

**APROXIMACIÓN EPIGENÉTICA AL EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN AUDITIVA SOBRE EL
BDNF EN EL HIPOCAMPO DE RATAS WISTAR**

MARÍA MARCELA VELÁSQUEZ TOLEDO

TESIS DE GRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR:

FERNANDO CÁRDENAS

LABORATORIO DE NEUROCIENCIA Y COMPORTAMIENTO

CODIRECTORA:

MARÍA CLAUDIA LATTIG

CENTRO DE INVESTIGACIONES GENÉTICAS EN ENFERMEDADES HUMANAS (CIGEN)

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

2016

RESUMEN

Varias investigaciones han demostrado que la estimulación musical tiene efecto ansiolítico, tanto en humanos como en modelos animales y se ha reportado que dicha estimulación puede generar cambios en la expresión de algunos genes, entre ellos el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF). Este gen, cuya expresión puede modularse por factores epigenéticos, está involucrado en procesos como aprendizaje, neuroplasticidad, consolidación de memorias y regulación emocional. El objetivo del presente estudio fue determinar si la estimulación musical de alta frecuencia podría generar el mismo efecto ansiolítico en los animales y si tal efecto, en caso de existir, tendría relación con cambios epigenéticos en el BDNF, específicamente en el nivel de metilación del exón IV. Ratas machos Wistar juveniles fueron asignadas aleatoriamente a uno de cuatro grupos: control, música de alta frecuencia, música de frecuencia normal y ruido blanco. Los animales fueron expuestos a sus respectivos estímulos durante 21 días consecutivos, tras los cuales se evaluó su nivel de ansiedad a través de la prueba de laberinto en cruz elevado. Se determinó el nivel de metilación global y en cada isla CpG del exón IV del BDNF en el hipocampo de cada animal, a través de la técnica de secuenciación dependiente de bisulfito. No se hallaron diferencias en el nivel de ansiedad de los animales de los distintos grupos ni en el estado de metilación de la región de interés. Este estudio sugiere que el efecto de la música puede variar en función de su frecuencia y que no siempre es ansiolítico. Asimismo, revela que la respuesta comportamental ante la estimulación musical sí podría estar relacionada con el nivel de metilación del exón IV del BDNF, en cuanto la homogeneidad del comportamiento se reflejó en una similitud en el estado de metilación. No obstante, es preciso realizar investigaciones que evalúen otras modificaciones epigenéticas, incluyendo cambios en la estructura de la cromatina.

ABSTRACT

Behavioral effects of music in animal models and humans, including anxiety reduction has been widely studied. Reports on the musical stimulation show that the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has changes in its expression. This gene, whose expression could be modulated by epigenetic factors, is involved in several processes like learning, neuroplasticity, memory consolidation and emotional regulation. The aim of this work was to evaluate whether the high frequency musical stimulation could induce the same anxiolytic effect in rats and if such effect, if any, would be related to epigenetic changes in BDNF, specifically in the exon IV methylation. Male Wistar rats were assigned to one of four conditions: control, high frequency music (Mozart K.448), non-transposed frequency music (Mozart K.448) or white noise. Animals were exposed to their respective stimuli for 21 consecutive days and the anxiety levels were tested with the elevated plus-maze. We measured the global methylation level and within each CpG island of exon IV in the hippocampus through direct sequencing of bisulfite-treated DNA (BSP). No differences were found either in the anxiety levels of the animals or in the methylation level of the region of interest. This study suggests that the music effect could change according to its frequency and that it is not always anxiolytic. It also reveals that the behavioral response to the musical stimulation could be related to the methylation level within the exon IV of BDNF, since the homogeneity of the behavior was reflected in similar methylation status. However, further research is needed to assess other epigenetic changes, including modifications to the chromatin structure.

INTRODUCCIÓN

La música, además de ser un elemento recreativo transversal a muchas culturas, se ha convertido en una herramienta terapéutica ante diferentes cuadros clínicos y ha despertado un creciente interés en el ámbito de las neurociencias. Varios estudios han confirmado que la exposición a estímulos musicales, tanto en humanos como en modelos animales, favorece aspectos como el control de la ansiedad (Gerdner & Swanson, 1993), la reducción de la hipertensión (Akiyama & Sutoo, 2011), la evocación de memorias y emociones (Sixsmith & Gibson, 2007), la regulación del estrés (Escribano et al., 2014; Wachi et al., 2007), el desarrollo cerebral y la neuroplasticidad (Amagdei, Balteş, Avram, & Miu, 2010), la promoción del aprendizaje y la memoria espacial (Kim et al., 2006; Rauscher, Robinson, & Jens, 1998; Yao et al., 2009) e incluso se ha planteado que podría contribuir a los procesos de neurogénesis y reparación de neuronas (Fukui & Toyoshima, 2008). Adicionalmente, se ha descrito su potencial para activar el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, el cual es mediador de la emoción, la recompensa, la motivación y el mantenimiento de memorias ejecutivas (Panksepp & Bernatzky, 2002).

Otras investigaciones han puesto en evidencia que el nivel de expresión de algunos genes se modifica tras la exposición a estímulos musicales, influenciando aspectos como neurotransmisión, secreción hormonal, metabolismo y ciclo celular (Meng, Zhu, Li, Zeng, & Mei, 2009). Entre dichos genes está el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF, Gene ID: 24225). Específicamente, se ha determinado que la exposición perinatal a estímulos musicales incrementa el nivel de BDNF en el hipotálamo y en el hipocampo de ratones, lo que a su vez se traduce en un mejor rendimiento de los animales en las pruebas de laberinto cruzado y de evitación pasiva (Angelucci, Ricci, Padua, Sabino, & Tonali, 2007; Angelucci, Fiore, et al., 2007; Chikahisa et al., 2006). Asimismo, se ha confirmado que la exposición postnatal a estímulos musicales aumenta el contenido de esta proteína en el hipocampo de ratas Wistar (Marzban et al., 2011). Dichas investigaciones han puesto de manifiesto que la música tiene la potencialidad de modular la expresión del BDNF y, por consiguiente, de influenciar una serie de procesos neurobiológicos en los que está implicada esta neurotrofina, tales como el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados (Chao, 2003) y la supervivencia, diferenciación y plasticidad neuronal (Chen, Bath, McEwen, Hempstead, & Lee, 2008).

También se ha demostrado el rol del BDNF en procesos como neurogénesis (Rossi et al., 2006; Scharfman et al., 2005), aprendizaje y memoria (Mizuno, Dempster, Mill, & Giese, 2012) y se lo ha relacionado con la etiología de desórdenes neuropsiquiátricos como la depresión (Ikegame et al., 2013). Al respecto, se ha reportado que en pacientes deprimidos las concentraciones de BDNF son menores que en individuos sanos (Shimizu et al., 2003) y algunos estudios han demostrado que un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en el gen BDNF humano (Val66Met), se asocia con mayor susceptibilidad a la ansiedad y a la depresión (Chen et al., 2008). En relación con este hallazgo, se determinó que en una cepa transgénica de ratones que porta una forma "humanizada" del SNP en cuestión y que exhibe comportamientos de incrementada ansiedad, la exposición a cierta estimulación musical, en comparación con ruido

blanco, redujo significativamente el nivel de ansiedad e incrementó la expresión de BDNF en varias estructuras cerebrales, incluido el hipocampo (Li et al., 2010). Dicha investigación confirmó la relevancia del BDNF como mediador del efecto ansiolítico de la música.

