



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

El transcriptoma no codificante en Síndrome de Rett: nuevas funciones para las regiones transcritas ultraconservadas y *circRNAs*

Aida Obiols Guardia

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

PROGRAMA EN BIOMEDICINA

El transcriptoma no codificante en Síndrome
de Rett: nuevas funciones para las regiones
transcritas ultraconservadas y *circRNAs*

Tesis doctoral

Aida Obiols Guardia

Directores

Dra. Sònia Guil Domènech

Dr. Manel Esteller Badosa

Barcelona, 2020



Instituto de Investigación
CONTRA LA LEUCEMIA
Josep Carreras⁹

IDIBELL 
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge



Cancer Epigenetics and Biology Program
Programa d'Epigenètica i Biologia del Càncer
Programa de Epigenètica y Biología del Cáncer



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE MEDICINA

PROGRAMA EN BIOMEDICINA

El transcriptoma no codificante en Síndrome de Rett: nuevas funciones para las regiones transcritas ultraconservadas y *circRNAs*

Memoria presentada por Aida Obiols Guardia para optar al grado de Doctora por la Universitat de Barcelona

GUIL
DOMENECH
H SONIA -
39173163T
Firmado digitalmente por
GUIL DOMENECH
SONIA -
39173163T
Fecha: 2020.05.17
11:25:47 +02'00'

Dra. Sònia Guil Domènech

Codirectora

Dr. Manel Esteller Badosa

Codirector y tutor

Aida Obiols Guardia

Doctoranda

ÍNDICES

Índice de contenidos

ABREVIACIONES	1
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	15
1. El Síndrome de Rett	17
1.1. Patología y criterios de diagnóstico: RTT clásico y variantes atípicas	17
1.2. Neurobiología de la enfermedad de RTT	19
1.2.1. Receptores de glutamato de tipo AMPA y edición del ARN	20
1.3. Bases genéticas del Síndrome de Rett.....	24
1.3.1. Estructura génica y proteica de MeCP2	25
1.3.2. Funciones y vías moleculares de MeCP2	28
2. Modelos RTT.....	31
2.1. Modelos animales	32
2.2. Modelos celulares humanos <i>in vitro</i>	34
3. El ARN no codificante.....	36
3.1. ARNs no codificantes pequeños (<i>sncRNAs</i>): el caso de los microARNs (<i>miRNAs</i>).....	37
3.1.1. Biogénesis de los <i>miRNAs</i>	37
3.1.2. <i>miRNAs</i> en enfermedades neurológicas	39
3.2. ARNs no codificantes largos (<i>lncRNAs</i>).....	42
3.2.1. Regiones transcritas ultraconservadas (<i>T-UCRs</i>)	45
3.2.2. ARNs circulares (<i>circRNAs</i>).....	49
3.2.3. <i>lncRNAs</i> en enfermedades neurológicas	52
3.2.3.1. <i>T-UCRs</i> en enfermedades neurológicas	53
3.2.3.1.1. El caso de <i>Evf2</i>	53
3.2.3.2. <i>circRNAs</i> en enfermedades neurológicas	56
OBJETIVOS	59
METODOLOGÍA	63
1. Muestras biológicas.....	65
1.1. Muestras de tejido cerebral de ratón	65
1.2. Líneas celulares	65

1.2.1. Generación de una línea neural humana <i>KO</i> para MeCP2	66
1.3. Muestras <i>post-mortem</i> de tejido cerebral humano.....	67
2. Análisis de expresión.....	69
2.1. Análisis transcripcionales mediante chips (<i>arrays</i>) de expresión...	69
2.2. Análisis de expresión génica mediante <i>RT-PCR</i> cuantitativa (<i>RT-qPCR</i>)	71
2.3. Detección de proteínas mediante inmunoblot.....	77
3. Análisis de edición del ARN.....	79
4. Análisis específico de metilación en exones “flip” y “flop” de <i>GRIA3</i>	80
5. Análisis de localización de ARN.....	82
5.1. Fragmentación núcleo-citoplasma.....	82
5.2. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	82
RESULTADOS	85
1. Modelo murino.....	87
1.1. Identificación y análisis de <i>T-UCRs</i> y <i>circRNAs</i> con expresión alterada en hipocampo y córtex frontal de ratones RTT	87
1.1.1. Selección de <i>T-UCRs</i> candidatos	87
1.1.1.1. Análisis mediante <i>RT-qPCR</i> de la expresión de <i>T-UCRs</i> candidatos en hipocampo y córtex frontal de ratones RTT	92
1.1.1.2. Análisis de alteraciones en el sistema <i>Evf2</i> en córtex frontal e hipocampo de ratones RTT	96
1.1.1.3. Análisis de alteraciones en la expresión y edición del ARN de <i>Gria3</i> en córtex frontal e hipocampo de ratones RTT.....	100
1.1.2. Selección de <i>circRNAs</i> candidatos	103
1.1.2.1. Análisis mediante <i>RT-qPCR</i> de la expresión de <i>circRNAs</i> candidatos en hipocampo y córtex frontal de ratones RTT	107
1.1.2.2. Caracterización de los niveles de expresión de <i>Sirt2</i> en el modelo RTT de ratón	109
2. Modelo celular.....	112
2.1. Caracterización del modelo celular neural humano <i>knockout</i> para MeCP2.....	112
2.2. Identificación y análisis de <i>T-UCRs</i> y <i>circRNAs</i> con expresión alterada en el modelo celular neural humano <i>knockout</i> para MeCP2 .	114
2.2.1. Análisis de alteraciones en la expresión y edición del ARN de <i>GRIA3</i> en el modelo celular neural humano <i>knockout</i> para MeCP2.	115

2.2.1.1. Análisis de metilación en exones “flip” y “flop” en el modelo celular neural humano <i>knockout</i> para MeCP2	117
2.2.2. Identificación y análisis de <i>circRNAs</i> con expresión alterada en el modelo celular neural <i>knockout</i> para MeCP2.....	119
2.2.2.1. Selección de <i>circRNAs</i> candidatos	121
2.2.2.1.1. Análisis mediante <i>RT-qPCR</i> de la expresión de <i>circRNAs</i> candidatos en el modelo celular neural humano <i>knockout</i> para MeCP2.....	122
2.2.2.1.2. Caracterización de los niveles de expresión de <i>SIRT2</i> en el modelo celular neural humano <i>knockout</i> para MeCP2 ...	124
2.2.2.1.3. Estudio de localización celular de <i>circRNAs</i> en células neurales.....	126
3. Muestras de pacientes <i>post-mortem</i>	129
3.1. Estudio proteómico de muestras <i>post-mortem</i> de hipocampo de pacientes RTT	129
3.2. Análisis de alteraciones en la expresión y edición del ARN de <i>GRIA3</i> en muestras cerebrales <i>post-mortem</i> de pacientes RTT	132
3.2.1. Análisis de metilación en exones “flip” y “flop” en muestras <i>post-mortem</i> de hipocampo de pacientes RTT	136
DISCUSIÓN.....	139
1. Las poblaciones de <i>T-UCRs</i> y <i>circRNAs</i> presentan niveles de expresión alterados en los modelos murino y humano <i>in vitro</i> del Síndrome de Rett	142
2. Integración de distintos modelos de la enfermedad de Rett para el establecimiento de rutas alteradas comunes	146
3. Modelos con supresión de MeCP2 muestran alteraciones en distintos niveles de expresión del gen <i>SIRT2</i>	150
4. <i>GRIA3</i> y <i>T-UCRs 478/479</i> : candidatos potencialmente relevantes en el Síndrome de Rett.....	155
5. Perspectivas de futuro de los ARNs no codificantes en enfermedades del neurodesarrollo	161
CONCLUSIONES	167
REFERENCIAS	171
ANEXOS	197

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de <i>splicing</i> , edición R/G y topología de las subunidades que forman los receptores de glutamato de tipo AMPA	23
Figura 2. Estructura génica y proteica de MeCP2	26
Figura 3. Mutaciones puntuales de MeCP2 recurrentes en pacientes RTT..	28
Figura 4. Funciones moleculares de MeCP2.....	30
Figura 5. Generación de células madre pluripotentes inducidas y posterior diferenciación a células neurales progenitoras a partir de fibroblastos de pacientes RTT.....	35
Figura 6. Mecanismo de regulación de la biogénesis de <i>miR-134</i> por parte de MeCP2 en células neurales.....	41
Figura 7. Clasificación de <i>lncRNAs</i> en función de su origen de transcripción	44
Figura 8. Posibles localizaciones genómicas de las regiones ultraconservadas	46
Figura 9. Origen y mecanismos de acción de los ARNs circulares	50
Figura 10. Modelo de cooperación del <i>lncRNA Evf2</i> y las proteínas Dlx2 y MeCP2 en la regulación de la transcripción de los genes adyacentes <i>DLX5</i> y <i>DLX6</i>	55
Figura 11. Diseño de cebadores para la amplificación de especies circulares por <i>RT-qPCR</i>	72
Figura 12. Análisis del reactoma de genes huésped correspondientes a <i>T-UCRs</i> con expresión alterada en córtex frontal e hipocampo del modelo RTT de ratón.	88
Figura 13. Niveles de expresión relativos de <i>T-UCRs</i> candidatos en córtex frontal e hipocampo de ratones pre-sintomáticos (3-4 semanas) y sintomáticos (8-9 semanas).....	93
Figura 14. Niveles de expresión relativos de genes huésped correspondientes a <i>T-UCRs</i> candidatos en córtex frontal e hipocampo de ratones pre-sintomáticos (3-4 semanas) y sintomáticos (8-9 semanas).	94
Figura 15. Posición relativa de <i>T-UCRs</i> candidatos en referencia a sus genes huésped correspondientes.	95
Figura 16. Organización genómica de los genes <i>Dlx5</i> , <i>Dlx6</i> , <i>Evf2</i> y las regiones ultraconservadas <i>uc.220</i> , <i>uc.221</i> , <i>ei</i> y <i>eii</i>	96
Figura 17. Niveles de expresión relativos de <i>T-UCRs uc.220</i> y <i>uc.221</i> en córtex frontal e hipocampo de ratones pre-sintomáticos (3-4 semanas) y sintomáticos (8-9 semanas).....	98

Figura 18. Niveles de expresión relativos de genes codificantes de la familia <i>Dlx</i> , la vía de <i>Shh</i> y el <i>lncRNA Evf2</i> en córtex frontal e hipocampo de ratones pre-sintomáticos (3-4 semanas) y sintomáticos (8-9 semanas).	99
Figura 19. Representación intrónica/exónica de exones mutuamente excluyentes “flip” y “flop” y <i>T-UCRs uc.478/479</i> en el locus de <i>Gria3</i>	100
Figura 20. Niveles de expresión relativos de <i>T-UCRs uc.478/479</i> , <i>Gria3</i> total y transcritos alternativos <i>flip/flop</i> en córtex frontal e hipocampo de ratones pre-sintomáticos (3-4 semanas) y sintomáticos (8-9 semanas).	101
Figura 21. Cuantificación de los niveles de edición de las variantes <i>flip/flop</i> del gen <i>Gria3</i> en muestras de hipocampo de ratones sintomáticos (8-9 semanas) <i>WT</i> y <i>KO</i> para MeCP2.....	103
Figura 22. Caracterización de la población de <i>circRNAs</i> alterados en regiones de córtex frontal e hipocampo de ratones deficientes para MeCP2.	104
Figura 23. Análisis del reactoma y componente celular de genes huésped correspondientes a <i>T-UCRs</i> con expresión alterada en córtex frontal e hipocampo del modelo RTT de ratón.....	105
Figura 24. Niveles de expresión relativos de <i>circRNAs</i> candidatos y sus genes huésped correspondientes en córtex frontal e hipocampo de ratones pre-sintomáticos y sintomáticos.....	108
Figura 25. Caracterización de los niveles de expresión de <i>Sirt2</i> en córtex frontal e hipocampo de ratones <i>WT</i> y <i>KO</i> para MeCP2.....	111
Figura 26. Modelo celular humano <i>KO</i> para MeCP2.	113
Figura 27. Caracterización de los niveles de expresión de <i>GRIA3</i> y <i>T-UCRs uc.478/479</i> y cuantificación de la edición del ARN de <i>GRIA3</i> en el modelo celular neural humano.....	116
Figura 28. Análisis de metilación en exones “flip” y “flop” del gen <i>GRIA3</i> en el modelo celular neural humano.	118
Figura 29. Caracterización de la población de <i>circRNAs</i> alterados en el modelo celular neural humano.	119
Figura 30. Análisis de reactoma de genes huésped correspondientes a <i>circRNAs</i> con regulación negativa durante el proceso de diferenciación de células <i>WT</i> y <i>KO</i> para MeCP2 en el modelo celular neural humano.....	120
Figura 31. Niveles de expresión relativos de <i>circRNAs</i> candidatos y <i>genes huésped</i> correspondientes en progenitores neurales y células neurales en diferenciación libre <i>WT</i> y <i>KO</i> para MeCP2.....	123
Figura 32. Caracterización de los transcritos circulares y lineal del gen <i>Sirt2</i> en progenitores neurales y células neurales en diferenciación libre <i>WT</i> y <i>KO</i> para MeCP2.....	126
Figura 33. Localización celular de <i>hsa_circ_0050946 (circSIRT2)</i> en células neurales.....	128

Figura 34. Caracterización proteómica en muestras <i>post-mortem</i> de hipocampo de pacientes RTT.....	131
Figura 35. Validación de los niveles de expresión de la proteína S100b en muestras de hipocampo de ratones <i>WT</i> y <i>KO</i> para MeCP2.	132
Figura 36. Caracterización de los niveles de expresión de <i>GRIA3</i> y <i>T-UCRs uc.478/479</i> y cuantificación de la edición del ARN de <i>GRIA3</i> en muestras <i>post-mortem</i> de hipocampos de pacientes RTT.	134
Figura 37. Caracterización de los niveles de expresión de <i>GRIA3</i> y <i>T-UCRs uc.478/479</i> y cuantificación de la edición del ARN de <i>GRIA3</i> en muestras <i>post-mortem</i> de cerebelos de pacientes RTT.	135
Figura 38. Análisis de metilación en exones “flip” y “flop” del gen <i>GRIA3</i> en muestras <i>post-mortem</i> de hipocampo de pacientes RTT.	137
Figura 39. Estudios farmacológicos clínicos y no clínicos y sus mecanismos de acción en Síndrome de Rett.	162

