagard, V. Biosynthesis and Function of Posttranscriptional Modifications of Transfer RNAs. *Annu Rev Genet* **46**, 69–95 (2012).
390. Hori, H. Methylated nucleosides in tRNA and tRNA methyltransferases. *Frontiers in Genetics* vol. 5 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00144> (2014).
391. Reid, R., Greene, P. J. & Santi, D. V. Exposition of a family of RNA m 5 C methyltransferases from searching genomic and proteomic sequences. *Nucleic Acids Res* **27**, 3138–3145 (1999).
392. Bohnsack, K. E., Höbartner, C. & Bohnsack, M. T. Eukaryotic 5-methylcytosine (M 5 C) RNA methyltransferases: Mechanisms, cellular functions, and links to disease. *Genes* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/genes10020102> (2019).
393. Schulz, N. K. E. *et al.* Paternal knockdown of tRNA(cytosine-5-)-methyltransferase (Dnmt2) increases offspring susceptibility to infection in red flour beetles. *Insect Mol Biol* **31**, 711–721 (2022).
394. Cronstein, B. N. The mechanism of action of methotrexate. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **23**, (1997).
395. Cronstein, B. N. & Aune, T. M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0373-9> (2020).

396. Bedoui, Y. *et al.* Methotrexate an old drug with new tricks. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms20205023> (2019).
397. Chabner, B. A. *et al.* Polyglutamation of methotrexate: Is Methotrexate a prodrug? *Journal of Clinical Investigation* vol. 76 Preprint at <https://doi.org/10.1172/JCI112088> (1985).
398. Panetta, J. C., Wall, A., Pui, C. H., Relling, M. V. & Evans, W. E. Methotrexate intracellular disposition in acute lymphoblastic leukemia: A mathematical model of  $\gamma$ -glutamyl hydrolase activity. *Clinical Cancer Research* **8**, (2002).
399. Desmoulin, S. K., Hou, Z., Gangjee, A. & Matherly, L. H. The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biology and Therapy* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.4161/cbt.22020> (2012).
400. Fiehn, C. Methotrexate transport mechanisms: The basis for targeted drug delivery and  $\beta$ -folate-receptor-specific treatment. *Clin Exp Rheumatol* **28**, (2010).
401. Hernández-Díaz, S., Werler, M. M., Walker, A. M. & Mitchell, A. A. Folic Acid Antagonists during Pregnancy and the Risk of Birth Defects. *New England Journal of Medicine* **343**, (2000).
402. Sun, S. *et al.* Effects of methotrexate on the developments of heart and vessel in zebrafish. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **41**, (2009).
403. Nguyen, G. C. *et al.* The Toronto Consensus Statements for the Management of Inflammatory Bowel Disease in Pregnancy. *Gastroenterology* **150**, (2016).
404. Beghin, D., Cournot, M. P., Vauzelle, C. & Elefant, E. Paternal exposure to methotrexate and pregnancy outcomes. *Journal of Rheumatology* **38**, (2011).
405. Grosen, A., Kelsen, J., Hvas, C. L., Bellaguarda, E. & Hanauer, S. B. The Influence of Methotrexate Treatment on Male Fertility and Pregnancy Outcome after Paternal Exposure. *Inflammatory Bowel Diseases* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000001064> (2017).
406. Eck, L. K. *et al.* Risk of adverse pregnancy outcome after paternal exposure to methotrexate within 90 days before pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* **129**, (2017).
407. Hirako, A., Takeoka, Y., Furukawa, S. & Sugiyama, A. Effects of methotrexate exposure on medaka (*Oryzias latipes*) testes. *J Toxicol Pathol* **30**, (2017).
408. Kinoshita, M., Murata, K., Naruse, K. & Tanaka, M. *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols*. *Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols* (2012). doi:10.1002/9780813818849.
409. Kirchmaier, S., Naruse, K., Wittbrodt, J. & Loosli, F. The genomic and genetic toolbox of the teleost medaka (*Oryzias latipes*). *Genetics* **199**, (2015).
410. Shima, A. & Mitani, H. Medaka as a research organism: Past, present and future. *Mechanisms of Development* vol. 121 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.03.011> (2004).
411. Hilgers, L. & Schwarzer, J. The natural history of model organisms: the untapped potential of medaka and its wild relatives. *Elife* **8**, (2019).
412. Padilla, S. *et al.* Use of Medaka in toxicity testing. *Current Protocols in Toxicology* Preprint at <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0110s39> (2009).