Ahora bien, la regulación de la expresión de este gen está estrechamente relacionada con procesos epigenéticos. Así lo han reportado varios autores, quienes señalan que tanto la metilación del ADN como la modificación de histonas están involucradas en la expresión diferencial del BDNF en diversos tejidos (Aid, Kazantseva, Piirsoo, Palm, & Timmusk, 2007). En ese sentido, se ha determinado que el porcentaje de metilación de ciertas regiones promotoras y exónicas tiene relación directa con los niveles de expresión, tanto de RNA como de proteína (Ishimaru et al., 2010; Martinowich et al., 2003). Se ha confirmado que la desmetilación de algunos exones conduce a un aumento en la concentración de la proteína y se ha resaltado que el BDNF es un gen cuya expresión es susceptible de experimentar cambios en función de la actividad y de ciertas condiciones del entorno (Martinowich et al., 2003).

Se ha reportado que algunos agentes estresores, incluyendo situaciones adversas experimentadas durante los periodos prenatal y perinatal, conducen a un aumento en la metilación de varios exones y regiones reguladoras del BDNF y, por lo tanto, a la disminución de su expresión tanto en humanos como en modelos animales (Boersma et al., 2013; Choy, De Visser, Nichols, & Van Den Buuse, 2008; Mizuno et al., 2012; Roth & Sweatt, 2011). En el caso de las ratas, el exón IV ha sido señalado como una importante región reguladora que contribuye a la transcripción del BDNF en respuesta a diversas condiciones del entorno o estímulos externos (Roth, Zoladz, Sweatt, & Diamond, 2011).

Teniendo en cuenta que la música genera un aumento en la expresión del BDNF en el hipocampo de las ratas y que este es un gen susceptible de experimentar cambios epigenéticos en función de estímulos externos, la pregunta de investigación del presente proyecto fue: ¿La estimulación musical genera cambios en el nivel de metilación del exón IV del BDNF en el hipocampo de ratas Wistar? En ese sentido, se estimó el porcentaje de metilación de 11 regiones CpG del exón de interés en el hipocampo de ratas expuestas a estímulos auditivos basados en una composición musical (tanto de alta frecuencia como de frecuencia normal), en comparación con un grupo control y con un grupo sometido a ruido blanco y, por otra parte, se comparó la respuesta comportamental de los cuatro grupos en la prueba de laberinto en cruz elevado, la cual permite conocer el nivel de ansiedad de los animales.

El presente estudio aborda una temática de gran relevancia tanto en el campo de la investigación básica como aplicada y pretende aportar al conocimiento de los procesos moleculares que podrían subyacer a los efectos de la música. Algunos autores han señalado que, si bien las potencialidades de la música se han dado a conocer desde diversos enfoques, aún falta evidencia experimental sobre los efectos centrales de la misma a nivel neurobiológico (Angelucci, Ricci, et al., 2007). Por otra parte, este proyecto aporta información adicional sobre la regulación del BDNF a

nivel epigenético; un abordaje crucial para comprender la contribución de este gen al funcionamiento del sistema nervioso y al control de diversas patologías (Aid et al., 2007). Asimismo, podría contribuir al establecimiento de un marco de referencia basado en evidencias experimentales para áreas como la musicoterapia y para aproximaciones psicológicas clínicas, entre ellas el mindfulness.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se evaluaron 50 ratas machos Wistar (*Rattus norvegicus*) adolescentes (21PD), derivadas de una cepa Wistar del laboratorio Charles River. Éstas fueron alojadas en cajas plásticas estándar (cuatro individuos en cada una) en el bioterio del Laboratorio de Neurociencia y Comportamiento de la Universidad de los Andes. Los animales se expusieron a un ciclo de 12h luz/oscuridad y tuvieron libre acceso a agua y alimento (Marzban et al., 2011).

Estimulación auditiva

Después de una fase de manipulación y aclimatación de siete días, los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de cuatro grupos: control, estimulación musical de alta frecuencia (M_Alta), estimulación musical con frecuencia no transpuesta (M_Normal) y estimulación auditiva con ruido blanco. Los grupos fueron alojados en cuartos independientes. Las respectivas estimulaciones auditivas se presentaron durante 21 días consecutivos, por un periodo de 6 horas diarias (Akiyama & Sutoo, 2011; Li et al., 2010). Para evitar la distorsión del sueño de los animales, todos los estímulos se realizaron dentro del periodo nocturno (período de actividad de los animales). El estímulo musical (Sonata para dos pianos K.448 de Mozart) se presentó en una intensidad entre 65 dB y 75 dB (Chikahisa et al., 2006). Se seleccionó esta composición ya que se han comprobado los múltiples efectos que genera a nivel neurofisiológico (Chikahisa et al., 2006; Escribano et al., 2014; Meng et al., 2009), entre ellos el aumento en la producción de BDNF en el hipocampo de ratas (Marzban et al., 2011). La sonata se transpuso a una frecuencia entre 4kHz-16kHz, teniendo en cuenta, en primer lugar, que el umbral auditivo de las ratas oscila entre 4 kHz y 42 kHz (Heffner & Heffner, 2007; Talwar & Gerstein, 1998) y, en segundo lugar, que la música con sonidos de alta frecuencia puede regular varias funciones cerebrales (Akiyama & Sutoo, 2011). En efecto, algunos autores han hipotetizado que en las altas frecuencias que caracterizan las obras de Mozart podría subyacer la influencia que éstas ejercen sobre la actividad cerebral, tanto de humanos como de modelos animales (Akiyama & Sutoo, 2011). La intensidad del ruido blanco (1000 Hz – 10000 Hz) fue de 70 dB.

Laberinto en cruz elevado

Como se ha mencionado previamente, la música tiene efectos ansiolíticos (Chikahisa, Sano, Kitaoka, Miyamoto, & Sei, 2007; Li et al., 2010) y algunos investigadores han señalado que la regulación positiva del BDNF también está implicada en el control de la ansiedad (Martinowich, Manji, & Lu, 2007). Con base en esta evidencia, se aplicó una prueba comportamental para determinar si había diferencias en el nivel de ansiedad de los animales de cada grupo.

El laberinto en cruz elevado consiste en una estructura en forma de cruz ubicada a 50 cm del suelo y compuesta por dos brazos abiertos y dos brazos cerrados (50 x 10 cm cada uno). La evaluación comportamental que se lleva a cabo tras ubicar a la rata en el centro del laberinto, tiene como fundamento la evitación incondicionada que exhiben estos animales hacia espacios abiertos y elevados (León Rodríguez & Dueñas Gómez, 2012). Durante cinco minutos se registró para cada animal el número de entradas y el tiempo de permanencia en cada uno de los brazos. Un mayor número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos son indicativos de menor ansiedad (Lister, 1987). Se analizaron también otros comportamientos emitidos por los sujetos experimentales e indicativos de interés exploratorio, como mirar hacia abajo (dipping) y sacar la cabeza (head out). Estos comportamientos fueron registrados mediante el software X Plo Rat (version 3.3).