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios de diagnóstico del Síndrome de Rett clásico y variantes atípicas.	18
Tabla 2. Secuencia del ARN guía y su complementaria para la edición génica del gen <i>MECP2</i> mediante el sistema CRISPR/Cas9.	68
Tabla 3. Muestras de tejido cerebral humanas <i>post-mortem</i> usadas en los distintos análisis.	69
Tabla 4. Lista de cebadores empleados para los análisis de expresión por <i>RT-PCR</i> cuantitativa.	77
Tabla 5. Lista de anticuerpos empleados para los análisis de expresión proteica por <i>western blot</i>	79
Tabla 6. Lista de <i>T-UCRs</i> y genes huésped candidatos con niveles de expresión alterados en hipocampo y/o córtex frontal de ratones <i>KO</i> para MeCP2.	92
Tabla 7. Lista de <i>circRNAs</i> y genes huésped candidatos con niveles de expresión alterados en hipocampo y/o córtex frontal de ratones <i>KO</i> para MeCP2.	108
Tabla 8. Lista de <i>circRNAs</i> y genes huésped candidatos con niveles de expresión alterados en células neurales progenitoras y libremente diferenciadas durante 30 días <i>KO</i> para MeCP2.	123

ABREVIACIONES

ABREVIACIONES

A

ADAR	Del inglés, <i>Adenosine deaminase acting on RNA</i>
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AGO	Del inglés, <i>Argonaute</i>
AMPA	Del inglés, <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
APP	Del inglés, <i>Amyloid beta precursor protein</i>
ARN	Ácido ribonucleico
Arx	Del inglés, <i>Aristaless-related homeobox</i>

B

B2m	Del inglés, <i>Beta-2-microglobulin</i>
BA10	Del inglés, <i>Brodman Area 10</i>
BACE1	Del inglés, <i>Beta-secretase 1</i>
BDNF	Del inglés, <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BDNF-AS	Del inglés, <i>Brain-derived neurotrophic factor transcript antisense</i>
Birc6	Del inglés, <i>Baculoviral IAP repeat-containing 6</i>
Btrc	Del inglés, <i>Beta-transducin repeat containing protein</i>

C

Cask	Del Inglés, <i>Calcium/calmodulin dependent serine protein kinase</i>
CDKL5	Del inglés, <i>Cyclin dependent kinase like 5</i>
CDR1	Del Inglés, <i>Cerebellar degeneration related protein 1</i>
ceRNA	Del inglés, <i>Competitive endogenous RNA</i>
circRNA	Del inglés, <i>Circular RNA</i>
C-MYC	
CNIH3	Del Inglés, <i>Cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 3</i>
CPT1b	Del Inglés, <i>Carnitine palmitoyltransferase 1B</i>
CREB	Del inglés, <i>CAMP responsive element binding protein</i>
CRISPR/Cas9	Del Inglés, <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated system 9</i>
CTD	Del inglés, <i>C-terminal domain</i>

D

DGCR8	Del inglés, <i>DiGeorge syndrome critical region gene</i>
DLX1	Del inglés, <i>Distal-less homeobox 1</i>
DLX2	Del inglés, <i>Distal-less homeobox 2</i>
DLX3	Del inglés, <i>Distal-less homeobox 3</i>
DLX4	Del inglés, <i>Distal-less homeobox 4</i>
DLX5	Del inglés, <i>Distal-less homeobox 5</i>

<i>DLX6</i>	Del inglés, <i>Distal-less homeobox 6</i>
<i>Dnah2</i>	Del inglés, <i>Dynein axonemal heavy chain 2</i>
E	
<i>EGF</i>	Del inglés, <i>Epidermal growth factor</i>
eRNA	Del inglés, <i>Enhancer RNA</i>
<i>EZH2</i>	Del inglés, <i>Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit</i>
F	
<i>FGF</i>	Del inglés, <i>Fibroblast growth factor</i>
<i>FOXP1</i>	Del inglés, <i>Forkhead box G1</i>
<i>FOXP1</i>	Del inglés, <i>Forkhead box P1</i>
<i>FOXP2</i>	Del inglés, <i>Forkhead box P2</i>
G	
GABA	Del inglés, <i>Gamma aminobutyric acid</i>
<i>Gabbr2</i>	Del inglés, <i>GABA receptor subunit rho-2</i>
<i>GAPDH</i>	Del inglés, <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
<i>GFP</i>	Del inglés, <i>Green fluorescent protein</i>
<i>Gli3</i>	Del inglés, <i>GLI family zinc finger 3</i>
<i>GRIA1</i>	Del inglés, <i>Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 1</i>
<i>GRIA2</i>	Del inglés, <i>Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 2</i>
<i>GRIA3</i>	Del inglés, <i>Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3</i>
<i>GRIA4</i>	Del inglés, <i>Glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 4</i>
<i>Gsk3b</i>	Del inglés, <i>Glycogen synthase kinase-3B</i>
H	
<i>HDAC3</i>	Del inglés, <i>Histone deacetylase 3</i>
<i>HMGD</i>	Del inglés, <i>High mobility group protein-like domain 1</i>
<i>Hnrph1</i>	Del inglés, <i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H</i>
<i>HSPA12B</i>	Del inglés, <i>Heat shock protein family A member 12B</i>
<i>HULC</i>	Del inglés, <i>Hepatocellular Carcinoma Up-Regulated Long Non-Coding RNA</i>
HuR	Del inglés, <i>Hu Antigen R</i>
I	
ID	Del inglés, <i>Intermediate domain</i>
iPSC	Del inglés, <i>induced pluripotent stem cell</i>

K

<i>KDM1A</i>	Del inglés, <i>Lysine Demethylase 1A</i>
<i>KLF4</i>	Del inglés, <i>Kruppel like factor 4</i>
KO	Del inglés, <i>Knockout</i>

L

<i>LIMK1</i>	Del inglés, <i>LIM domain kinase 1</i>
lincRNAs	Del inglés, <i>long intergenic non-coding RNA</i>
lncRNA	Del inglés, <i>long non-coding RNA</i>
<i>RPL13</i>	Del inglés, <i>Ribosomal protein L13</i>

M

<i>MALAT-1</i>	Del inglés, <i>Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1</i>
<i>Map1a</i>	Del inglés, <i>Microtubule-associated protein 1 A</i>
<i>MAP6</i>	Del inglés, <i>Microtubule-associated protein 6</i>
<i>MAPT</i>	Del inglés, <i>Microtubule-associated protein tau</i>
MBD	Del inglés, <i>Methyl binding domain</i>
MBNL1	Del inglés, <i>Muscleblind Like Splicing Regulator 1</i>
MeCP2	Del inglés, <i>Methyl-CpG-binding protein 2</i>
miRNA	Del inglés, <i>microRNA</i>
<i>Mllt3</i>	Del inglés, <i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 3</i>
mRNA	Del inglés, <i>messenger RNA</i>
mTOR	Del inglés, <i>Mechanistic target of rapamycin kinase</i>

N

NAT	Del inglés, <i>Natural antisense transcript</i>
<i>NCoR</i>	Del inglés, <i>Nuclear receptor corepressor 1</i>
ncRNA	Del inglés, <i>non-coding RNA</i>
<i>NF-κB</i>	Del inglés, <i>Nuclear factor kappa B</i>
NID	Del inglés, <i>NCoR1/2 interaction domain</i>
<i>NMDA</i>	Del inglés, <i>N-methyl-D-aspartate</i>
NTD	Del inglés, <i>N-terminal domain</i>

O

<i>OCT4</i>	Del inglés, <i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
-------------	---

P

<i>PABPN1</i>	Del inglés, <i>Poly(A) Binding Protein Nuclear 1</i>
piRNA	Del inglés, <i>piwi-interactins RNA</i>
<i>Pol I</i>	Del inglés, <i>RNA polymerase I</i>

<i>Pol II</i>	Del inglés, <i>RNA polymerase II</i>
<i>Pol III</i>	Del inglés, <i>RNA polymerase III</i>
pre-miRNA	Del inglés, <i>precursor-microRNA</i>
pri-miRNA	Del inglés, <i>primary-microRNA</i>
<i>PSEN1</i>	Del inglés, <i>Presenilin 1</i>
<i>PUM2</i>	Del inglés, <i>Pumilio RNA binding family member 2</i>

Q

<i>Qk</i>	Del inglés, <i>Quaking</i>
-----------	----------------------------

R

RISC	Del inglés, <i>RNA induced silencing complex</i>
<i>RNF220</i>	Del inglés, <i>Ring finger protein 220</i>
<i>RNU6B</i>	Del inglés, <i>RNA, U6 small nuclear 6</i>
rRNA	Del inglés, <i>ribosomal RNA</i>
RTT	Rett Syndrome

S

<i>SCN1A</i>	Del inglés, <i>Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 1</i>
<i>Sfpq</i>	Del inglés, <i>Splicing factor, proline- and glutamine-rich</i>
<i>Shh</i>	Del inglés, <i>Sonic hedgehog signaling molecule</i>
siRNA	Del inglés, <i>small interfering RNA</i>
<i>SIRT2</i>	Del inglés, <i>Sirtuin 2</i>
<i>SMRT/NCoR2</i>	Del inglés, <i>Nuclear receptor corepressor 2</i>
SNC	Sistema nervioso central
sncRNA	Del inglés, <i>small non-coding RNA</i>
<i>SOX2</i>	Del inglés, <i>SRY-box transcription factor 2</i>
<i>Sox5</i>	Del inglés, <i>SRY-box transcription factor 5</i>
<i>STMN1</i>	Del inglés, <i>Stathmin 1</i>

T

<i>TBR2</i>	Del inglés, <i>T-box brain protein 2</i>
<i>TCF4</i>	Del inglés, <i>Transcription factor 4</i>
<i>TIMP-1</i>	Del inglés, <i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>
<i>Tra2a</i>	Del inglés, <i>Transformer-2 protein homolog alpha</i>
TRD	Del inglés, <i>Transcription repression domain</i>
tRNA	Del inglés, <i>Transfer RNA</i>
T-UCR	Del inglés, <i>Transcribed-ultraconserved region</i>

U

UBE2A Del inglés, *Ubiquitin protein ligase E2A*

UBE3A Del inglés, *Ubiquitin protein ligase E3A*

UBE3A-ATS

UCR Del inglés, *Ultraconserved region*

UTR Del inglés, *Untranslated region*

W

WT Del inglés, *Wildtype*

Y

YB1 Del inglés, *Y-box binding protein 1*

Z

Zeb2 Del inglés, *Zinc finger E-box binding homeobox 2*

RESUMEN

RESUMEN

Diversos estudios transcripcionales actuales ponen de manifiesto la importancia funcional de la porción no codificante de nuestro genoma, observándose un papel crucial en todos los niveles de la regulación génica. Uno de los tipos de ARNs no codificantes en cuyo estudio nuestro grupo se encuentra focalizado son las llamadas regiones transcritas ultraconservadas (*transcribed ultraconserved regions*; *T-UCRs*), transcritos considerados como ARNs no codificantes largos y cuyas secuencias comparten un 100% de homología en humano, ratón y rata. Dichas especies muestran un patrón de expresión específico de tejido, siendo por lo general muy abundantes en el cerebro y, aunque se ha observado que podrían actuar como trans-reguladores antisentido de la biogénesis de microARNs, sus funciones y mecanismos de acción son todavía desconocidos. Por otro lado, datos recientes muestran también la relevancia de ARNs circulares (*circular RNAs*; *circRNAs*) en una gran variedad de enfermedades como el cáncer, enfermedades cardíacas o enfermedades neurológicas, siendo el cerebro el tejido con mayor enriquecimiento de *circRNAs* en relación a otras regiones. Pese a no haberse podido determinar todavía la función biológica de muchas de estas especies, se sabe que podrían tener efectos directos sobre la transcripción lineal o actuar como “esponjas” de microARNs, regulando así la interacción de estos últimos con sus respectivos ARNs mensajeros diana.

En el presente proyecto, se ha buscado diseccionar los respectivos papeles de *T-UCRs* y *circRNAs* en vías relacionadas con la fisiopatología del Síndrome de Rett (RTT), enfermedad severa del neurodesarrollo en la que destacan síntomas como la progresiva pérdida del habla, afectaciones motoras graves, complicaciones cardíacas o una respiración irregular crítica.

Aproximadamente el 90% de casos RTT son debidos a mutaciones causantes de pérdida de función en la proteína MeCP2 (*methyl-CpG-binding protein 2*), considerada principalmente como represor transcripcional por su capacidad de unión a citosinas metiladas en dinucleótidos 5'CpG y con gran variedad de funciones en la regulación de la expresión génica. Una de las consecuencias observadas por la deficiencia de MeCP2 es el desequilibrio entre sinapsis inhibitorias y excitatorias que se establecen en las redes neuronales. GABA y glutamato son, respectivamente, los neurotransmisores inhibitorios y excitatorios predominantes en el cerebro de los mamíferos, por lo que se hace imprescindible el estudio de alteraciones en ambas vías como posibles dianas de tratamiento. Entre los diversos tipos de receptores de glutamato que se conocen se encuentran los de tipo AMPA, cuyas subunidades proteicas son productos codificados por los genes *GRIA1*, *GRIA2*, *GRIA3* y *GRIA4*. Las cuatro subunidades se encuentran sujetas a *splicing* alternativo dándo lugar a variantes mutuamente excluyentes conocidas como *flip/flop*. Además, en los casos de *GRIA2*, 3 y 4 se produce un mecanismo post-transcripcional conocido como edición del pre-ARNm, por el cual se lleva a cabo un cambio aminoacídico (Arg>Gly) capaz de modular las propiedades del receptor.