413. Song, X., Wang, X. & Bhandari, R. K. Developmental abnormalities and epigenetic alterations in medaka (*Oryzias latipes*) embryos induced by triclosan exposure. *Chemosphere* **261**, (2020).
414. Kasahara, M. *et al.* The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* **447**, (2007).
415. Bhandari, R. K. Medaka as a model for studying environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotypes. *Environ Epigenet* **2**, (2016).
416. Dervieux, T., Greenstein, N. & Kremer, J. Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **54**, (2006).
417. Mahadevan, U., McConnell, R. A. & Chambers, C. D. Drug Safety and Risk of Adverse Outcomes for Pregnant Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **152**, (2017).
418. Ord, J., Heath, P. R., Fazeli, A. & Watt, P. J. Paternal effects in a wild-type zebrafish implicate a role of sperm-derived small RNAs. *Mol Ecol* **29**, (2020).
419. Rashad, S. *et al.* The stress specific impact of ALKBH1 on tRNA cleavage and tiRNA generation. *RNA Biol* **17**, (2020).
420. Alexandrov, A. *et al.* Rapid tRNA decay can result from lack of nonessential modifications. *Mol Cell* **21**, (2006).
421. Mishima, E. *et al.* Conformational change in transfer RNA is an early indicator of acute cellular damage. *Journal of the American Society of Nephrology* (2014) doi:10.1681/ASN.2013091001.
422. Suzuki, T. The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 22 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00342-0> (2021).
423. Huber, S. M., Leonardi, A., Dedon, P. C. & Begley, T. J. The versatile roles of the tRNA epitranscriptome during cellular responses to toxic exposures and environmental stress. *Toxics* vol. 7 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxics7010017> (2019).
424. LoVecchio, F., Katz, K., Watts, D. & Wood, I. Four-year experience with methotrexate exposures. *J Med Toxicol* **4**, (2008).
425. Jacabacci, J., Guzzardi, M. & D'Aversa, T. G. Exogenous folic acid is not able to inhibit the effects of methotrexate on the folate pathway in zebrafish embryos. *Bios* **86**, (2015).
426. Liu, S., Narumi, R., Ikeda, N., Morita, O. & Tasaki, J. Chemical-induced craniofacial anomalies caused by disruption of neural crest cell development in a zebrafish model. *Developmental Dynamics* **249**, (2020).
427. Lambrot, R. *et al.* Low paternal dietary folate alters the mouse sperm epigenome and is associated with negative pregnancy outcomes. *Nat Commun* **4**, (2013).
428. Ly, L. *et al.* Intergenerational impact of paternal lifetime exposures to both folic acid deficiency and supplementation on reproductive outcomes and imprinted gene methylation. *Mol Hum Reprod* **23**, (2017).
429. Johnson, G. D., Mackie, P., Jodar, M., Moskovtsev, S. & Krawetz, S. A. Chromatin and extracellular vesicle associated sperm RNAs. *Nucleic Acids Res* **43**, (2015).

430. Pereira, M. *et al.* Impact of tRNA modifications and tRNA-modifying enzymes on proteostasis and human disease. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms19123738> (2018).
431. Goll, M. G. *et al.* Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* (1979) **311**, (2006).
432. Akiyama, Y. *et al.* Multiple ribonuclease A family members cleave transfer RNAs in response to stress. *bioRxiv* (2019).
433. Cho, S. & Zhang, J. Zebrafish ribonucleases are bactericidal: Implications for the origin of the vertebrate RNase a superfamily. *Mol Biol Evol* **24**, (2007).
434. Pizzo, E. *et al.* Ribonucleases and angiogenins from fish. *Journal of Biological Chemistry* **281**, (2006).
435. Kazakou, K., Holloway, D. E., Prior, S. H., Subramanian, V. & Acharya, K. R. Ribonuclease A Homologues of the Zebrafish: Polymorphism, Crystal Structures of Two Representatives and their Evolutionary Implications. *J Mol Biol* **380**, (2008).
436. Prats-Ejarque, G., Lu, L., Salazar, V. A., Moussaoui, M. & Boix, E. Evolutionary trends in RNA base selectivity within the RNase A superfamily. *Front Pharmacol* **10**, (2019).
437. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089> (2012).
438. Liberman, N. *et al.* Intergenerational hormesis is regulated by heritable 18S rRNA methylation. *bioRxiv* (2021).
439. Padilla, L. F. A. *et al.* Cystic proliferation of germline stem cells is necessary to reproductive success and normal mating behavior in Medaka. *Elife* **10**, (2021).
440. Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **25**, (2001).
441. Hovland, A. S., Rothstein, M. & Simoes-Costa, M. Network architecture and regulatory logic in neural crest development. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **12**, (2020).