Análisis de metilación

Una vez finalizados los protocolos experimentales para la evaluación del comportamiento, los animales fueron decapitados y sus cerebros se extrajeron inmediatamente para aislar el hipocampo, el cual se almacenó a -80°C (Angelucci, Fiore, et al., 2007; Boersma et al., 2013). Se extrajo el ADN del hipocampo con el kit DNA 2000 (Corpogen) y se determinó su concentración con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). Mediante secuenciación dependiente de bisulfito (BSP) se determinó el nivel de metilación de 11 de las 12 regiones CpG que conforman el exón IV del BDNF. No se tuvo en cuenta la última isla puesto que, al estar ubicada en el extremo de la secuencia, no presentaba picos bien definidos. Para ello se realizó la conversión con bisulfito sódico a 400 nanogramos del ADN extraído, utilizando el kit EZ DNA MethylationTM (Zymo Research, CA, USA). Con el ADN procesado se realizó la PCR con primers diseñados para amplificar una región de 258-bp del exón IV de la rata: 5'-AGGTAGAGGAGGTATTATATGATAGT-3' (f) y 5'-ACTATATATTTCCCCTTCTTCAATT-3' (r) (Boersma et al., 2013; Roth et al., 2011). Estos primers amplifican la región en cuestión independientemente del estado de metilación (Boersma et al., 2013; Lubin, Roth, & Sweatt, 2008). El protocolo para la PCR consistió en un ciclo inicial de denaturación (5 min, 95°C), 50 ciclos de denaturación (1 min, 95°C), anillamiento (1 min, 60°C), extensión (1 min, 72°C) y ciclo final de extensión (5 min, 72°C) (Lubin et al., 2008). Los productos de la PCR se separaron en gel de agarosa al 2% para verificar la amplificación de la región de interés (258 bp). En aquellos casos en los que se obtuvieron bandas muy tenues, se realizó una PCR anidada a partir del amplicón de la primera reacción y así se

obtuvieron bandas más nítidas. De cada PCR se realizó un control negativo y un control de extracción.

Una vez confirmada la presencia del fragmento, las muestras se secuenciaron por la técnica de Sanger en las instalaciones de secuenciación del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de los Andes. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia de referencia (exón IV del BDNF en *Rattus norvegicus*) para determinar el porcentaje de coincidencia y la posición exacta de las 11 islas CpG. El análisis de metilación se realizó con la secuencia reverse mediante el software Chromas (Technelysium Pty Ltd, QSL, Australia), el cual permite visualizar y cuantificar los picos de adeninas y guaninas en cada isla. El porcentaje de metilación se calculó dividiendo el valor del pico de guanina sobre la suma del pico de guanina y adenina en cada isla, es decir, $(G/(G+A)*100)$ (Lubin et al., 2008; Roth et al., 2011). La metilación general del exón se calculó como el promedio del porcentaje de metilación de todas las regiones CpG (Boersma et al., 2013).

Control de calidad de la prueba de metilación

Para determinar el porcentaje de coincidencia de las secuencias resultantes con respecto a la secuencia de referencia (exón IV BDNF) se utilizó el software BiQ Analyzer (Bock et al., 2005). Dicho porcentaje permite comprobar si, efectivamente, el amplicón obtenido corresponde a la región de interés. Dicha correspondencia se verificó también a través de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI). Por otra parte, el control de calidad del proceso de conversión química con bisulfito y posterior secuenciación se llevó a cabo teniendo en cuenta los dos principales sesgos que podrían presentarse al realizar la técnica: 1) sobrestimar la metilación como consecuencia del fallo en la conversión de citosinas; 2) subestimar la metilación como consecuencia de la deaminación de 5-metilcitosinas (citosinas metiladas) a timinas (Genereux, Johnson, Burden, Stoger, & Laird, 2008). Para abordar el primero de ellos se determinó el porcentaje de conversión de las citosinas no ubicadas en regiones CpG. Este valor indica la efectividad de la técnica de conversión de bisulfito (cuanto más alto el porcentaje de conversión, mayor efectividad). El segundo se abordó a través del análisis de muestras procedentes tanto de controles como de pacientes con depresión (evaluadas en el marco de otra iniciativa de investigación), las cuales exhibían diferentes niveles de metilación y fueron procesadas de forma simultánea y a través del mismo protocolo que las del presente proyecto. Este último análisis permite determinar si el kit empleado efectivamente es sensible a la detección de metilación. Finalmente, para contar con una medida adicional del nivel de sensibilidad de la técnica de BSP, se espera contar con los resultados de secuenciación de muestras artificialmente 0% metiladas y 100% metiladas como controles (Human Methylated Non-methylated DNA Set, Zymo Research).

Análisis estadístico

Los datos de las pruebas comportamentales y de los niveles de metilación en el exón IV fueron analizados a través de un ANOVA de una vía (para aquellas variables con distribución normal) o del test Kruskal-Wallis (para aquellas variables con

distribución no normal). La normalidad de los datos se determinó a través del test de Shapiro-Wilk.

Consideraciones éticas

Durante la realización de este proyecto se cumplieron las normas éticas y legales exigidas para la investigación con animales de laboratorio en Colombia (Ley 84 de 1989 y Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud). Se garantizó que los animales se mantuvieran con agua y comida (LabDiet) *ad libitum*. Se respetó la declaración universal de los derechos de los animales proclamada por la liga internacional de los derechos del animal, Ginebra, Suiza (1989) y los principios éticos de la experimentación animal enunciados por ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science). Todos los experimentos realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL-UniAndes).

RESULTADOS

Laberinto en cruz elevado

Se registraron cuatro comportamientos indicativos de interés exploratorio y, por consiguiente, de menor estado de ansiedad de los animales: porcentaje de entradas a brazos abiertos, porcentaje de tiempo que permanecieron en los brazos abiertos, frecuencia dipping (mirar hacia abajo) y frecuencia head-out (sacar la cabeza).

Se observó una tendencia a que los animales expuestos a estímulos auditivos (tanto música como ruido blanco) exploraran más en los brazos abiertos que los controles, lo que sugeriría un efecto ansiolítico del tratamiento. Sin embargo, dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas para el porcentaje de entradas a brazos abiertos ($F = 2,417$; $P = 0,082$) (**Figura 1**) ni para el porcentaje de tiempo que permanecieron en éstos ($F = 1,639$; $P = 0,197$) (**Figura 2**). Tampoco se hallaron diferencias en cuanto a otros comportamientos indicativos de baja ansiedad, como frecuencia dipping ($F = 2,105$; $P = 0,116$) y head-out ($P = 0,340$).

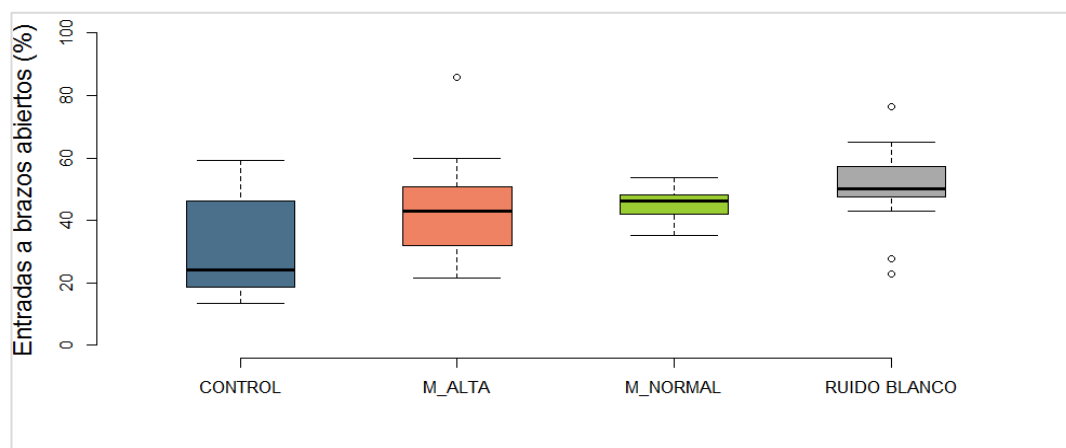


Figura 1. Porcentaje de entradas a brazos abiertos en el Laberinto en Cruz Elevado. (M_Alta: grupo expuesto a música de alta frecuencia; M_Normal: grupo expuesto a música con frecuencia no traspuesta)