Datos obtenidos en chips de expresión realizados en el presente proyecto han mostrado alteraciones tanto en la población de ARNs circulares como de regiones transcritas ultraconservadas bajo condiciones de supresión de MeCP2, destacándose un enriquecimiento de sus respectivos genes huésped en rutas asociadas a la función y dinámica del citoesquelético y la neurotransmisión glutamatérgica. Más específicamente, el caso de *GRIA3* es uno de los que mayor interés suscita debido a la desregulación observada en los *T-UCRs uc.478* y *uc.479*, transcritos solapantes de ambos exones alternativos, que

también son contiguos a la zona en la que se produce la edición del pre-ARNm.

El propósito último es explorar la utilidad de *T-UCRs* y *circRNAs* como potenciales dianas terapéuticas y/o biomarcadores de enfermedades neurológicas graves como el Síndrome de Rett.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El Síndrome de Rett

1.1. Patología y criterios de diagnóstico: RTT clásico y variantes atípicas

En 1966, el pediatra de origen austríaco Andreas Rett advirtió por primera vez en 22 jóvenes de sexo femenino un trastorno neurológico progresivo distinto de otras lesiones cerebrales descritas anteriormente^{1,2}. Sin embargo, no fue hasta 1983 cuando el profesor Bengt Hagberg junto a su equipo identificó la misma sintomatología en 35 nuevos casos y dio el nombre a dicha afectación de Síndrome de Rett³, permitiendo así el reconocimiento de la enfermedad en el consorcio médico. A día de hoy, el Síndrome de Rett (RTT; OMIM #312750) es reconocido como un trastorno severo del neurodesarrollo ligado al cromosoma X, siendo la segunda causa más común de retraso mental en el sexo femenino tras el Síndrome de Down⁴ y con una prevalencia aproximada de 1/10000-20000 niñas nacidas vivas⁵. En términos genéticos, la enfermedad de RTT está principalmente causada por la aparición de mutaciones *de novo* en el gen *MECP2* (*methyl-CpG-binding protein 2*)⁶, codificante para la proteína MeCP2 y cuyo papel en el sistema nervioso central (SNC) es esencial.

En lo que se refiere a los criterios diagnósticos de la patología, éstos fueron revisados y redefinidos en el año 2010 por miembros de *RettSearch*, consorcio formado por investigadores de 13 países distintos expertos en la enfermedad⁷ (tabla 1). Generalmente, las pacientes RTT muestran un desarrollo aparentemente normal hasta cumplir entre 6 y 18 meses de vida⁸, aunque ciertas publicaciones demuestran la existencia de algunas indicaciones de la enfermedad en

estadios más tempranos⁹. Tras este primer periodo de supuesta normalidad, las niñas RTT manifiestan una ralentización del crecimiento y una rápida regresión de las habilidades adquiridas, mostrando signos habituales de la enfermedad como la pérdida del habla y el contacto interpersonal, así como la aparición de movimientos estereotípicos repetitivos de las manos y/o rasgos autistas. El deterioro del sistema motor es también uno de los síntomas principales durante la progresión de la afectación, a menudo acompañado por alteraciones cardíacas y respiratorias, convulsiones y escoliosis severa¹⁰.

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS RTT 2010
Requeridos para RTT clásico o típico
<ol style="list-style-type: none"> 1. Período de regresión seguido de recuperación o estabilización 2. Todos los criterios principales y todos los criterios de exclusión 3. Criterios de apoyo no requeridos, aunque a menudo presentes en RTT
Requeridos para variantes RTT atípicas
<ol style="list-style-type: none"> 1. Período de regresión seguido de recuperación o estabilización 2. 2 de los criterios principales 3. 5 de los 11 criterios de apoyo
Criterios principales
<ol style="list-style-type: none"> 1. Pérdida parcial o completa de las habilidades manuales 2. Pérdida parcial o completa del lenguaje hablado 3. Anomalías en la marcha: Deterioro (dispraxia) o ausencia de capacidad 4. Movimientos estereotípicos de las manos como automatismos de retorcerse / apretar las manos, aplaudir / golpear, articular y lavar / frotar
Criterios de exclusión para RTT clásico
<ol style="list-style-type: none"> 1. Daño cerebral secundario al trauma (peri- o post-natal), enfermedad neurometabólica, o infección severa causante de problemas neurológicos 2. Desarrollo psicomotor gravemente anómalo en los primeros 6 meses de vida
Criterios de apoyo para RTT atípico
<ol style="list-style-type: none"> 1. Trastornos respiratorios al despertar 2. Bruxismo al despertar 3. Patrón del sueño alterado 4. Tono muscular anómalo 5. Alteraciones vasomotoras periféricas 6. Escoliosis/cifosis 7. Retraso del crecimiento 8. Manos y pies pequeños y fríos 9. Risas/gritos inapropiados 10. Respuesta al dolor disminuida 11. Comunicación visual intensa-“apuntando a los ojos”

Tabla 1. Criterios de diagnóstico del Síndrome de Rett clásico y variantes atípicas. Los criterios establecidos por el consorcio *RettsSearch* para el diagnóstico del Síndrome de Rett se dividieron en 5 grupos: síntomas requeridos para un diagnóstico de RTT clásico, síntomas requeridos para el diagnóstico de alguna variante atípica de la enfermedad, rasgos principales de la patología, signos que deben ser excluidos en un diagnóstico de Síndrome de Rett clásico y fenotipos comunes en casos de RTT atípico. Adaptada de Neul, J. L. *et al.*, 2010 (7).

En el transcurso del estudio y profundización en las causas y consecuencias del Síndrome de Rett, se han descrito casos de pacientes que no necesariamente presentan todos los signos incluidos en los criterios de diagnóstico de la forma clásica de la afectación (tabla 1). Estos casos fueron clasificados como variantes atípicas, entre las cuales se distinguen tres subgrupos clínicos. En la variante Zappella, como primer ejemplo, se observa una recuperación de algunas habilidades lingüísticas por parte de las pacientes¹¹, mientras que portadoras de la variante Rolando¹² o también llamada variante congénita pueden presentar síntomas más severos que las afectadas por RTT clásico. En el caso de la tercera variante, conocida como variante Hanefeld¹³, se destacan ataques epilépticos sustanciales ya en los primeros meses de vida, lo cual es extremadamente inusual en la forma típica del síndrome.

1.2. Neurobiología de la enfermedad de RTT

La microcefalia y respectiva reducción del volumen cerebral es uno de los rasgos comúnmente descritos en la patología. Dicha malformación se asocia al desarrollo anómalo y mayor empaquetamiento de las células neurales, en las que se observa un tamaño significativamente inferior, así como una menor densidad espinal y complejidad dendrítica¹⁴⁻¹⁶. No obstante, cabe destacar que estudios de imagen por resonancia magnética en pacientes RTT demuestran una reducción diferencial del volumen de algunas zonas cerebrales concretas como los lóbulos parietal y temporal, frente a otras que parecen no estar afectadas como sería el córtex occipital¹⁷.

Por lo que respecta a las alteraciones observadas en la función del SNC, varios modelos RTT presentan deficiencias relevantes en la sinaptogénesis, así como alteraciones importantes en el balance de las

sinapsis excitatorias e inhibitorias (E/I), mecanismo determinante en la correcta actividad de las redes neuronales¹⁸. El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio principal en la transferencia de información en el SNC de mamíferos, mientras que el glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante¹⁹. Para la adecuada regulación de dicha comunicación neuronal son esenciales los receptores de GABA y glutamato, presentes en los terminales sinápticos y capaces de modificar las propiedades de la membrana celular. El correcto equilibrio entre estos dos tipos de neurotransmisión es imprescindible para el adecuado funcionamiento de la actividad neuronal, por lo que las alteraciones en la actividad de ambos sistemas o en su interacción se han asociado a varias patologías neurológicas y psiquiátricas²⁰. En el caso específico del Síndrome de Rett se han podido recapitular varios rasgos de la afectación al promoverse la eliminación selectiva de MeCP2 en neuronas inhibitorias GABAérgicas²¹. Así mismo, la depleción de MeCP2 selectiva en neuronas excitatorias glutamatérgicas da lugar también a diversos fenotipos complementarios observados en modelos RTT²², demostrando la relevancia de ambos sistemas en el desarrollo de la enfermedad.

1.2.1. Receptores de glutamato de tipo AMPA y edición del ARN

Como se ha mencionado, los receptores de glutamato juegan un papel fundamental en la transmisión sináptica excitatoria del SNC de mamíferos. El glutamato se presenta en altas concentraciones en las membranas neuronales post-sinápticas, promoviendo la activación de canales iónicos de tres subtipos: de tipo AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*), de tipo NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) y receptores de Kainato²³.

Concretamente, los receptores de glutamato de tipo AMPA son responsables de la rápida transmisión sináptica excitatoria en el cerebro y se componen a partir del ensamblaje de 4 subunidades distintas (GRIA1-4 o GluA1-4) codificadas por los genes *GRIA1-4* y dispuestas en diversas combinaciones, formando homotetrámeros o heterotetrámeros. En sinapsis glutamatérgicas en hipocampo, por ejemplo, los principales receptores post-sinápticos están compuestos por heterotetrámeros GluA1/GluA2 y GluA2/GluA3. De manera importante, todas las subunidades están sujetas a *splicing* alternativo de dos exones mutuamente excluyentes, dando lugar a dos isoformas conocidas como *flip* y *flop*²⁴ (figura 1A). Dichas variantes muestran distintas propiedades cinéticas, observándose, entre otros ejemplos, un ratio más rápido de desensibilización de la membrana en las subunidades formadas por la variante *flop* que en las isoformas *flip*²⁵.

Además del *splicing* alternativo, la complejidad y variabilidad de las subunidades que forman los receptores de glutamato de tipo AMPA vienen determinadas por un mecanismo conocido como edición del ARN, al que se encuentran sujetos los transcritos de los genes *GRIA2*, *GRIA3* y *GRIA4* en distintas posiciones de su secuencia. Este mecanismo de edición implica modificaciones en sitios puntuales de las moléculas de ARN que no están codificadas en la cadena de ADN original, incrementando así la variabilidad transcripcional en la célula²³. La edición del ARN en células eucariotas es generalmente un mecanismo post-transcripcional de deaminación que convierte Adenosinas (A) en Inosinas (I) o Citidinas (C) en Uridinas (U)²⁶, aunque en mamíferos el proceso más común es la conversión de A en I²⁷. Normalmente, la Inosina es leída por los ribosomas como una Guanosina, pudiendo implicar, en última instancia, el cambio del aminoácido para el cual codifica el codón, siempre y cuando el nucleótido editado se localice en una secuencia codificante.

Esta reacción de edición del ARN es llevada a cabo por un tipo de enzimas denominadas ADAR (*adenosine deaminase acting on RNA*). En mamíferos se han descrito tres tipos de enzimas ADAR: ADAR1, ADAR2 y ADAR3, caracterizadas por presentar distinta distribución subcelular y tisular, así como también diferentes funciones²⁸.

En el caso de las subunidades GluA2-4, se han descrito dos posiciones sujetas a edición del ARN, en las que se produce la conversión aminoacídica de glutamina (Q) a arginina (R) en el primer caso (posición Q/R) y de arginina (R) a glicina (G) en el segundo caso (posición R/G). El cambio en Q/R es específicamente catalizado por ADAR2^{29,30}, mientras que la segunda posición (R/G) puede ser editada por ADAR1 y ADAR2^{31,32}. De manera importante, el cambio R/G se produce dos nucleótidos antes del sitio de *splicing* que da lugar a las variantes *flip* y *flop* (figura 1A), de modo que la edición en esa posición junto con el *splicing* alternativo influyen en las propiedades cinéticas de los receptores. De hecho, estudios en hipocampo de rata muestran que los mecanismos de edición del ARN en la posición R/G y el *splicing* de los exones *flip/flop* se encuentran estrechamente coordinados por la actividad neuronal, observándose además una relación lineal entre los transcritos editados (G) y la inserción del exón “flip”. En referencia a las funciones neuronales, se ha demostrado que aquellos receptores formados por subunidades editadas (G) presentan una mejor recuperación a la desensibilización, generándose canales que responden más rápido a nuevos estímulos de glutamato³³. Además, se ha observado un incremento de los niveles de edición en la posición R/G a medida que se da la maduración neuronal³⁴, así como la posible implicación de los mecanismos de *splicing* y edición del ARN en el transporte de los transcritos de receptores de glutamato de tipo AMPA a las zonas dendríticas, afectando así a la regulación sináptica³⁵.