## VI.- ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Desarrollo de la cresta neural _____	20
<b>Figura 2.-</b> Ciclo del folato _____	24
<b>Figura 3.-</b> Defectos orofaciales y del tubo neural _____	27
<b>Figura 4.-</b> Expresión espacial-temporal de <i>FolR1</i> y <i>Rfc1</i> durante el desarrollo neural y de la cresta neural _____	35
<b>Figura 5.-</b> Pérdida de función de <i>FolR1</i> y <i>Rfc1</i> reduce la metilación de la histona H3__	37
<b>Figura 6.-</b> Pérdida de función de <i>FolR1</i> y <i>Rfc1</i> reduce la metilación global del ADN__	39
<b>Figura 7.-</b> Eficiencia de morfolinós de splicing <i>FolR1</i> -spMO y <i>Rfc1</i> -spMO _____	41
<b>Figura 8.-</b> La pérdida de función de <i>FolR1</i> y <i>Rfc1</i> genera defectos en la formación de la cresta neural _____	42
<b>Figura 9.-</b> La pérdida de función de <i>FolR1</i> y <i>Rfc1</i> genera defectos en el desarrollo de estructuras orofaciales _____	43
<b>Figura 10.-</b> La pérdida de función de <i>FolR1</i> y <i>Rfc1</i> no genera un incremento de apoptosis _____	44
<b>Figura 11.-</b> Folato es requerido para la represión de <i>Sox2</i> en el territorio de la cresta neural _____	46
<b>Figura 12.-</b> La pérdida de función de <i>FolR1</i> y <i>Rfc1</i> cambia el destino de la cresta neural hacia uno neural en la parte dorsal del tubo _____	47
<b>Figura 13.-</b> Los transportadores de folato <i>FolR1</i> y <i>Rfc1</i> son requeridos para la metilación de <i>Sox2</i> en el territorio de la cresta neural _____	49
<b>Figura 14.-</b> Patrón ectodermal temprano en la parte anterior del epiblasto _____	56
<b>Figura 15.-</b> Dinámica de metilación del ADN _____	60
<b>Figura 16.-</b> Dinámica de la metilación del ADN y heterogeneidad celular _____	61
<b>Figura 17.-</b> Patrón de expresión espacio-temporal de los principales genes involucrados en la dinámica de metilación del ADN durante el desarrollo del borde de la placa neural _____	64

<b>Figura 18.-</b> Patrón de intensidad de las marcas 5mC y 5hmC en la PN y el BPN_____	66
<b>Figura 19.-</b> La pérdida de función de Rfc1 no altera la abundancia global de 5mC y 5hmC en la PN y BPN_____	67
<b>Figura 20.-</b> La pérdida de función de Rfc1 no altera la abundancia global de 5mC en el genoma _____	69
<b>Figura 21.-</b> La pérdida de función de Rfc1 genera Regiones Diferencialmente Metiladas (RDMs) a lo largo del genoma_____	70
<b>Figura 22.-</b> La pérdida de función de Rfc1 genera RDMs en el locus <i>Notch1</i> _____	73
<b>Figura 23.-</b> La pérdida de función de Rfc1 genera una expresión ectópica de <i>Notch1</i> y <i>Bmp4</i> _____	74
<b>Figura 24.-</b> La pérdida de función de Rfc1 incrementa la potencialidad de las células del BPN_____	76
<b>Figura 25.-</b> Esquema representativo del modelo propuesto_____	81
<b>Figura 26.-</b> Abundancia de sncRNAs durante la espermatogénesis de mamíferos_____	93
<b>Figura 27.-</b> Biogénesis de tsRNA y modificaciones postranscripcionales del tRNA_____	97
<b>Figura 28.-</b> Mecanismos de transporte del metotrexato y enzimas diana_____	99
<b>Figura 29.-</b> Exposición paterna a MTX no afecta parámetros poblacionales de la descendencia_____	102
<b>Figura 30.-</b> La exposición paterna a MTX reduce la longitud de cartílagos craneales de la descendencia_____	103
<b>Figura 31.-</b> La exposición paterna a MTX genera malformaciones en los cartílagos craneales de la descendencia_____	104
<b>Figura 32.-</b> Exposición paterna a MTX afecta los sncRNAs espermáticos_____	106
<b>Figura 33.-</b> La exposición paterna a MTX induce una expresión diferencial de específicos tRNAs_____	108
<b>Figura 34.-</b> La exposición paterna a MTX induce un clivaje específico de determinados tRNAs_____	109

<b>Figura 35.-</b> La exposición paterna a MTX induce un clivaje diferencial en los tRNAs con expresión diferencial _____	110
<b>Figura 36.-</b> La exposición paterna a MTX no afecta el clivaje de los ARNr _____	111
<b>Figura 37.-</b> La exposición paterna a MTX altera las modificaciones postranscripcionales en la fracción de tRNAs espermáticos y la expresión testicular de las metiltransferasas de ARN _____	112
<b>Figura 38.-</b> Aislamiento de las fracciones de ARN espermático e inyección cigótica ____	114
<b>Figura 39.-</b> La inyección cigótica de ARNs espermático paterno no afecta los parámetros poblacionales _____	115
<b>Figura 40.-</b> La inyección cigótica de ARN espermático del esperma de machos tratados con MTX reduce la longitud del ceratohial _____	116
<b>Figura 41.-</b> La inyección cigótica de ARN derivado del esperma de machos tratados con MTX recapitula parcialmente la deformación del ceratohial _____	116
<b>Figura 42.-</b> Modelo propuesto _____	121



Esta es la versión final de la tesis titulada: ***“Efecto Epigenético Intra e Intergeneracional de la deficiencia de ácido fólico sobre el desarrollo neural y de las células de la cresta neural embrionaria”***. Esta versión final incluye las correcciones sugeridas por los miembros del jurado y es apta para ser depositada en el repositorio de la Universidad Nacional de San Martín-UNSAM



Genet. Biotec. Nagif Alata Jimenez

Doctorando

Dr. Pablo H. Strobl-Mazzulla

Director

Dr. Juan I. Fernandino

Co-director