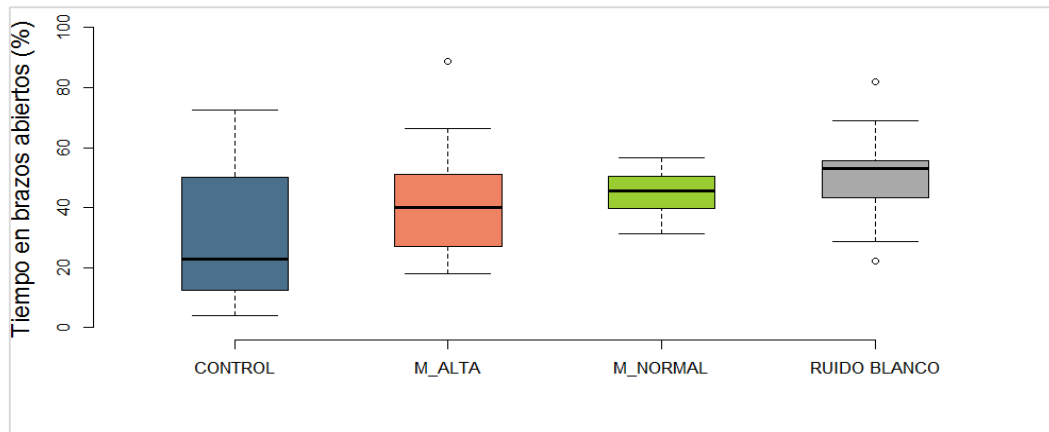


Figura 2. Porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos en el Laberinto en Cruz Elevado

Control de calidad de la prueba de metilación

En relación con la sensibilidad y eficacia de la conversión química con bisulfito y la posterior secuenciación directa (BSP) se determinó que el porcentaje de conversión de citosinas no ubicadas en regiones CpG fue mayor al 95% en todos los casos. Para observar dicho resultado con claridad, se generó un alineamiento entre una de las secuencias evaluadas con respecto a la secuencia de referencia del exón IV del BDNF tal y como resultaría tras el tratamiento con bisulfito y la secuenciación con el primer reverse. Como puede apreciarse, el alto porcentaje de coincidencia entre ambas secuencias pone de manifiesto que efectivamente la conversión de citosinas no presentes en regiones CpG fue mayor al 95% (**Figura 3**).



Figura 3. Resultado del análisis de calidad de una secuencia a través de BiQ Analyzer. **A.** Secuencia de referencia (reverse y sin bisulfito; los recuadros indican las citosinas no ubicadas en regiones CpG; en gris se resaltan las islas CpG). **B.** Alineamiento entre la secuencia de referencia (reverse y con bisulfito) y una de las secuencias evaluadas (los recuadros indican las posiciones de citosinas no CpG que se observan como adeninas tras la conversión con bisulfito y la PCR; en naranja y violeta se resaltan las islas CpG en la secuencia de referencia y en la secuencia evaluada, respectivamente).

Ahora bien, la sensibilidad del protocolo efectuado para detectar metilación se comprobó a través de los resultados obtenidos al analizar muestras procedentes de pacientes con depresión y controles, las cuales fueron procesadas simultáneamente con las del presente proyecto y a través del mismo protocolo. Dicho análisis permitió determinar que, efectivamente, el procedimiento de conversión con bisulfito y la posterior secuenciación sí son viables para detectar diferentes niveles de metilación (Figura 4).

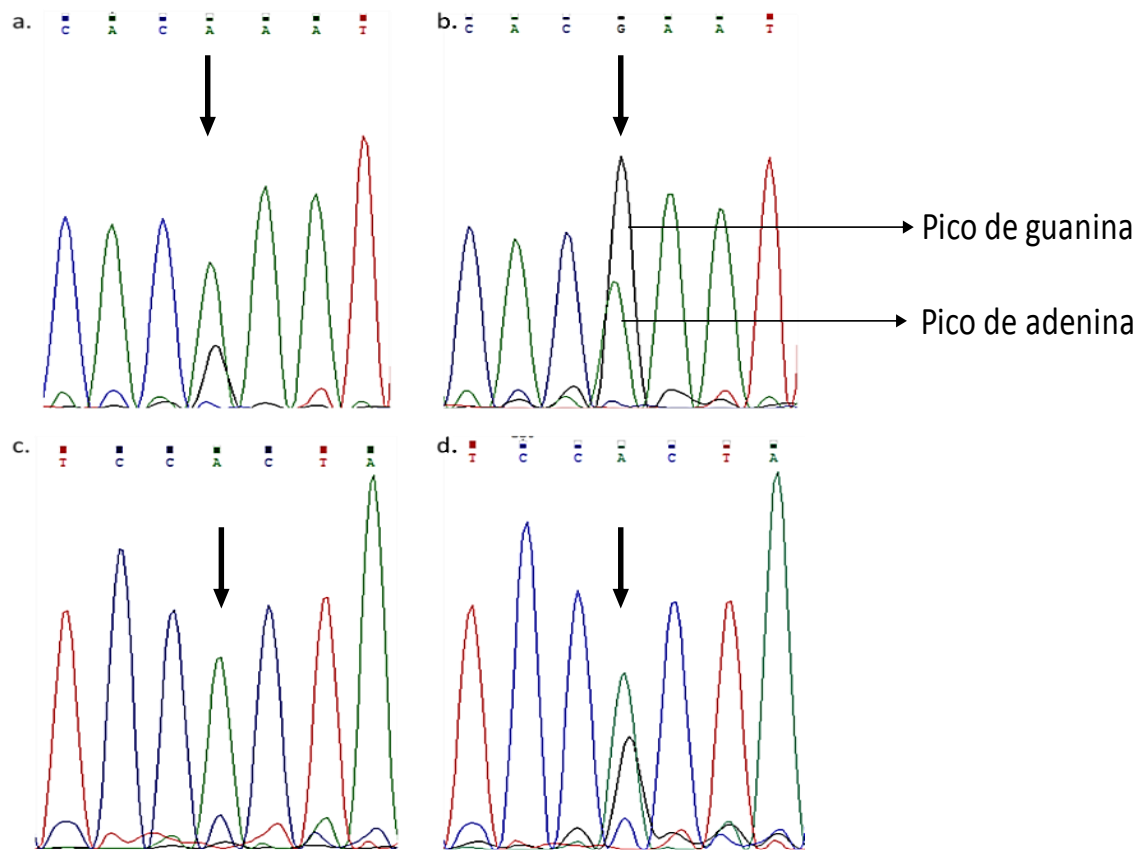


Figura 4. Electroferogramas mostrando diferentes niveles de metilación en el sitio CpG 15 (a y c) y CpG 16 (b y d) entre individuo con depresión (a y b) y control (c y d) (Tomado de Villamizar, 2016)

Las anteriores evidencias indican que el procedimiento llevado a cabo para determinar el nivel de metilación, tanto global como en cada isla CpG, fue adecuado, en cuanto se verificó la calidad de las muestras y se descartaron los dos principales sesgos inherentes al proceso de BSP. Como una evidencia adicional, se secuenciarán las muestras artificialmente 0% metiladas y 100% metiladas (Human Methylated Non-methylated DNA Set, Zymo Research), para lo cual se estandarizó la PCR.

Nivel de metilación

El protocolo de PCR estandarizado permitió obtener para cada muestra el amplicón deseado (258 bp), correspondiente al exón IV del BDNF (**Figura 5**).