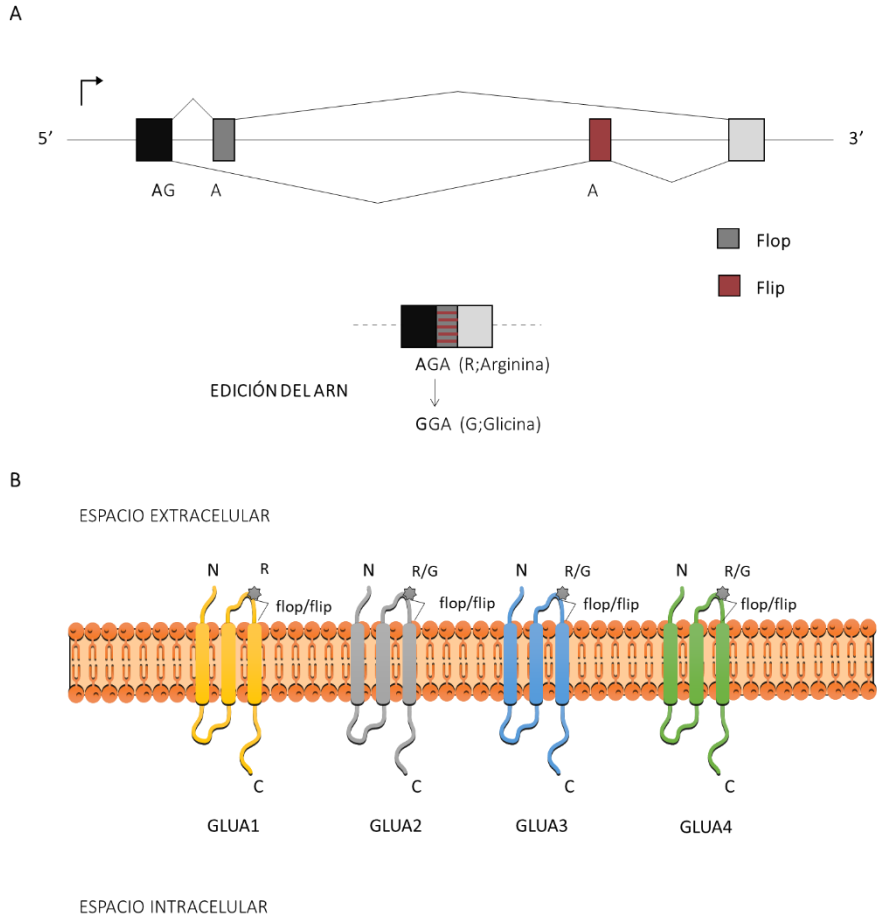


Figura 1. Mecanismos de *splicing*, edición R/G y topología de las subunidades que forman los receptores de glutamato de tipo AMPA. A. Las subunidades GluA1-4 de los receptores de glutamato de tipo AMPA se encuentran sujetas a *splicing* alternativo de dos exones mutuamente excluyentes dando lugar dos variantes distintas llamadas *flip* y *flop*. De manera post-transcripcional, dos nucleótidos antes del sitio de *splicing* que da lugar a las dos isoformas de las subunidades GluA2-4, se lleva a cabo un mecanismo conocido como edición del ARN, produciéndose un cambio aminoacídico de Glicina a Arginina que proporciona distintas propiedades cinéticas a los receptores. B. Las distintas subunidades GluA1-4 disponen de una cola N-terminal extracelular, tres dominios intra-membranales y una cola C-terminal intracelular. Tanto la zona de *splicing* *flip/flip* como la posición de edición R/G se encuentran en el *loop* extracelular de las subunidades proteicas.

Dada la importancia del mecanismo de edición del ARN en los receptores de glutamato para la correcta actividad del SNC, la desregulación de este proceso se ha relacionado, en consecuencia, con casos patológicos severos como la esclerosis lateral amiotrófica³⁶, la esquizofrenia³⁷ o la enfermedad de Alzheimer³⁸. Entre otros ejemplos, datos publicados recientemente relacionados concretamente con la subunidad GluA2 muestran una relación directa entre la aparición de mutaciones puntuales muy cercanas a la zona de edición Q/R del transcrito y la alteración de dicha edición en diversos pacientes con afectaciones del neurodesarrollo³⁹.

1.3. Bases genéticas del Síndrome de Rett

Antes de revelarse la causa genética del Síndrome de Rett, varios autores ya defendieron la idea de que la enfermedad debía resultar de una mutación dominante en alguna región del cromosoma X, pues afectaba casi de forma exclusiva al sexo femenino y los varones hemizigotos morían prematuramente⁴⁰⁻⁴⁴. Hoy sabemos que la forma clásica de la enfermedad es, en su mayoría (aproximadamente el 90% de los casos), consecuencia de mutaciones esporádicas que provocan la pérdida de función en una de las copias del gen *MECP2*, codificante para la proteína MeCP2 (*Methyl-CpG Binding Protein 2*), el cual se encuentra en la región Xq28 del genoma. La alteración de la única copia existente del gen en pacientes masculinos impide el correcto desarrollo neural y provoca, en su mayoría, la no viabilidad de estos casos. No obstante, existen registros de varones afectados por la forma típica de la enfermedad, siendo esto posible en dos situaciones: en pacientes afectados por el Síndrome de Klinefelter (XXY) y que, por tanto, tienen una copia extra no mutada del cromosoma X, o en pacientes portadores de un mosaicismo somático de la mutación del gen⁴⁵⁻⁴⁷.

Por otro lado, en los casos RTT se observa una mayor frecuencia de mutaciones *de novo* en aquellos cromosomas X transmitidos por vía paterna, representando hasta un 94-96% de las copias mutadas. Este hecho demuestra la baja probabilidad de que la descendencia masculina pueda recibir la copia alterada del cromosoma X por vía materna, con lo que algunos autores proponen la existencia de una protección natural del sexo masculino a la forma esporádica del Síndrome de Rett⁴⁸.

Por lo que se refiere a las causas genéticas de las formas atípicas de la enfermedad, se han descrito mutaciones en genes distintos a *MECP2*. En pacientes con las variantes Hanefeld y Rolando, son los genes *CDKL5* y *FOXP1* los que se ven afectados^{49,50}. Sin embargo, la variante Zappella está causada también por la disrupción del gen *MECP2*⁵¹. Por otro lado, gracias a técnicas de secuenciación de nueva generación llevadas a cabo en nuestro grupo, también se han podido detectar mutaciones en otros genes distintos a los mencionados, como por ejemplo *GABBR2*, *SEMA6B* o *CACNA1I*, que por ellas mismas o en combinación parecen ser causa de fenotipos RTT⁵².

1.3.1. Estructura génica y proteica de MeCP2

MECP2 es un gen constituido por 4 exones cuya transcripción y *splicing* alternativo dan lugar a dos transcritos distintos: *MECP2_e1* y *MECP2_e2*. La variante *MECP2_e1* incluye los exones 1, 3 y 4, omitiendo el exón 2, mientras que la variante *MECP2_e2* incluye todos los exones observados a nivel genómico (figura 2).

MECP2_e1, cuyo inicio de traducción se encuentra en el exón 1, se expresa principalmente en el cerebro de mamíferos adultos y parece ser el transcrito más importante para el correcto desarrollo neural. Por otro lado, la variante *e2* contiene su inicio de traducción en el exón 2 y es más abundante en tejidos como la placenta, el hígado y el músculo esquelético. Cabe destacar que la supresión específica de la isoforma *MECP2_e2* no ha mostrado tener relevancia en los fenotipos RTT⁵³. Sin embargo, un estudio reciente sugiere que dicha variante podría compensar de manera parcial la deficiencia de la variante *MECP2_e1*⁴⁶.

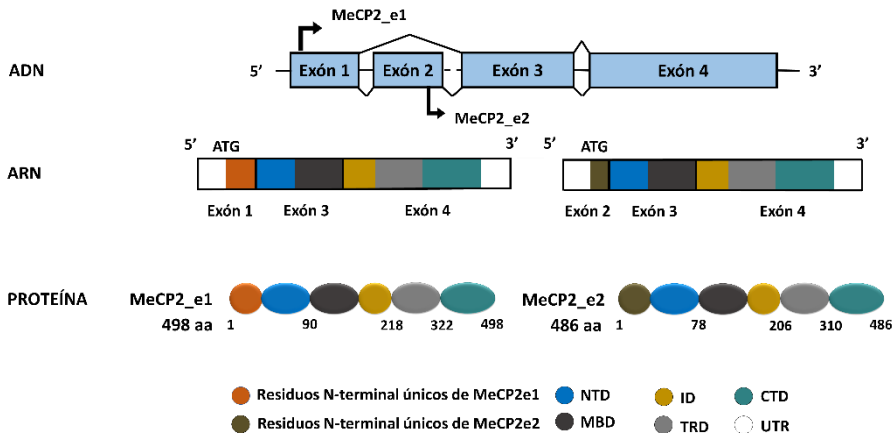


Figura 2. Estructura génica y proteica de MeCP2. El *splicing* alternativo del gen *MECP2* da lugar a dos isoformas distintas: *MECP2_e1* y *MECP2_e2*. MeCP2_e1 contiene 498 aminoácidos y 21 residuos únicos en la zona N-terminal, mientras que MeCP2_e2 contiene 486 aminoácidos y 9 residuos únicos en la zona N-terminal. La secuencia proteica restante es común en las dos isoformas y puede dividirse en los siguientes dominios: dominio N-terminal (NTD), dominio de unión a dinucleótidos CpG metilados (MBD), dominio intermedio (ID), dominio de represión transcripcional y dominio C-terminal (CTD). Parcialmente adaptada de Sharma, K. *et al.*. 2018.

MeCP2 es una proteína nuclear identificada por primera vez en 1992 y cuya característica principal es su capacidad de unión a dinucleótidos CpG metilados en el genoma⁵⁴. En la especie humana, esta proteína se encuentra estructurada en seis dominios bien definidos. El dominio encargado de la unión de la proteína a dinucleótidos CpG metilados fue el primero en ser caracterizado en 1993⁵⁵, recibiendo el nombre en inglés de *Methyl Binding Domain (MBD)*. En 1997 se aisló el segundo dominio funcionalmente relevante de la proteína, formado por los residuos aminoacídicos necesarios para la represión transcripcional y denominado por ello *Transcription Repression Domain (TRD)*. *HMGD1 (High Mobility Group Protein-like Domain 1)*, *HMGD2 (High Mobility Group Protein-like Domain 2)*, *CTD- α (C-Terminal Domain Alpha)* y *CTD- β (C-Terminal Domain Beta)* son los dominios restantes que completan la estructura de la proteína (figura 2).

Por lo que respecta a los niveles proteicos, MeCP2 se expresa ampliamente en todos los tejidos. No obstante, los niveles de esta proteína son relativamente mayores en el cerebro, principalmente en neuronas post-migratorias maduras⁵⁶. A nivel celular, parece mantener una baja expresión durante la embriogénesis y aumentar de manera progresiva a medida que se da la maduración neuronal post-natal^{57,58}.

A día de hoy se han reportado más de 4600 variantes distribuidas a lo largo de la región codificante del gen *MECP2*⁵⁹. La mayoría de mutaciones patogénicas, las cuales representan el 71% de todas las variantes descritas, se encuentran localizadas en los dominios *MBD* (25%) y *TRD* (34%) y suelen englobar mutaciones puntuales de cambio de sentido (*missense*) o sin sentido (*nonsense*), siendo estas últimas causa de la aparición de un producto proteico truncado. Además, cabe destacar la recurrencia de 8 mutaciones específicas, las cuales engloban el 47% de todas las mutaciones observadas en MeCP2: Arg106Trp (R106W), Arg133Cys (R133C), Thr158Met (T158M),

Arg168* (R168X), Arg255* (R255X), Arg270* (R270X), Arg294* (R294X) y Arg306Cys (R306C) (figura 3), donde * representa un codón *stop*.

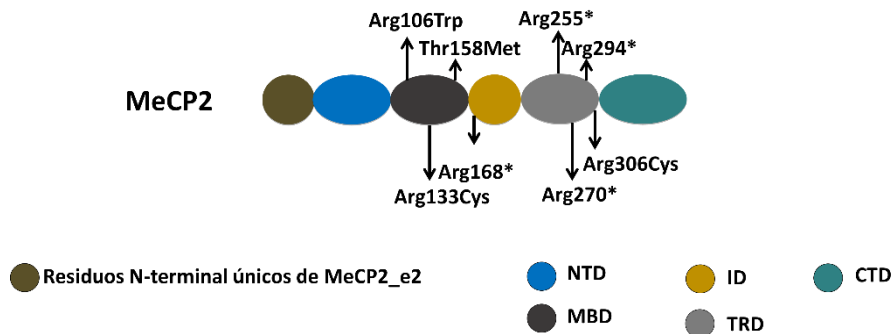


Figura 3. Mutaciones puntuales de MeCP2 recurrentes en pacientes RTT. Las 8 mutaciones más comunes descritas para MeCP2 en pacientes RTT son Arg106Trp, Arg133Cys, Thr158Met, Arg168*, Arg255*, Arg270*, Arg294* y Arg306Cys. Todas se encuentran distribuidas entre los dominios *MBD*, *ID* y *TRD* de la proteína.

1.3.2. Funciones y vías moleculares de MeCP2

MeCP2 ha sido el centro de numerosos estudios enfocados en desenmascarar las funciones y vías moleculares en las que dicha proteína se ve implicada. Varios modelos animales han demostrado la relevancia de MeCP2 para una correcta función neuronal, pues la depleción del gen en modelos de ratón adultos causa defectos muy similares a los observados en pacientes RTT^{60,61}. Notablemente, modelos animales con niveles normales de MeCP2 en el SNC pero escasa expresión en tejidos periféricos no presentan, en general, fenotipos patológicos⁶².

El papel por el cual se identificó y caracterizó por primera vez MeCP2 fue su capacidad de unión a ADN metilado⁵⁴, confirmándose tal función a lo largo de los años mediante gran variedad de técnicas *in vitro*⁶³⁻⁶⁵ e *in vivo*^{66,67}. Por lo que respecta a las zonas de unión de MeCP2 en el genoma de mamíferos, ha sido todo un reto poder delimitarlas con exactitud debido a la gran abundancia de dicha proteína y el alto número de sitios de unión potenciales. Estudios recientes han demostrado que, además de dinucleótidos CG metilados (mCG), MeCP2 es capaz de unirse también a dinucleótidos CA metilados (mCA) e hidroximetilados (hmCA), cuya representación en el genoma del cerebro adulto es particularmente elevada⁶⁸. De hecho, mediante ensayos *in vitro* para identificar las secuencias metiladas no formadas por dinucleótidos CG que fueran susceptibles de unión por parte de MeCP2, se pudieron llegar a limitar las secuencias preferibles a mCA en primer lugar y trinucleótidos mCAC en segundo lugar.