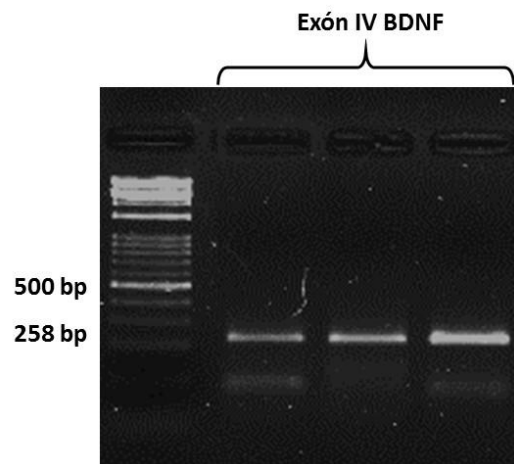


Figura 5. Fragmento de 258 bp correspondiente al exón IV del BDNF separado en gel de agarosa al 2%

En cuanto a la similitud de las secuencias obtenidas con respecto a la de referencia, pudo determinarse que todas tuvieron un porcentaje de coincidencia superior al 75% y, a través de BLAST, se confirmó que efectivamente todas correspondían al exón IV del BDNF de *Rattus norvegicus*.

Para cada una de las secuencias obtenidas se cuantificó el nivel de metilación dentro de las 11 islas CpG, así como la metilación global del exón IV. En la **Figura 6** se muestra una región CpG de una de las secuencias analizadas, con sus respectivos picos de adenina y guanina.

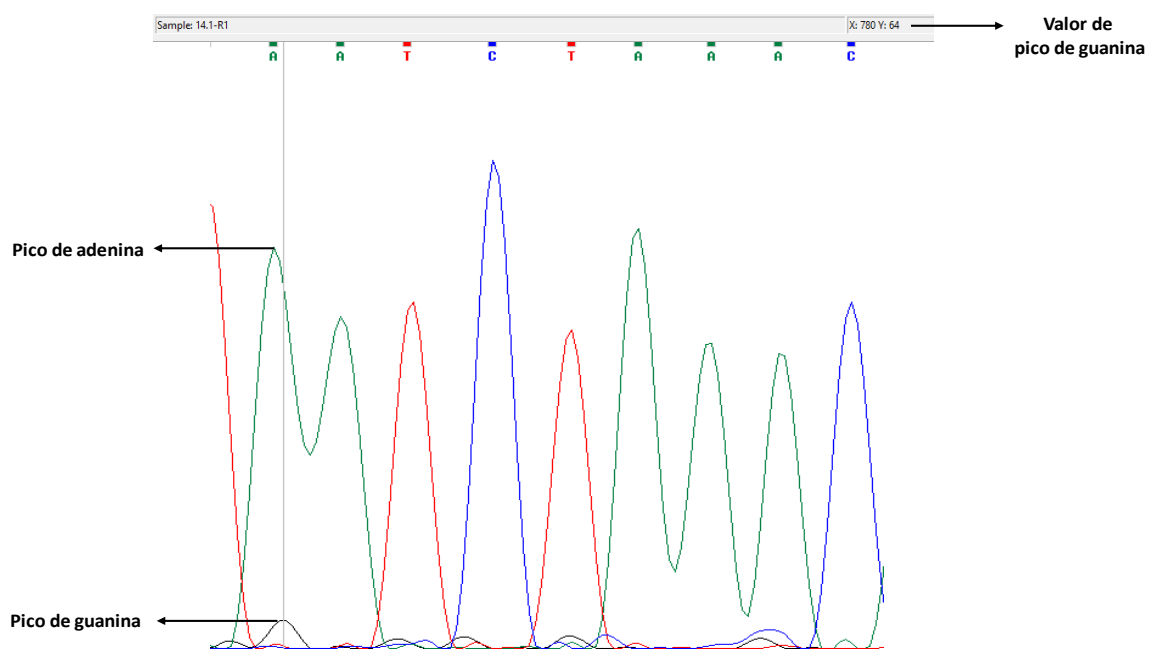


Figura 6. Electroferograma que muestra los picos de adenina y guanina en una isla CpG del exón IV del BDNF

No se encontraron diferencias en la metilación global del exón IV ($P = 0,982$) (Figura 7) ni a nivel de cada una de las 11 islas CpG analizadas entre los cuatro grupos de estudio (Figura 8).