La función y estabilidad de la proteína MeCP2 se pueden ver afectadas por múltiples modificaciones post-traduccionales, incluyendo, entre otras, la fosforilación dependiente de la actividad neuronal^{69,70}. La despolarización de la membrana da lugar a la fosforilación de la Serina 86 (Ser86), la Treonina 148 o Serina 149 (Thr148/Ser149) y la Serina 164 (Ser164) en la proteína, mientras que dicha modificación se pierde en la Serina 80 (Ser80)^{69,71}. Cambios en estos patrones de fosforilación, cuyas posiciones se encuentra cerca o en el mismo dominio *MBD*, parecen ser causa de que la capacidad de unión de MeCP2 al ADN se vea afectada^{71,72}. No obstante, no se han descrito hasta el momento mutaciones asociadas a la patología RTT en sitios de fosforilación dependiente de actividad neuronal, por lo que la relevancia funcional de esta modificación es todavía una incógnita. De manera general, MeCP2 se ha descrito como una proteína multifuncional involucrada en varios procesos de la regulación de la expresión génica en múltiples niveles⁷³,

incluyendo roles en la represión y activación transcripcional⁷⁴, el *splicing* alternativo^{75,76}, la remodelación de la cromatina y el procesamiento de microARNs⁷⁷ (figura 4). Sin embargo, ensayos de depleción y sobreexpresión de MeCP2 demuestran que su función más destacable es su actividad represora y sugieren que la activación transcripcional de diversos genes sería una consecuencia indirecta de los niveles alterados de dicha proteína⁷⁸. Para su acción represora, es necesaria la interacción de MeCP2 con complejos co-represores como NCoR1/SMRT⁷⁹, que a su vez es capaz de reclutar factores como la desacetilasa de histonas 3 (*Histone deacetylase 3; HDAC3*)⁸⁰, cuya función es la eliminación de marcas acetilo para favorecer así una estructura más compacta de la cromatina.

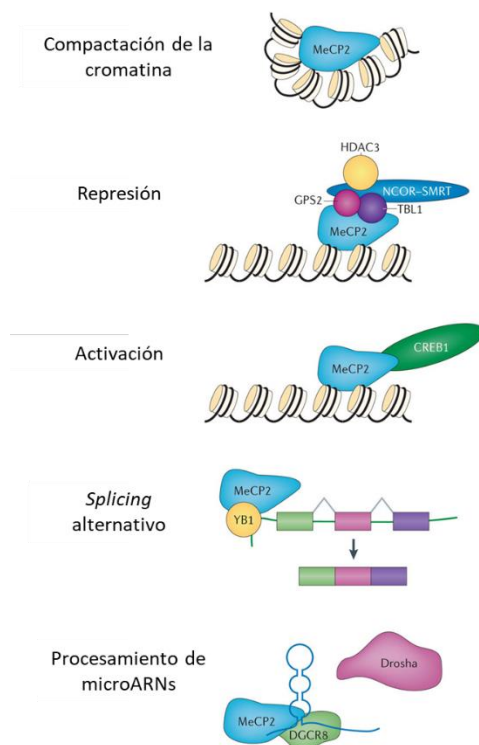


Figura 4. Funciones moleculares de MeCP2.

Se han descrito distintos papeles en los que la proteína MeCP2 se ve implicada. Entre ellos destacan su capacidad para compactar la estructura de la cromatina, su acción represora mediante el reclutamiento del complejo co-represor *NCoR-SMRT*, la activación de la transcripción mediante el reclutamiento del co-activador *CREB1*, la regulación del *splicing* alternativo a través de la interacción del factor de transcripción *YB1* o su papel en el procesamiento de microARNs mediante su interacción con la proteína *DGCR8*. Parcialmente adaptada de Lyst, M.J. y Bird, A., 2015 (75).

Como se ha mostrado anteriormente, la mayoría de las mutaciones mapeadas en MeCP2 causantes del Síndrome de Rett se encuentran en el dominio *MBD* y el extremo C-terminal del dominio *TRD*. Curiosamente, el grupo de mutaciones situadas en la parte C-terminal coinciden con la región de interacción de MeCP2 con el complejo co-represor NCoR1/2 (*NCoR1/2 Interaction Domain; NID*), causando así la disrupción de la actividad represora de la proteína⁸¹. Cabe destacar que varios trabajos cuyo objetivo ha sido desvelar la función principal que ejerce MeCP2 en el SNC y cómo la alteración de ésta puede causar enfermedades devastadoras como el Síndrome de Rett, sugieren un modelo primordial en las bases moleculares de la patología, conocido como modelo puente. Dicho modelo propone que las alteraciones genéticas principales observadas en MeCP2 y causantes de la patología interrumpen su capacidad de reclutamiento del complejo NCoR1/2 en regiones metiladas del genoma, impidiéndose así la correspondiente acción represiva en los genes diana⁸².

2. Modelos RTT

La generación de modelos animales y líneas celulares humanas para los estudios de distintas vías moleculares alteradas en enfermedades neurológicas ha sido y sigue siendo un mecanismo imprescindible en este tipo de patologías, principalmente debido a la dificultad de acceso al tejido cerebral.

En el caso del Síndrome de Rett, se han desarrollado diversos modelos *in vitro* e *in vivo* como herramientas que permitan elucidar los principales aspectos involucrados en la enfermedad y poder así diseñar nuevas estrategias terapéuticas.

2.1. Modelos animales

Con el objetivo de conocer por completo el papel que ejerce MeCP2 en el desarrollo y función cerebral, así como los mecanismos moleculares involucrados en la fisiopatología de la enfermedad de Rett, se han generado varios modelos animales, en su mayoría modelos de ratón.

Los modelos murinos más comunes para el estudio de la enfermedad son aquellos en los que se ha causado la supresión completa de la proteína MeCP2. En 2001 se obtuvo el primer ratón *KO* para *Mecp2* mediante la delección de los exones 3 y 4 del gen con el uso de la tecnología *Cre-LoxP*⁸³. Por otro lado, se desarrolló también una línea de ratón generada a partir de la delección única del exón 3, la cual mostraba de nuevo un fenotipo idéntico al primer modelo, demostrando que la eliminación del exón 3 es suficiente para inducir la supresión de la proteína⁸⁴ y replicar los respectivos síntomas. En 2006, Pelka *et al.* generaron otra línea de ratón nulo para MeCP2 a través de la eliminación del dominio de unión a CpGs metiladas (*MBD*), así como la alteración del dominio de represión transcripcional (*TRD*) a través de la modificación de un sitio de *splicing*⁸⁵.

Además de modelos con supresión completa de la proteína, muchos grupos han desarrollado modelos en los que se han inducido mutaciones puntuales en el gen *Mecp2* relacionadas con la enfermedad de Rett. Entre otras, seis de las mutaciones más comunes en pacientes RTT tienen a día de hoy su correspondiente línea de ratón (R106W, R133C, T158M, R168X, R255X y R306C)⁸⁶.

Finalmente, también se dispone de algunos modelos de ratón de Síndrome de Rett en los que se ha provocado la eliminación condicional (*KO* condicional) de MeCP2 con el uso de la herramienta *Cre-loxP*, restringiendo la depleción de la proteína en tipos específicos de células neurales^{21,87-91}.

Es importante tener en cuenta que, aunque los modelos animales no reflejan de manera exacta las condiciones fisiopatológicas observadas en pacientes humanos, son una herramienta extraordinariamente valiosa, ya que son capaces de recapitular muchos de los síntomas clínicos y alteraciones moleculares y celulares observados en los afectados⁸⁶. Además, dichos modelos permiten también el estudio de la enfermedad en fases pre-sintomáticas, descifrando así posibles biomarcadores de diagnóstico prematuro relevantes para potenciales tratamientos que podrían paliar algunos fenotipos RTT desde la infancia⁹². Cabe destacar que muchos grupos de investigación eligen trabajar, pese a tratarse de una enfermedad predominante en el sexo femenino, con ratones macho hemizigotos (MeCP2^{-y}) en lugar de hembras heterocigotas (MeCP2⁻⁺) por dos razones principales. Por un lado, las hembras presentan un patrón mosaico de expresión de MeCP2 mutado debido a la inactivación de uno de los cromosomas X por un mecanismo de compensación de dosis génica, siendo por ello un modelo mucho más complejo para los estudios experimentales⁹³. Por otro lado, los ratones de sexo masculino desarrollan un fenotipo RTT severo mucho antes que las cepas de sexo femenino⁹⁴, facilitando así el estudio del desarrollo de la enfermedad en tiempos más reducidos. No obstante, es importante ser conscientes de que los modelos animales hembra mutantes para MeCP2 son los más relevantes a nivel clínico para el estudio de enfermedades ligadas al cromosoma X como es el Síndrome de Rett.

Por lo que respecta a otros animales, también se han desarrollado modelos RTT de rata⁹⁵, de *zebrafish*⁹⁶, de mosca⁹⁷ e incluso se dispone de un modelo primate no-humano⁹⁸.

2.2. Modelos celulares humanos *in vitro*

Pese a la gran utilidad de los modelos animales para dilucidar vías potencialmente alteradas en un gran número de enfermedades, así como el desarrollo de terapias o estrategias de diagnóstico, es imprescindible la verificación de la información obtenida en modelos humanos. Hasta el momento, el traslado del conocimiento obtenido en modelos animales a pacientes es limitado, pues las estrategias terapéuticas existentes no cuentan todavía con la efectividad necesaria pese a las constantes propuestas y esfuerzos dedicados a tratamientos derivados de los datos observados en modelos animales. Es por ello por lo que ha sido necesaria la generación de líneas celulares humanas *in vitro* que “imitan” las alteraciones observadas en pacientes de esas patologías. Especialmente en condiciones neurológicas, en las que el acceso al tejido afectado es por el momento inviable, excepto mediante el uso de muestras *post-mortem*, la generación de líneas celulares pluripotentes inducidas (*induced pluripotent stem cells; iPSCs*) a partir de células humanas somáticas ha resultado ser un sistema realmente útil⁹⁹.

En referencia al Síndrome de Rett, las primeras *iPSCs* generadas a partir de ratones y pacientes humanas RTT se llevó a cabo en 2009¹⁰⁰. Sin embargo, el primer grupo que hizo uso de tal herramienta como modelo de la enfermedad fue el liderado por Marchetto en 2010¹⁰¹, trabajo en el cual se generaron neuronas derivadas de *iPSCs* reprogramadas a partir de fibroblastos obtenidos de cuatro pacientes RTT con distintas mutaciones en *MECP2* (figura 5).

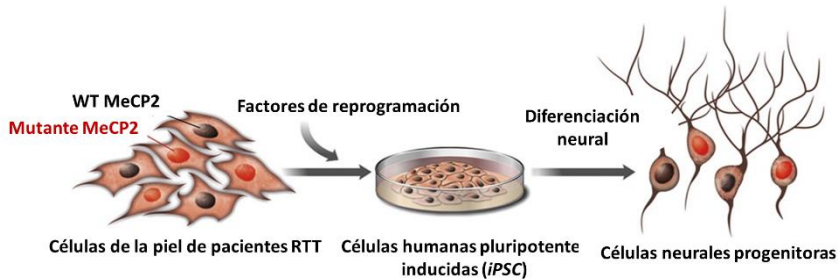


Figura 5. Generación de células madre pluripotentes inducidas y posterior diferenciación a células neurales progenitoras a partir de fibroblastos de pacientes RTT. Las células fibroblásticas aisladas de niñas RTT con cuatro mutaciones distintas en MeCP2 fueron infectadas con vectores retrovirales de reprogramación (Sox2, Oct4, c-Myc y Klf4), generándose así *iPSCs*. Mediante protocolos de diferenciación neural de dichas células pluripotentes se pudieron obtener finalmente células neurales que reproducían las condiciones genéticas de las pacientes. Parcialmente adaptada de Marchetto *et al.*, 2010 (101).

En 2015, Dijuric *et al.* desarrollaron por primera vez una línea neuronal derivada de *iPSCs* a partir de células de una paciente RTT con mutación específica de la isoforma e1 de MeCP2¹⁰². Por otro lado, en un estudio realizado en astrocitos derivados de *iPSCs* RTT se demostraba el efecto directo que puede tener dicha línea celular sobre las neuronas y la capacidad de éstos de inducir alteraciones en la patología¹⁰³.

Todos estos modelos han permitido la obtención de líneas neurales que exhibían rasgos genéticos y fenotípicos característicos de la enfermedad, siendo la reducción de las espinas dendríticas y del soma, la alteración electrofisiológica, la disminución del número de sinapsis¹⁰¹ o los defectos en la maduración neuronal¹⁰⁴ varios ejemplos de ello. Es importante destacar que las *iPSCs* de pacientes de sexo femenino mantienen la memoria epigenética de sus tejidos originarios como el patrón de inactivación del cromosoma X¹⁰⁵, lo que permite la reproducción específica de la enfermedad en cada paciente y, por tanto, la posibilidad de acceder a tratamientos más personalizados.

Finalmente, un trabajo reciente ha descrito la generación de una línea neuronal humana en la que se había llevado a cabo la introducción de cuatro mutaciones puntuales en el gen *MECP2*, todas ellas relacionadas con el desarrollo del Síndrome de Rett, a través del uso de la herramienta *CRISPR/Cas9*¹⁰⁶. Este sistema permite a la comunidad investigadora acercarse a la realidad de las enfermedades neurogenéticas de un modo más simple y manipulable.

3. El ARN no codificante

Las técnicas y análisis transcripcionales desarrollados a lo largo de los últimos años han permitido poner de manifiesto la importancia funcional de la porción no codificante de nuestro genoma, observándose un papel crucial en todos los niveles de la regulación génica¹⁰⁷. Dicha indicación ha suscitado un mayor interés por parte de la comunidad científica respecto al mal denominado “ADN basura”, resultando en la aparición de múltiples estudios cuyo propósito principal ha sido desvelar los papeles y mecanismos en los que el ARN no codificante (*non-coding RNA; ncRNA*) se encuentra involucrado. Pese a encontrarnos todavía muy lejos de alcanzar un conocimiento completo de todo lo que envuelve al transcriptoma no codificante, su implicación en diferentes etapas de la regulación de la expresión génica ha sido ampliamente demostrada, incluyendo su relevancia en el control transcripcional y reestructuración de la cromatina, en el procesamiento dado por mecanismos como el *splicing* o la edición génica, e incluso a nivel traduccional. No es, por tanto, sorprendente que dichos transcritos puedan verse involucrados de manera sustancial en diversas enfermedades humanas, incluyendo varios desórdenes neurológicos¹⁰⁸.

Generalmente, los ARNs no codificantes se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo con su tamaño: ARNs no codificantes pequeños (*small non-coding RNAs; sncRNA*), cuya longitud es menor a 200 pares de bases, y ARNs no codificantes largos (*long non-coding RNAs; lncRNAs*), formados por más de 200 pares de bases. Los *sncRNAs* han sido los mejor caracterizados tanto a nivel estructural como funcional y, aunque tradicionalmente sólo se consideraban parte de este grupo los ARNs de transferencia (*transfer RNA; tRNA*), ARNs pequeños nucleares (*small nuclear RNAs; snRNAs*), ARNs pequeños nucleolares (*small nucleolar RNAs; snoRNAs*) y ARNs ribosomales (*ribosomal RNA; rRNA*), hoy en día se destacan principalmente tres subgrupos: los microARNs (*microRNAs; miRNAs*), ARNs asociados a PIWI (*piwi-interactins RNAs; piRNAs*) y ARNs pequeños de interferencia (*small interfering RNA; siRNAs*)¹⁰⁹. Por lo que respecta a los *lncRNAs*, su clasificación resulta complicada debido a la alta variabilidad en su estructura y funcionalidad. No obstante, el conocimiento cada vez mayor de las funciones llevadas a cabo por varias de estas moléculas ha permitido a algunos autores agrupar dichas especies en base a sus mecanismos de acción^{110–112}.

3.1. ARNs no codificantes pequeños (*sncRNAs*): el caso de los microARNs (*miRNAs*)

3.1.1. Biogénesis de los miRNAs

Los microARNs o *miRNAs* forman el conjunto de ARN no codificante más estudiado tanto en condiciones de normalidad como en un contexto de enfermedad. Dichas especies son descritas como moléculas con una longitud media de 22 nucleótidos y una función esencial en la regulación de la expresión génica.

Generalmente, los *miRNAs* actúan como represores directos uniéndose por complementariedad de bases al extremo no traduccional 3' (*3'UTR*) de sus ARN mensajeros (*messenger RNAs; mRNAs*) diana¹¹³, aunque datos recientes muestran también un papel activador bajo condiciones específicas^{114,115}. En humanos, las secuencias que dan lugar a los *miRNAs* se encuentran generalmente en intrones tanto de genes codificantes como no codificantes¹¹⁶. No obstante, también pueden localizarse en regiones exónicas o intergénicas¹¹⁷ del genoma. Además, con frecuencia se pueden encontrar secuencias de distintos *miRNAs* agrupadas formando unidades transcripcionales policistrónicas o *clusters*.

Por lo que respecta a su biogénesis, los *miRNAs* son sintetizados a partir del ADN genómico por las polimerasas de ARN II y III (*Pol III/Pol III*)^{118,119} y pueden ser procesados a través de dos vías distintas, conocidas como vía canónica y vía no canónica. En la vía canónica, que es la predominante, la transcripción da lugar a un primer transcrito conocido como microARN primario o *pri-miRNA*, una molécula larga (muchas veces mayor a 1 kb) cuya estructura se encuentra formando un lazo o *loop* y dejando los extremos 3' y 5' en forma de cadena sencilla de ARN¹²⁰. El *pri-miRNA* es reconocido y procesado en el núcleo por el complejo microprocesador, formado por la ribonucleasa de tipo III Droscha y otra proteína de unión a ARN conocida como *DGCR8* (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*)^{121,122}. La escisión producida por Droscha da lugar al microARN precursor o *pre-miRNA*, el cual es exportado al citoplasma mediante un complejo formado por la exportina 5 y RanGTP. Allí, el proceso de maduración se completa gracias a la acción de la RNasa III *Dicer*, que elimina el lazo o *loop* terminal del *pre-miRNA* y genera un dúplex de 22 nucleótidos al que se conoce ya como microARN maduro¹²³. Finalmente, una de las cadenas que forma el dúplex se unirá a una de las proteínas que forman la familia Argonauta

(AGO), generándose así el complejo *RISC* (*RNA induced silencing complex*), mientras la otra cadena del dúplex, llamada cadena pasajera, es degradada. Una vez formado el complejo *RISC*, el *miRNA* maduro de cadena simple es capaz de interactuar de manera parcialmente complementaria con sus *mRNAs* diana provocando, generalmente, la degradación de dichos transcritos o la inhibición de su traducción.

3.1.2. *miRNAs* en enfermedades neurológicas

El uso de modelos animales cuya biogénesis de microARNs ha sido específicamente comprometida han desvelado un papel esencial de dichos transcritos en el desarrollo y función del cerebro^{124,125}. Asimismo, la abundancia y la especificidad espacio-temporal de *miRNAs* en el cerebro observadas en diversos estudios transcriptómicos demuestran la relevancia de la función reguladora de éstos durante el desarrollo neuronal, desde la neurogénesis en los estadios más tempranos hasta la sinaptogénesis, así como el mantenimiento de la correcta funcionalidad neural^{126,127}. Sin embargo, pese a que se estima que aproximadamente un 70% de todos los *miRNAs* maduros descritos en humanos se expresan en el sistema nervioso¹²⁸, solo una pequeña porción de estos transcritos han sido completamente caracterizados. Algunos de esos ejemplos son el *miRNA miR-92*, cuyo gen diana principal (*TBR2*) está directamente relacionado con el grosor del córtex cerebral¹²⁹; los *miRNAs miR-9* y *miR-124*, identificados como dos de los *miRNAs* más abundantes en el cerebro y cuyo papel en la diferenciación de los diferentes linajes neurales ha sido demostrado¹³⁰; o *miRNAs* como *miR-129* y *miR-219*, con funciones importantes en la plasticidad y regulación sináptica^{131,132}.

Dada la significancia funcional de un gran número de especies de *miRNAs* en el sistema nervioso, no es sorprendente que muchos se encuentren desregulados en varias enfermedades neurológicas. En el caso concreto del Síndrome de Rett, diversos trabajos evidencian niveles alterados de la población de *miRNAs* en modelos en los que la expresión de MeCP2 se ve afectada¹³³⁻¹³⁵. Uno de los casos más interesantes es el aumento de los niveles transcripcionales de los *miRNAs* 30a, 381 y 495 en muestras de cerebelo de ratones *KO* para MeCP2 con 6 semanas de edad, pues dichos *miRNAs* ejercen una función reguladora sobre el gen *Bdnf*¹³⁵. BDNF es una de las neurotrofinas mejor caracterizadas por su esencial implicación en la modulación de varios aspectos del desarrollo neuronal, así como la transmisión sináptica y la plasticidad neural^{136,137}. Es por ello por lo que dicha proteína se ha visto directamente afectada en gran variedad de enfermedades neuropsiquiátricas, neurodegenerativas y del neurodesarrollo, incluyendo en este último grupo el Síndrome de Rett, donde los niveles de BDNF se encuentran anormalmente reducidos¹³⁸. Otro *miRNA* cuya expresión se ve afectada por los niveles de MeCP2 es *miR-137*. Dicho *miRNA* está involucrado en la regulación de la diferenciación y proliferación de células madre neurales y se ha demostrado su activación bajo condiciones de deficiencia de MeCP2¹³³.

Por otro lado, estudios recientes muestran la capacidad de MeCP2 de regular la expresión génica no solo a través de su unión a ADN metilado y el reclutamiento de represores transcripcionales, sino también mediante su actuación directa en el procesamiento de *miRNAs* en neuronas⁷⁷. El mecanismo descrito por los autores sugiere la capacidad de interacción de MeCP2 con la proteína DGCR8, compitiendo así con Drosha por la unión a dicha proteína y evitando la correspondiente formación del complejo microprocesador, lo que resulta en la interrupción de la biogénesis y consecuente disminución de los niveles

de varios *miRNAs*. Esta situación se da bajo condiciones específicas de reposo neuronal, en las que la Serina 80 (Ser80) de MeCP2 se encuentra fosforilada y la afinidad de ésta por *DGCR8* se ve aumentada. Por el contrario, la despolarización de la membrana neuronal provocaría la desfosforilación de Ser80 de MeCP2 y la “desrepresión” del mecanismo de procesamiento de *miRNAs* (figura 6). Como ejemplo, los autores demuestran en el mismo trabajo una correlación negativa entre los niveles de MeCP2 fosforilado y los del *miRNA miR-134*, indicando la necesidad de MeCP2 fosforilado para la desregulación del procesamiento de dicho *miRNA*. La alteración de la biogénesis de *miR-134* provocaría un cambio en los niveles de sus *mRNAs* diana, entre los que se encuentran *CREB*, *LIMK1* y *PUM2* y cuyo papel en el desarrollo y plasticidad neural es crítico^{126,139,140}.

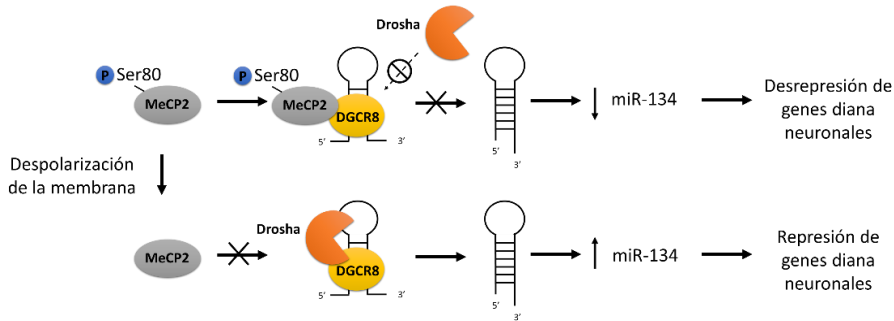


Figura 6. Mecanismo de regulación de la biogénesis de *miR-134* por parte de MeCP2 en células neuronales. En condiciones de reposo, MeCP2 fosforilado en Ser80 es capaz de unirse a la proteína DGCR8 y prevenir la escisión de Drosha, resultando en la disminución de los niveles de *miR-134* y la consecuente “desrepresión” de ciertos genes diana neuronales. Bajo despolarización neuronal, se produce la desfosforilación de MeCP2 y la liberación de DGCR8 permite el procesamiento más eficiente de los *pri-miRNAs*.

Otro *miRNA* cuyo procesamiento parece ser regulado, en este caso de manera positiva, por MeCP2 es *miR-199a*. Los niveles alterados de MeCP2 contribuyen a la desregulación de *miR-199a*, de modo que la vía de señalización de mTOR, imprescindible en el control de la actividad neuronal y la conectividad sináptica y en la cual dicho *miRNA* está directamente implicado, se ve afectada¹⁴¹. En sentido opuesto, se ha demostrado también la regulación post-transcripcional de MeCP2 por parte de varios *miRNAs*. Algunos ejemplos son el *miRNA* miR-130a¹⁴², implicado en la regulación del crecimiento de las neuritas y la densidad de la espina dendrítica; *miR-132*¹⁴³, con un papel importante también en la regulación de la maduración dendrítica; *miR-200a* y *miR-302*¹⁴⁴.

Finalmente, es importante mencionar el relevante papel de algunos *miRNAs* en la regulación de los niveles de MeCP2 durante el desarrollo. En este conjunto se destacan transcritos como *miR-483-5p*, cuya unión específica al ARN mensajero de *MECP2* parece mantener la baja expresión de la proteína en estadios fetales¹⁴⁵, así como el *miR-132*, en este caso con una importante función en la regulación de MeCP2 durante periodos post-natales^{146,147}.

3.2. ARNs no codificantes largos (*lncRNAs*)

Generalmente, aquellos ARNs con un tamaño mayor a 200 pares de bases y sin capacidad de ser traducidos a proteína son clasificados como ARNs no codificantes largos (*lncRNAs*)¹⁴⁸. No obstante, pese a que estudios previos reconocían los *lncRNAs* como transcritos no codificantes, trabajos recientes muestran la existencia de *lncRNAs* con marcos de lectura abiertos, lo que sugiere que sí podrían ser moléculas potencialmente traduccionales¹⁴⁹.

La mayoría de *lncRNAs* se transcriben mediante la acción de la ARN polimerasa II, aunque algunos de ellos lo hacen mediante la ARN polimerasa III. Del mismo modo que los ARNs mensajeros, también disponen de cola poli-A y cabeza 5', además de poder estar sujetos a *splicing* alternativo¹⁵⁰. Dichos transcritos poseen una pobre conservación evolutiva en lo que a secuencia se refiere, por lo que se podría pensar que la mayoría de ellos no ejercen un papel biológico relevante. No obstante, se ha observado una mayor especificidad tisular y celular en la expresión de los *lncRNAs* en comparación con los ARNs codificantes para proteína¹⁵¹. En muchos casos, existe la idea generalizada de que la importancia funcional de dichos transcritos radica en su estructura, mientras otros defienden que su transcripción ya es motivo de relevancia, cosas que no se reflejan en una conservación de la secuencia nucleotídica.

Los ARNs no codificantes largos forman un grupo ampliamente heterogéneo cuyo papel se encuentra lejos de ser completamente caracterizado¹⁵² y la clasificación de los cuales ha sido siempre un reto. Una de las categorizaciones clásicas usadas para agrupar los *lncRNAs* se basa en la localización en la que dichos transcritos ejercen su función en relación a su propio lugar de transcripción, distinguiéndose así dos grupos distintos¹⁵³: ARNs que actúan en *cis* (*cis-acting RNAs*), es decir, cuya actividad se da en y dependientemente de las posiciones a partir de las cuales se transcriben; ARNs que actúan en *trans* (*trans-acting RNAs*), cuya función es ejercida en lugares distintos e independientes de sus lugares de transcripción.

Por lo que se refiere a su origen de transcripción, hoy en día se distinguen hasta siete grupos distintos: ARNs intrónicos, ARNs originados a partir de elementos de ADN como potenciadores o promotores, ARNs antisentido, ARNs "sentido" o *sense*, ARNs intergénicos y ARNs bidireccionales (figura 7).