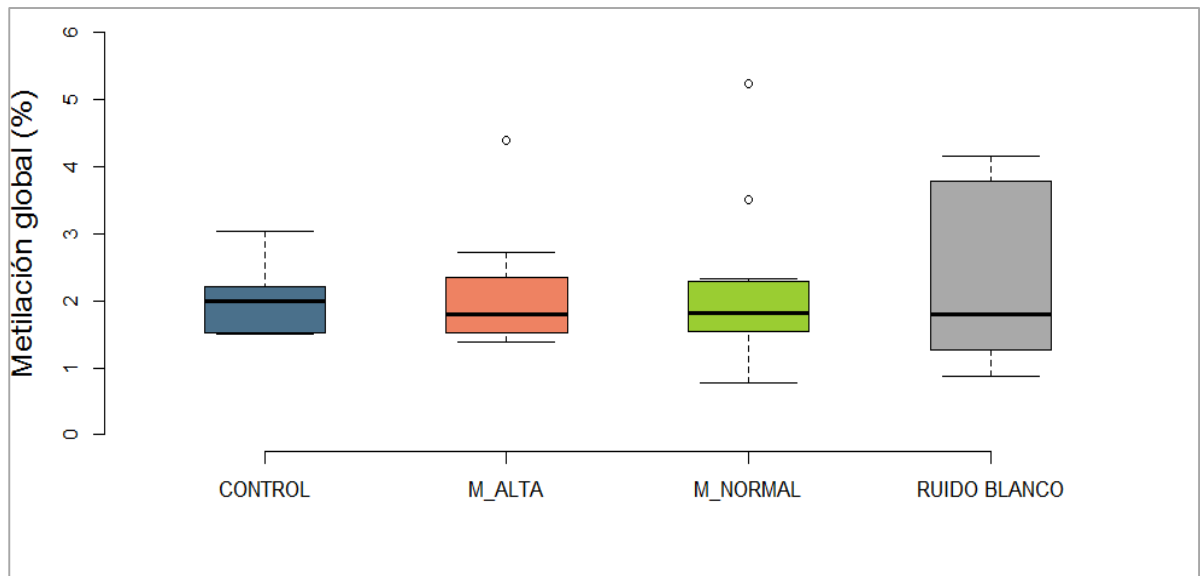


Figura 7. Porcentaje de metilación global en el exón IV del BDNF

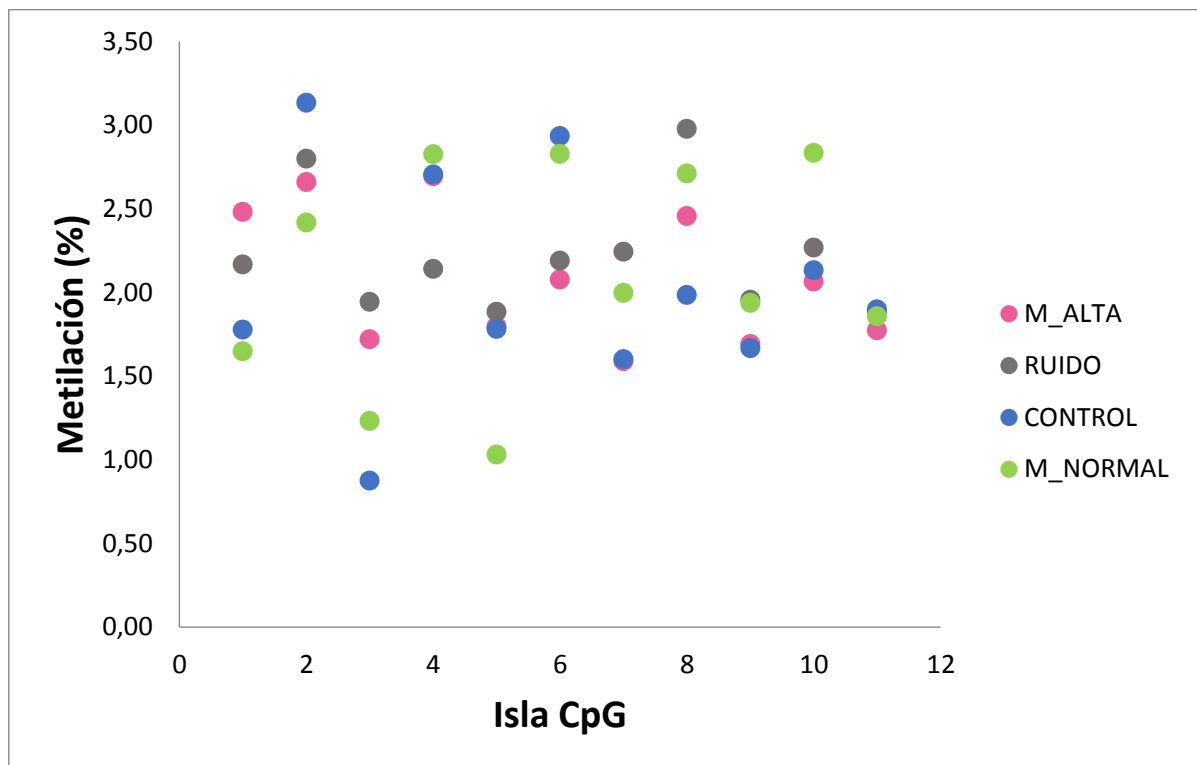


Figura 8. Porcentaje de metilación promedio por grupo en cada isla CpG del exón IV del BDNF

DISCUSIÓN

El efecto ansiolítico de la música en ratas ha sido reportado por varios autores (Chikahisa et al., 2006; Escribano et al., 2014; Li et al., 2010; Niehues da Cruz, Delwing de Lima, Delwing Dal Magro, & Geraldo Pereira da Cruz, 2011), quienes señalan que dicha estimulación auditiva podría hacer parte de un ambiente enriquecido que favorezca el bienestar de los animales. Si bien no se conocen con precisión los mecanismos por los cuales los estímulos auditivos generan efectos comportamentales en las ratas, se ha sugerido que éstos, a través de conexiones entre las estructuras talámicas del sistema auditivo con el hipocampo, pueden activar las neuronas hipocampales, lo que produciría un aumento en la producción de BDNF (Angelucci, Fiore, et al., 2007) y, por consiguiente, una reducción en el nivel de ansiedad de los animales.

En concordancia con tal planteamiento, en el presente estudio se observó una tendencia a que aquellos animales que fueron expuestos al estímulo musical (tanto de frecuencia transpuesta como de frecuencia normal) efectivamente exploraran más en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado, en comparación con los controles. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para dicha variable. En ese sentido, este estudio sugiere que el efecto de la música sobre el comportamiento de las ratas no es homogéneo y que podría cambiar en función de factores como el tipo de cepa que se esté evaluando. Otro aspecto que podría influir sobre el efecto de la estimulación musical en el comportamiento es la etapa de desarrollo en que se encuentren los animales. Como se ha mencionado previamente, hay estudios que han comprobado el efecto ansiolítico de la música en ratas adolescentes, como las que fueron evaluadas en este proyecto. Sin embargo, hay autores que señalan que es en etapas tempranas del desarrollo (e incluso durante la época prenatal) que los animales podrían ser más susceptibles de experimentar cambios comportamentales en respuesta a estímulos auditivos (Chikahisa et al., 2006).

Por otra parte, en contraste con lo sugerido por otros autores, el ruido blanco no resultó ansiogénico para los animales, pues el grupo que fue expuesto a ese tipo de estimulación no difirió con respecto a los demás en cuanto al porcentaje de entradas y de permanencia en los brazos abiertos del laberinto. Al respecto, cabe mencionar que el ruido blanco utilizado en el presente estudio comprendía una frecuencia mínima de 1000 Hz, es decir, estaba completamente dentro del rango auditivo de la rata y en aquellas investigaciones en que han reportado el efecto ansiogénico del ruido (Chikahisa et al., 2006; Escribano et al., 2014; Kim et al., 2006), en comparación con la música, éste no ha sido transpuesto a altas frecuencias, razón por la cual el efecto que evoca en los animales sí podría diferir.

Varias investigaciones han puesto de manifiesto que los cambios comportamentales asociados a la estimulación musical en ratas subyacen en un substrato biológico. De esa manera, se ha reportado que la música aumenta la expresión de BDNF en el hipocampo y en otras regiones cerebrales, como el hipotálamo (Angelucci, Fiore, et al., 2007; Chikahisa et al., 2006; Marzban et al., 2011; Xing et al., 2016). Sin embargo,

no se había abordado previamente si dicha estimulación auditiva podría provocar modificaciones en el nivel de metilación del gen que codifica para esta neurotrofina. Por tal razón, en el presente estudio se evaluó si la exposición a los estímulos auditivos generaba cambios en el nivel de metilación del exón IV del BDNF, el cual ha sido numerosas veces reportado como una región crucial para la expresión global de la proteína y al cual se atribuye una modulación dependiente de la actividad (Boersma et al., 2013; Karpova, 2014; Lubin et al., 2008; Roth et al., 2011). Se ha señalado que una mayor expresión del BDNF en el hipocampo de las ratas favorece procesos como el aprendizaje, la neuroplasticidad y la regulación del estrés y la ansiedad. De esa manera, aquellos estudios que han evaluado el impacto positivo de la música han hallado una estrecha relación entre la expresión del BDNF y la disminución de la ansiedad de los animales. Por tal razón, el registro de la actividad exploratoria en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado podría considerarse un indicador indirecto de la expresión de la neurotrofina en el hipocampo.

Ahora bien, existe evidencia de que la expresión del BDNF está regulada por factores epigenéticos, entre ellos el nivel de metilación en el exón IV. Se ha verificado que a mayor metilación en dicha región, menor expresión global de la proteína (Boulle et al., 2012; Kundakovic et al., 2015; Mizuno et al., 2012; Zheleznyakova, Cao, & Schiöth, 2016). Por lo tanto, se esperaría que si tras la exposición a los estímulos auditivos no hay cambios en los niveles de metilación en las islas CpG que conforman el exón, como se halló en este estudio, tampoco se evidenciarían cambios en la expresión de la proteína y, por consiguiente, no habría diferencias comportamentales, en relación con la ansiedad, en los animales evaluados. Los resultados del presente estudio están en concordancia con dicha evidencia, en cuanto se hallaron bajos niveles de metilación en los cuatro grupos, así como un comportamiento homogéneo en la prueba del laberinto en cruz elevado.

Por consiguiente, no se puede descartar que un cambio en el nivel de metilación del exón IV del BDNF efectivamente podría estar relacionado con la respuesta comportamental de los animales ante la estimulación musical. Esto estaría en concordancia con el planteamiento de que las neurotrofinas podrían tener un rol fundamental en la regulación de los efectos de la música a nivel del Sistema Nervioso Central (Angelucci, Fiore, et al., 2007). Sin embargo, haría falta corroborar dicha relación en casos en los que efectivamente una diferencia en el nivel de metilación de la región de interés se refleje directamente en el comportamiento de las ratas, particularmente en su estado de ansiedad.