Por otro lado, también se han observado distintas clases de *lncRNAs* teniendo en cuenta su estructura, a partir de la cual se destacan dos grandes grupos: los *lncRNAs* lineales y aquellos cuyo esqueleto es circular (*circular RNAs*; *circRNAs*). Entre los lineales, un caso especial es el de los ARNs transcritos a partir de regiones ultraconservadas (*transcribed ultraconserved regions*; *T-UCRs*), cuya secuencia es completamente idéntica en humano, ratón y rata.

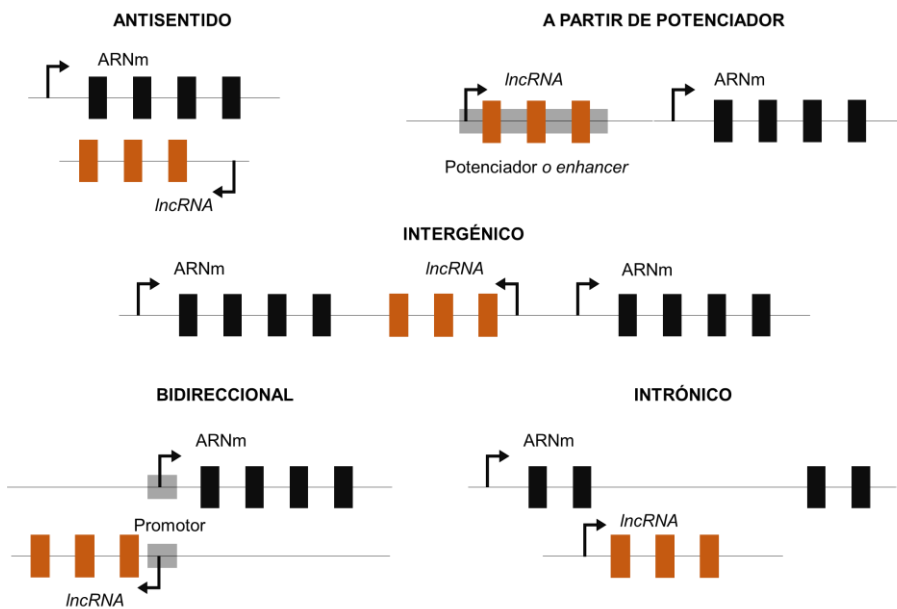


Figura 7. Clasificación de *lncRNAs* en función de su origen de transcripción. Los ARNs antisentido se transcriben a partir de la cadena opuesta y es solapante a la secuencia del gen codificante. Los *lncRNAs* transcritos a partir de potenciadores se localizan en regiones potenciadoras o *enhancers*. Los *lncRNAs* intergénicos se sitúan en regiones genómicas entre genes. Los bidireccionales se encuentran en la cadena opuesta al gen codificante, cuyo inicio de transcripción se encuentra a menos de 1000 bases de distancia. Los *lncRNAs* intrónicos se localizan en regiones intrónicas de genes codificantes.

Debido su elevada conservación y facilitándose así la transferencia de conocimiento entre modelos de estudio, el presente proyecto se centra en la capacidad reguladora de las poblaciones de ARNs transcritos a partir de regiones ultraconservadas (*T-UCRs*) y ARNs circulares (*circRNAs*), especialmente en vías moleculares relacionadas con MeCP2 y relevantes en enfermedades del neurodesarrollo como el Síndrome de Rett.

3.2.1. Regiones transcritas ultraconservadas (*T-UCRs*)

En 2004, Gill Bejerano y su equipo describieron por primera vez la presencia de 481 segmentos genómicos cuya longitud superaba los 200 pares de bases y la secuencia de los cuales se encontraba 100% conservada al comparar regiones ortólogas de genomas de humano, rata y ratón¹⁵⁴, denominando dichos elementos como regiones ultraconservadas (*ultraconserved regions; UCRs*). Notablemente, dichas regiones parecen no acumular mutaciones en células somáticas ni siquiera bajo condiciones de inestabilidad genómica¹⁵⁵. Por lo que respecta a su distribución, se han mapeado *UCRs* en todos los cromosomas, excepto en el 21 y el cromosoma Y. Además, se encuentran situados especialmente cerca de genes que codifican para factores de transcripción expresados durante la embriogénesis¹⁵⁶, lo que sugiere una probable función relevante en la regulación de la expresión de genes vitales para el desarrollo. No obstante, pese a la idea de un papel esencial por parte de dichos elementos en el desarrollo, la depleción de cuatro potenciadores ultraconservados en un estudio realizado en ratones no mostró ningún tipo de fenotipo deletéreo aparente en estos animales¹⁵⁷. Por su parte, Dickel *et al.* centraron su estudio en las consecuencias *in vivo* que podían resultar de la depleción de ciertos elementos ultraconservados inusualmente

largos y muy próximos al gen *Arx* (*Aristaless-related homeobox*), en el cual se han descrito mutaciones causantes de diversos fenotipos neurológicos severos^{158,159}. Sorprendentemente, los resultados de dicho estudio daban lugar, de nuevo, a ratones viables y fértiles¹⁶⁰. No obstante, sí se pudieron observar ciertas anomalías no letales como el crecimiento reducido de los animales o un desarrollo del cerebro deficiente.

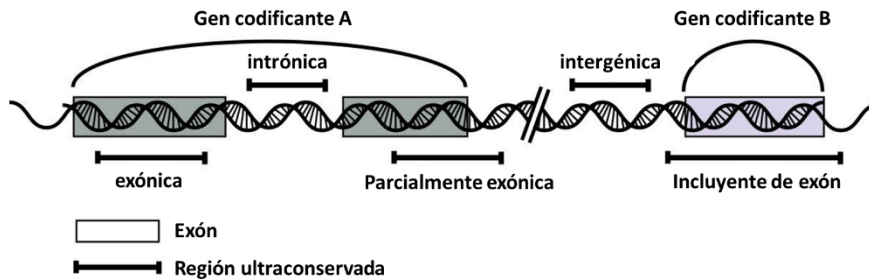


Figura 8. Posibles localizaciones genómicas de las regiones ultraconservadas. Dichos segmentos se han encontrado en cinco situaciones distintas a lo largo del genoma: completamente dentro de un exón, en regiones intrónicas, ocupando parte de un exón y de un intrón, en zonas intergénicas o incluyendo un exón completo en su secuencia.

En base a la localización de las regiones ultraconservadas en el genoma, éstas se pueden clasificar en cinco grupos distintos: exónicas, intrónicas, intergénicas, parcialmente exónicas o incluyentes de exón (figura 8).

Los productos originados a partir de la transcripción de estos elementos se conocen como regiones transcritas ultraconservadas (*Transcribed-Ultra Conserved Regions; T-UCRs*) y representan aproximadamente el 93% de las *UCRs* en humanos¹⁶¹. Estos elementos pueden ser, además, generados en la misma dirección en la que se transcriben sus genes huésped, siendo entonces transcritos “sentido” o *sense*, o pueden ser transcritos en dirección opuesta, recibiendo el nombre de transcritos anti-sentido o *anti-sense*¹⁶².

Curiosamente, pese a que los *T-UCRs* son clasificados como *lncRNAs*, su extrema conservación en cuanto a secuencia no coincide con lo generalmente observado en este tipo de ARNs. Además, los patrones de expresión de los *lncRNAs* específicos de tejido o especie se han correlacionado positivamente con el grado de conservación de su secuencia, por lo que se sugiere que los *T-UCRs* podrían expresarse simultáneamente en múltiples tejidos o especies¹⁶³.

Por lo que respecta a las funciones de las regiones transcritas ultraconservadas, se ha demostrado, especialmente en modelos tumorales, el papel de éstas en la regulación génica a través de distintos mecanismos de acción. En primer lugar, varios estudios han revelado la capacidad de ciertos *T-UCRs* de interactuar de manera directa con *mRNAs* diana. *T-UCRs* como *uc.338* y *uc.454* son dos ejemplos de regulación negativa por interacción directa con las regiones 3'UTR de sus respectivos *mRNAs* diana, *TIMP-1* y *HSPA12B*^{164,165}, genes notablemente implicados en cáncer colorrectal y cáncer de pulmón de células pequeñas, respectivamente. También se ha demostrado la capacidad de unión directa de *uc.323* al gen *EZH2*, favoreciéndose así la transcripción del gen *CPT1b* y resultando en la mejora de la hipertrofia de miocitos cardíacos¹⁶⁶.

Por otro lado, los *T-UCRs* son capaces de unirse también a algunos *miRNAs* y modular así los niveles de los transcritos regulados por éstos. Un ejemplo es el caso de *uc.173*, capaz de provocar la degradación del *miRNA miR-291a-3p* e inhibir la apoptosis en células neurales¹⁶⁷. Como ejemplo de otro mecanismo de regulación por parte de las regiones transcritas ultraconservadas, un estudio llevado a cabo en nuestro grupo describía en 2014 la interacción entre *uc.283A* y el transcrito inmaduro *pri-miR-195*, evitando de esta manera el procesamiento de éste por parte del complejo formado por Drosha y DGCR8¹⁶⁸.

Pese al escaso conocimiento del que se dispone todavía respecto a los mecanismos y vías en los que los elementos ultraconservados se ven implicados, el número significativo de *T-UCRs* desregulados en enfermedades humanas parece sugerir su importancia en procesos fisiológicos y fisiopatológicos. En particular, la alteración de éstos transcritos no codificantes ha sido ampliamente asociada con procesos carcinogénicos^{169,170}, identificándose *T-UCRs* fuertemente implicados en diferentes tipos de cáncer como el neuroblastoma¹⁷¹, la leucemia linfocítica crónica¹⁶¹, el cáncer de próstata¹⁷², el cáncer cervical¹⁷³ o el cáncer de vejiga¹⁷⁴. De hecho, se ha asociado la expresión diferencial de hasta 286 *T-UCRs* (de un total de 481) a diversos tumores, algunos de ellos alterados de manera específica en un tipo concreto, como *uc.8* en cáncer de vejiga¹⁷⁴ o *uc.38* en cáncer de mama¹⁷⁵.

Si bien es cierto que la mayoría de estudios han enfocado su investigación en desenmascarar las funciones de los *T-UCRs* en cáncer, algunos autores demuestran también la relevancia de éstos en otras enfermedades y condiciones fisiológicas. Por ejemplo, el *T-UCR uc.173* se ha relacionado significativamente con el proceso apoptótico, observándose una correlación entre la alteración de los niveles de dicho transcrito y la apoptosis inducida por plomo en células neurales y renales^{167,176}. Por otro lado, se han observado también alteraciones en la expresión de varios *T-UCRs* en la enfermedad de Chron, destacándose la implicación del *uc.261* en la inflamación de la mucosa intestinal¹⁷⁷. En términos fisiológicos, algunos autores demuestran la participación de algunos de estos transcritos en distintos procesos, como el *T-UCR uc.417*, asociado con la pérdida de función del tejido adiposo marrón y la termogénesis¹⁷⁸, o *uc.372*, capaz de unirse e inhibir los *miRNAs miR-195/miR-4668* y regular genes relacionados con la síntesis de lípidos¹⁷⁹.

3.2.2. ARNs circulares (*circRNAs*)

Bajo ciertas condiciones, algunas moléculas de ARN son capaces de unir de manera covalente sus extremos 5' y 3' a través, generalmente, de un mecanismo conocido como *back-splicing* formando un transcrito circular al que se le da el nombre de ARN circular (*circular RNA*; *circRNA*). Del mismo modo que los ARNs mensajeros lineales, el *back-splicing* requiere tanto de las señales de *splicing* como de la maquinaria del espliceosoma necesarias para la vía canónica¹⁸⁰. No obstante, la frecuencia de eventos de *back-splicing* es, en general, menor y menos eficiente que los mecanismos canónicos. Cabe destacar que aquellos intrones flanqueantes de exones que contienen abundantes secuencias repetitivas son más susceptibles de ser circularizados¹⁸¹, aunque publicaciones recientes sugieren que no todas las secuencias complementarias presentes en ambos lados de exones e intrones promueven necesariamente la circularización de estos¹⁸². En otros casos, algunas proteínas de unión a ARN pueden servir como factores reguladores de este proceso¹⁸³, así como las secuencias ricas en dinucleótidos GU cerca del sitio aceptor de *splicing* 5' pueden favorecer también la circularización¹⁸⁴. Los ARNs circulares pueden ser exónicos, intrónicos o pueden contener intrones y exones (figura 9A), aunque los más abundantes son exónicos y se encuentran altamente conservados en mamíferos¹⁸⁵. Se ha observado que aquellos *circRNAs* generados únicamente a partir de exones se localizan principalmente en el citoplasma, sugiriendo un papel en la regulación a nivel post-transcripcional¹⁸⁶. Pese a que dichas moléculas son transcritas a partir de regiones codificantes, en general no son capaces de ser traducidas a proteínas debido a la falta de marcos de lectura abiertos o de entradas internas de ribosomas. Sin embargo, existen evidencias de la potencial capacidad traduccional de algunos *circRNAs*¹⁸⁷.

En el caso de los *circRNAs* intrónicos y aquellos que contienen tanto exones como intrones, están localizados predominantemente en el núcleo, lo que sugiere un papel más directo durante la transcripción génica.