Adicionalmente, debe tenerse en consideración que aunque, como se ha mencionado anteriormente, múltiples estudios han evidenciado una relación inversamente proporcional entre la metilación del exón IV y la expresión global de BDNF en el hipocampo, otros autores han reportado resultados contrastantes. Por ejemplo, Karpova (2014) señala que el estado epigenético del BDNF no necesariamente habría de generar cambios en la expresión de la proteína en un momento determinado. Esto fue reportado en un estudio relacionado con la Enfermedad de Huntington, en el cual se halló que la disminución en la expresión del BDNF en el hipocampo de ratones no fue explicada por un aumento en la metilación

del gen (Zajac et al., 2009). En esa misma línea, Molteni *et al* (2010) hallaron que el nivel de mRNA del BDNF en el hipocampo de ratas no se relacionó con el nivel de metilación del exón IV de este gen. En concordancia con dicho hallazgo, se ha cuestionado si necesariamente un incremento en la metilación del exón IV del BDNF podría ser suficiente para reducir la expresión global de BDNF. Al respecto, efectivamente algunas investigaciones que no han evaluado otros exones, sí han reportado cambios en la expresión global de la proteína relacionados únicamente con alteraciones en el nivel de metilación del exón IV (Boersma et al., 2013).

Estas evidencias contradictorias ponen de manifiesto que la regulación de la expresión del BDNF es un proceso complejo en el que, además de la metilación del ADN, podrían estar implicadas modificaciones epigenéticas postranscripcionales, específicamente a nivel de histonas (Boulle et al., 2012). Además, también podría estar involucrada en dicha regulación alguna modificación previa de un factor de transcripción que module la expresión del BDNF. Por ejemplo, se ha reportado que hay activación del BDNF a través de la acetilación de histonas (Karpova, 2014) y a nivel de transportadores, se ha hallado que fallos en el transporte de serotonina pueden conducir a una reducción en la expresión de la neurotrofina en varias regiones del cerebro (Molteni et al., 2010).

En conclusión, los resultados del presente estudio, en contraste con los de investigaciones previas, sugieren que la estimulación musical no genera en todos los casos un efecto ansiolítico en las ratas. Asimismo, pone de manifiesto que dicha respuesta comportamental sí podría estar relacionada con el nivel de metilación del exón IV del BDNF, en cuanto no se hallaron diferencias en ninguna de las dos variables. No obstante, sería preciso determinar directamente el nivel de expresión de BDNF en el hipocampo para evaluar la relación entre su presencia y el estado comportamental de los animales. Adicionalmente, desarrollar estudios posteriores en esta misma línea permitiría determinar si factores como el tiempo de exposición al estímulo o la edad de los animales al inicio del protocolo experimental podrían afectar su respuesta comportamental. También faltaría esclarecer si el potencial efecto benéfico de la música sobre las ratas podría estar mediado por modificaciones epigenéticas no sólo a nivel de metilación del ADN, sino de cambios en la estructura de la cromatina o, incluso, por modificaciones en otros genes reguladores del BDNF.

AGRADECIMIENTOS

A Fernando Cárdenas y María Claudia Lattig, quienes han sido dos aliados incondicionales durante este proceso de aprendizaje. Al Fondo de Investigaciones de la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, por su apoyo con la financiación del proyecto. A todos a quienes, sin nombrar, evoco con agradecimiento en cada despertar.

Referencias

- Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., & Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. *Journal of Neuroscience Research*, *85*(3), 525–35. <http://doi.org/10.1002/jnr.21139>
- Akiyama, K., & Sutoo, D. (2011). Effect of different frequencies of music on blood pressure regulation in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience Letters*, *487*(1), 58–60. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.09.073>
- Amagdei, A., Balteş, F. R., Avram, J., & Miu, A. C. (2010). Perinatal exposure to music protects spatial memory against callosal lesions. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *28*(1), 105–109. <http://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.08.017>
- Angelucci, F., Fiore, M., Ricci, E., Padua, L., Sabino, A., & Tonali, P. A. (2007). Investigating the neurobiology of music: brain-derived neurotrophic factor modulation in the hippocampus of young adult mice. *Behavioural Pharmacology*, *18*(5-6), 491–496. <http://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3282d28f50>
- Angelucci, F., Ricci, E., Padua, L., Sabino, A., & Tonali, P. A. (2007). Music exposure differentially alters the levels of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in the mouse hypothalamus. *Neuroscience Letters*, *429*(2-3), 152–155. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.10.005>
- Bock, C., Reither, S., Mikeska, T., Paulsen, M., Walter, J., & Lengauer, T. (2005). BiQ Analyzer: Visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics*, *21*(21), 4067–4068. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti652>
- Boersma, G. J., Lee, R. S., Cordner, Z. a., Ewald, E. R., Purcell, R. H., Moghadam, A. a., & Tamashiro, K. L. (2013). Prenatal stress decreases Bdnf expression and increases methylation of Bdnf exon IV in rats. *Epigenetics*, *9*(3), 437–447. <http://doi.org/10.4161/epi.27558>
- Boulle, F., van den Hove, D. L. a, Jakob, S. B., Rutten, B. P., Hamon, M., van Os, J., ... Kenis, G. (2012). Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Molecular Psychiatry*, *17*(6), 584–596. <http://doi.org/10.1038/mp.2011.107>
- Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature Reviews. Neuroscience*, *4*(4), 299–309. <http://doi.org/10.1038/nrn1078>
- Chen, Z.-Y., Bath, K., McEwen, B., Hempstead, B., & Lee, F. (2008). Impact of genetic variant BDNF (Val66Met) on brain structure and function. *Novartis Foundation Symposium*, *289*, 180–188; discussion 188–195. <http://doi.org/10.3892/mmr.2011.494>
- Chikahisa, S., Sano, A., Kitaoka, K., Miyamoto, K. I., & Sei, H. (2007). Anxiolytic effect of music depends on ovarian steroid in female mice. *Behavioural Brain Research*, *179*(1), 50–59. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.01.010>
- Chikahisa, S., Sei, H., Morishima, M., Sano, A., Kitaoka, K., Nakaya, Y., & Morita, Y.

- (2006). Exposure to music in the perinatal period enhances learning performance and alters BDNF/TrkB signaling in mice as adults. *Behavioural Brain Research*, *169*(2), 312–319. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.021>
- Choy, K. H. C., De Visser, Y., Nichols, N. R., & Van Den Buuse, M. (2008). Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: Effects on learning and memory. *Hippocampus*, *18*(7), 655–667. <http://doi.org/10.1002/hipo.20425>
- Escribano, B., Quero, I., Feijóo, M., Tasset, I., Montilla, P., & Túnez, I. (2014). Role of noise and music as anxiety modulators: Relationship with ovarian hormones in the rat. *Applied Animal Behaviour Science*, *152*, 73–82. <http://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.12.006>
- Fukui, H., & Toyoshima, K. (2008). Music facilitate the neurogenesis, regeneration and repair of neurons. *Medical Hypotheses*, *71*(5), 765–769. <http://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.06.019>
- Genereux, D. P., Johnson, W. C., Burden, A. F., Stoger, R., & Laird, C. D. (2008). Errors in the bisulfite conversion of DNA: modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies. *Nucleic Acids Research*, *36*(22), e150–e150. <http://doi.org/10.1093/nar/gkn691>
- Gerdner, L. a, & Swanson, E. a. (1993). Effects of individualized music on confused and agitated elderly patients. *Archives of Psychiatric Nursing*, *7*(5), 284–291. [http://doi.org/10.1016/0883-9417\(93\)90006-l](http://doi.org/10.1016/0883-9417(93)90006-l)
- Heffner, H. E., & Heffner, R. S. (2007). Hearing Ranges of Laboratory Animals. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *46*(1), 11–13. Retrieved from http://www.psychology.utoledo.edu/images/users/74/21.JAALAS_Revised.pdf
- Ikegame, T., Bundo, M., Murata, Y., Kasai, K., Kato, T., & Iwamoto, K. (2013). DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. *Journal of Human Genetics*, *58*(7), 434–438. <http://doi.org/10.1038/jhg.2013.65>
- Ishimaru, N., Fukuchi, M., Hirai, A., Chiba, Y., Tamura, T., Takahashi, N., ... Shiraishi, M. (2010). Differential epigenetic regulation of BDNF and NT-3 genes by trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine in Neuro-2a cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *394*(1), 173–177. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.139>
- Karpova, N. N. (2014). Neuropharmacology Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity. *Neuropharmacology*, *76*, 709–718. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.002>
- Kim, H., Lee, M. H., Chang, H. K., Lee, T. H., Lee, H. H., Shin, M. C., ... Kim, C. J. (2006). Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain and Development*, *28*(2), 109–114. <http://doi.org/10.1016/j.braindev.2005.05.008>
- Kundakovic, M., Gudsnuk, K., Herbstman, J. B., Tang, D., Perera, F. P., & Champagne, F. A. (2015). DNA methylation of BDNF as a biomarker of early-life adversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(22), 6807–6813.

<http://doi.org/10.1073/pnas.1408355111>

- León Rodríguez, D. A., & Dueñas Gómez, Z. J. (2012). Effects of Early Maternal Separation on The Performance in the Elevated Plus Maze in Adult Rats. *Acta Biológica Colombiana*, *17*(1), 129–142.
- Li, W. J., Yu, H., Yang, J. M., Gao, J., Jiang, H., Feng, M., ... Chen, Z. Y. (2010). Anxiolytic effect of music exposure on BDNF^{Met/Met} transgenic mice. *Brain Research*, *1347*, 71–79. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.080>
- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, *92*(2), 180–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3110839>
- Lubin, F. D., Roth, T. L., & Sweatt, J. D. (2008). Epigenetic regulation of BDNF gene transcription in the consolidation of fear memory. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(42), 10576–10586. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1786-08.2008>
- Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., ... Sun, Y. E. (2003). DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science (New York, N.Y.)*, *302*(5646), 890–893. <http://doi.org/10.1126/science.1090842>
- Martinowich, K., Manji, H., & Lu, B. (2007). New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nature Neuroscience*, *10*(9), 1089–1093. <http://doi.org/10.1038/nn1971>
- Marzban, M., Shahbazi, A., Tondar, M., Soleimani, M., Bakhshayesh, M., Moshkforoush, A., ... Joghataei, M. T. (2011). Effect of mozart music on hippocampal content of BDNF in postnatal rats. *Basic and Clinical Neuroscience*, *2*(3), 21–26.
- Meng, B., Zhu, S., Li, S., Zeng, Q., & Mei, B. (2009). Global view of the mechanisms of improved learning and memory capability in mice with music-exposure by microarray. *Brain Research Bulletin*, *80*(1-2), 36–44. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.05.020>
- Mizuno, K., Dempster, E., Mill, J., & Giese, K. P. (2012). Long-lasting regulation of hippocampal Bdnf gene transcription after contextual fear conditioning. *Genes, Brain, and Behavior*, *11*(6), 651–9. <http://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00805.x>
- Molteni, R., Cattaneo, A., Calabrese, F., Macchi, F., Olivier, J. D. A., Racagni, G., ... Riva, M. A. (2010). Neurobiology of Disease Reduced function of the serotonin transporter is associated with decreased expression of BDNF in rodents as well as in humans. *Neurobiology of Disease*, *37*(3), 747–755. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.12.014>
- Niehues da Cruz, J., Delwing de Lima, D., Delwing Dal Magro, D., & Geraldo Pereira da Cruz, J. (2011). The Power of Classic Music to Reduce Anxiety in Rats Treated with Simvastatin. *Basic and Clinical Neuroscience*, *2*(4), 5–11.
- Panksepp, J., & Bernatzky, G. (2002). Emotional sounds and the brain: The neuro-affective foundations of musical appreciation. *Behavioural Processes*, *60*(2),

133–155. [http://doi.org/10.1016/S0376-6357\(02\)00080-3](http://doi.org/10.1016/S0376-6357(02)00080-3)

- Rauscher, F. H., Robinson, K. D., & Jens, J. J. (1998). Improved maze learning through early music exposure in rats. *Neurological Research*, 20(5), 427–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9664590>
- Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F., ... Caleo, M. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *European Journal of Neuroscience*, 24(7), 1850–1856. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05059.x>
- Roth, T. L., & Sweatt, J. D. (2011). Epigenetic marking of the BDNF gene by early-life adverse experiences. *Hormones and Behavior*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.05.005>
- Roth, T. L., Zoladz, P. R., Sweatt, J. D., & Diamond, D. M. (2011). Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Journal of Psychiatric Research*, 45(7), 919–926. <http://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.01.013>
- Scharfman, H., Goodman, J., Macleod, A., Phani, S., Antonelli, C., & Croll, S. (2005). Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Experimental Neurology*, 192(2), 348–356. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.11.016>
- Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., ... Iyo, M. (2003). Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry*, 54(1), 70–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842310>
- Sixsmith, A., & Gibson, G. (2007). Music and the wellbeing of people with dementia. *Ageing and Society*, 27(01), 127. <http://doi.org/10.1017/S0144686X06005228>
- Talwar, S. K., & Gerstein, G. L. (1998). Auditory frequency discrimination in the white rat. *Hearing Research*, 126(1-2), 135–150. [http://doi.org/10.1016/S0378-5955\(98\)00162-2](http://doi.org/10.1016/S0378-5955(98)00162-2)
- Wachi, M., Koyama, M., Utsuyama, M., Bittman, B. B., Kitagawa, M., & Hirokawa, K. (2007). Recreational music-making modulates natural killer cell activity, cytokines, and mood states in corporate employees. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 13(2), CR57–R70.
- Xing, Y., Chen, W., Wang, Y., Jing, W., Gao, S., Guo, D., ... Yao, D. (2016). Music exposure improves spatial cognition by enhancing the BDNF level of dorsal hippocampal subregions in the developing rats. *Brain Research Bulletin*. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.01.009>
- Yao, J., Xia, Y., Dai, S., Fang, G., Guo, H., & Yao, D. (2009). Enhancement of Spatial Learning-Memory in Developing Rats via Mozart Music. *Journal of Electronic Science and Technology of China*, 7(1), 47–50.

- Zajac, M. S., Pang, T. Y. C., Wong, N., Weinrich, B., Leang, L. S. K., Craig, J. M., ... Hannan, A. J. (2009). Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female Huntington's disease mice. *Hippocampus*, NA–NA. <http://doi.org/10.1002/hipo.20658>
- Zheleznyakova, G. Y., Cao, H., & Schiöth, H. B. (2016). BDNF DNA methylation changes as a biomarker of psychiatric disorders : literature review and open access database analysis. *Behavioral and Brain Functions*, 1–14. <http://doi.org/10.1186/s12993-016-0101-4>