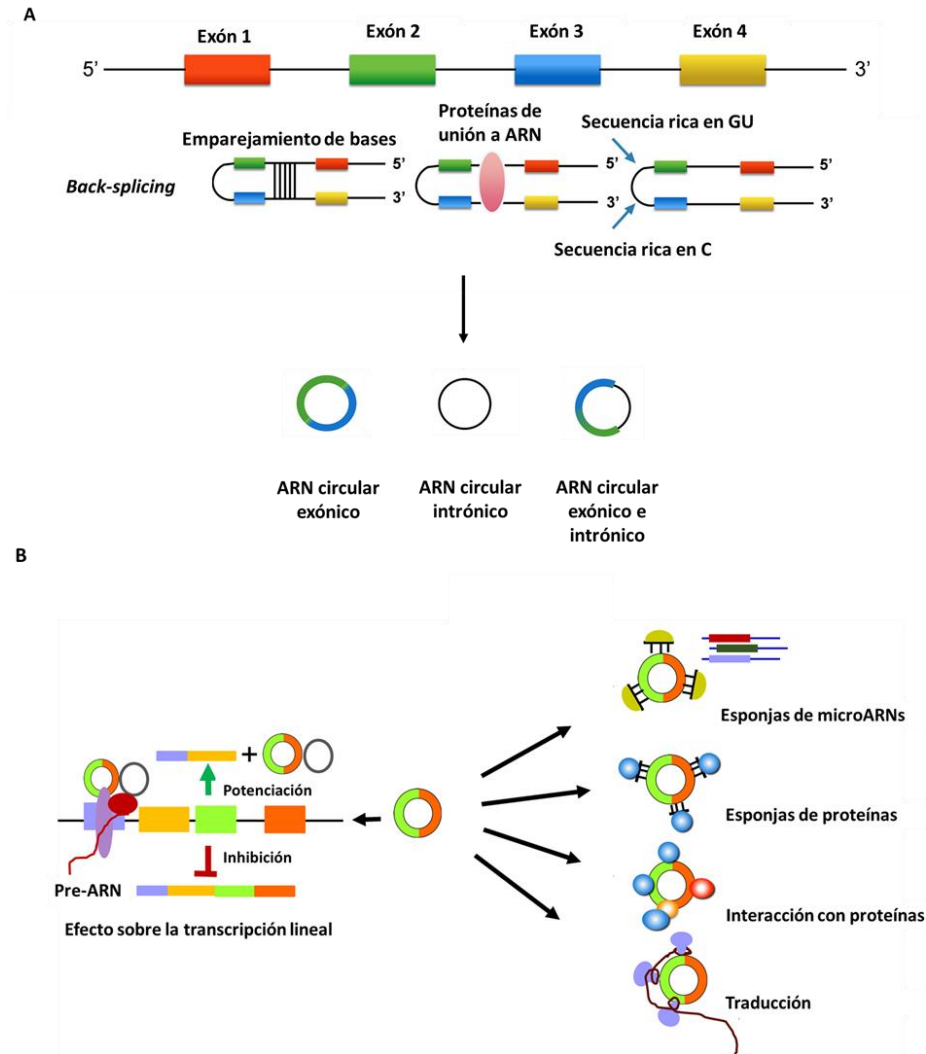


Figura 9. Origen y mecanismos de acción de los ARNs circulares. A. Mediante el mecanismo de *back-splicing*, los intrones flanqueantes de uno o más exones son emparejados gracias a la existencia de secuencias repetitivas inversas, la acción de proteínas de unión a ARN o la existencia de secuencias ricas en dinucleótidos GU cerca del sitio de *splicing* 5'. Estos procesos pueden dar lugar a ARNs circulares exónicos, intrónicos o conteniendo de ambos. B. Se han descrito distintas posibles funciones por parte de los ARNs circulares, pudiendo tener efecto sobre la transcripción lineal de su propio *gen huésped*, como esponjas de microARNs o proteínas, interaccionando con y transportando proteínas e incluso regulando la traducción. Adaptada de Lei, K. *et al.*, 2018.

Por lo que respecta a su función, diversos estudios constatan que los ARNs circulares ejercen un papel regulador importante en la célula (figura 9B). Distintos autores han demostrado la capacidad de interacción de estos transcritos con *miRNAs* y proteínas de unión a ARN, impidiendo así su unión con sus ARNs mensajeros diana^{188,189}, o incluso llevando a cabo una función transportadora en compartimentos celulares específicos¹⁹⁰. Es importante añadir que, además de actuar como reguladores en *trans*, la propia generación de estos *circRNAs* podría estar también afectando en *cis* a los productos transcripcionales lineales de sus propios genes huésped compitiendo con la vía de *splicing* canónica¹⁸³. Por otro lado, algunos de estos transcritos circulares son también capaces de favorecer la expresión de sus genes huésped¹⁹¹ o incluso insertarse en el genoma como pseudogenes, pudiendo así cambiar la estructura genómica y sugiriendo un mecanismo alternativo de regulación de la expresión génica en *cis*¹⁹².

Dadas todas las evidencias mostradas hasta el momento del papel fundamental que pueden tener muchas especies circulares en la célula, es razonable que se hayan observado alteraciones de esta población en varios tipos de patología. De hecho, son varias las publicaciones que desvelan la relevancia de algunos *circRNAs* en enfermedades como el cáncer, observándose tanto especies oncogénicas^{193–195} como supresoras tumorales^{196,197}, enfermedades cardiovasculares^{198,199} o enfermedades neurodegenerativas como el alzheimer^{200,201}, la enfermedad de Parkinson²⁰² o la esclerosis múltiple^{203,204}, entre otras.

3.2.3. *lncRNAs* en enfermedades neurológicas

Varios estudios han demostrado la importancia de los ARNs no codificantes largos en el desarrollo neuronal²⁰⁵⁻²⁰⁷, observándose también una expresión irregular de muchos de ellos en varias enfermedades del neurodesarrollo entre las que se incluyen patologías como desórdenes del espectro autista, síndrome de X frágil, síndrome de Down, síndrome de Rett o Síndrome de Angelman y Prader-Willi²⁰⁸. No obstante, solo un pequeño número de estos transcritos han sido completamente identificados y validados funcionalmente. En el caso concreto del Síndrome de Rett, un estudio publicado por nuestro grupo en 2013 mostraba, mediante ensayos de *microarrays* específicos de *lncRNAs*, la desregulación de hasta 701 de estos transcritos en cerebros completos de ratones deficientes para MeCP2 con 9 semanas de edad²⁰⁹. En el mismo trabajo se destaca el incremento significativo de los niveles del *lncRNA AK081227*, cuya transcripción se produce a partir de un intrón del gen *Gabbr2* (*GABA receptor subunit rho-2*). *Gabbr2* es codificante de una subunidad del receptor GABA-C, siendo por tanto sustancial en el correcto desarrollo de las señales inhibitorias GABAérgicas²¹⁰. El incremento en los niveles de *AK081227* se pudo asociar con la disminución de la transcripción de *Gabbr2* en ratones *KO* para MeCP2.

Por otro lado, se ha demostrado que los niveles transcripcionales del gen *BDNF*, factor crucial en el desarrollo y plasticidad del sistema nervioso central, se encuentran significativamente disminuidos en pacientes RTT²¹¹. En la cadena anti-sentido de *BDNF* se transcribe el ARN no codificante *BDNF-AS*, capaz de reprimir la transcripción de *BDNF* mediante la alteración estructural de la cromatina, reduciendo así los niveles endógenos de la proteína BDNF y alterando, por tanto, la función de ésta²¹². Además, *BDNF-AS* se ha visto diferencialmente

expresado en pacientes con desorden del espectro autista²¹³, datos que refuerzan la necesidad del estudio de la repercusión de dicho transcrito en enfermedades como el Síndrome de Rett.

3.2.3.1. T-UCRs en enfermedades neurológicas

Existen muy pocas publicaciones enfocadas en el estudio del papel que ejerce la población de *T-UCRs* en el SNC de mamíferos. En 2016, *Jiang* y su equipo mostraron niveles alterados de 78 de éstos transcritos en la médula espinal de ratones con dolor neuropático²¹⁴, así como el *T-UCR uc.48* se ha visto también involucrado en la neuropatía simpática diabética²¹⁵. Por otro lado, se ha demostrado que 107 *T-UCRs* se encuentran activamente expresados en el córtex cerebral de ratas²¹⁶ y estudios bioinformáticos y de expresión sugieren un papel relevante por parte de este tipo de ARN no codificante en el desarrollo del cerebro de mamíferos¹⁶³. La población de *T-UCRs* se ha visto también alterada en ratas con hipertensión espontánea a las que se les provocó un accidente cerebrovascular, aunque la significancia funcional de dicha alteración es todavía desconocida²¹⁷.

3.2.3.1.1. El caso de *Evf2*

Los genes de la familia *Dlx* (*distal-less homeobox*) en vertebrados forman parte de una familia proteica de homeodominios con un papel crítico en la diferenciación y migración neuronal. Estos genes se expresan en grupos pareados (*Dlx 1/2*, *Dlx 3/4*, *Dlx 5/6*)²¹⁸ y se han identificado regiones intergénicas en los pares *Dlx1/2* y *Dlx5/6* que contienen elementos potenciadores específicos altamente conservados, llamados *ei* y *eii* en el par *Dlx 5/6*, y con una función

determinante en el control de la expresión de estos genes^{219,220}. *Evf2* es un ARN no codificante largo, transcrito a partir de la cadena anti-sentido de *Dlx6* y parcialmente codificado por una de las regiones intergénicas ultraconservadas del par *Dlx5/Dlx6*. Dicho *lncRNA* es capaz de cooperar con la proteína *Dlx2* para la regulación en *trans* de la actividad de los genes *Dlx5/Dlx6*²²¹ (figura 10). Por otro lado, datos recientes muestran también una regulación negativa de la transcripción de *Dlx6* por parte de *Evf2* debido a la propia transcripción anti-sentido de este último, mecanismo conocido como inhibición anti-sentido competitiva en *cis*. Además, en modelos murinos adultos, la pérdida de *Evf2* resulta en la aparición de defectos en los circuitos GABAérgicos en hipocampo, confirmándose así la significancia biológica de *Evf2* en el sistema nervioso²²².

Es importante destacar la identificación del gen *DLX5* como gen diana de *MECP2*. En un estudio realizado en líneas celulares linfoblastoides de pacientes RTT y mediante el uso de un modelo murino de la enfermedad, se demostró el papel esencial de la proteína MeCP2 para la metilación de la lisina 9 de la Histona H3 en el locus *Dlx5/Dlx6* y favorecer así el silenciamiento génico debido a la compactación de la cromatina²²³. En correspondencia con esta función, cerebros de ratones con depleción de MeCP2 mostraban una expresión de *Dlx5* dos veces mayor que los ratones control. Siendo *Dlx5* relevante en la regulación de enzimas sintetizadoras de ácido γ -aminobutírico (GABA), las alteraciones transcripcionales observadas en *Dlx5* en condiciones de pérdida de MeCP2 podrían provocar defectos en la actividad neuronal GABAérgica en pacientes con Síndrome de Rett. Por otro lado, en un trabajo todavía más reciente, se manifiestan distintas evidencias de que *Evf2* es necesario para el reclutamiento de MeCP2 en los elementos ultraconservados situados en las regiones intergénicas (*ei* y *ei'*) de *Dlx5/Dlx6* durante el desarrollo de la zona cerebral anterior ventral²²².

En condiciones de depleción de *Evf2*, se observó un incremento de los niveles de *Dlx5*, confirmándose la función represiva de MeCP2 sobre la transcripción de este gen (figura 10). No obstante, los autores del mismo trabajo observaron también que, aunque en uno de los segmentos ultraconservados de *Dlx5/Dlx6* (*eii*) se perdía la unión de MeCP2 y también de HDAC1 (proteína deacetilasa de histonas que interactúa con MeCP2 en su función represiva), ésta última permanecía invariable en el otro elemento ultraconservado (*ei*), sugiriendo un mecanismo regulatorio alternativo en esa posición.

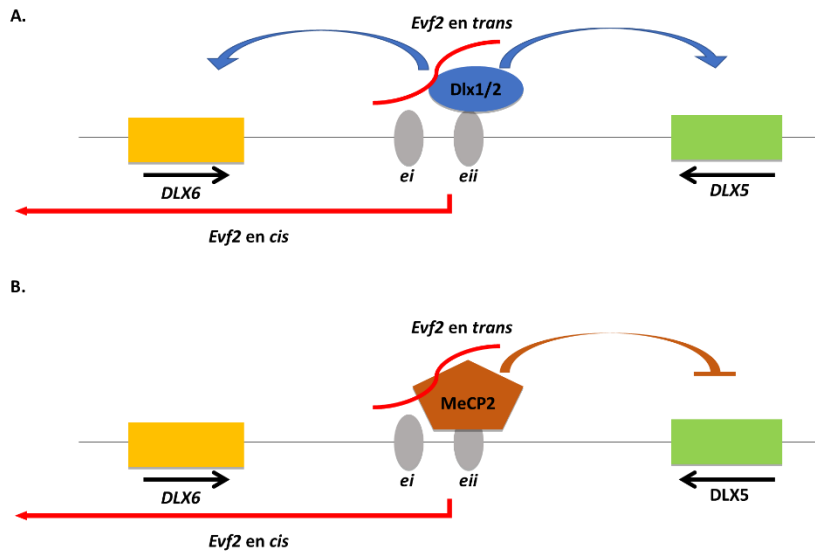


Figura 10. Modelo de cooperación del lncRNA *Evf2* y las proteínas *Dlx2* y *MeCP2* en la regulación de la transcripción de los genes adyacentes *DLX5* y *DLX6*. A. El reclutamiento de *Dlx1/2* por parte de *Evf2* favorece la transcripción de los genes *DLX5* y *DLX6*. Por otro lado, el reclutamiento de *MeCP2* en los elementos ultraconservados *ei* y *eii* de *DLX5/DLX6* parece ocurrir de manera competitiva con *Dlx1/2* y reprime la expresión de *DLX5*. Debido a su transcripción anti-sentido, *Evf2* también puede regular en *cis* de manera negativa la expresión del gen *DLX6*. Adaptada de Berghoff, E.G. et al., 2013.

La vía de señalización Sonic Hedgehog (*Shh*) es uno de los mecanismos clave para la regulación de eventos esenciales durante el proceso de desarrollo. *Evf2* forma parte de una de las dianas directas en esta vía, a través de la cual la señalización de *Shh* en la zona cerebral anterior ventral embrionaria inicia una cascada transcripcional en la que se ven implicados los genes *DLX*, *Evf2* y *MECP2*, entre otros, para el desarrollo correcto de neuronas GABAérgicas.

3.2.3.2. *circRNAs* en enfermedades neurológicas

En el cerebro de mamíferos se ha observado un enriquecimiento de ARNs circulares en comparación con otros tejidos¹⁸⁹. Concretamente en humanos y ratones, los tejidos con mayor abundancia de especies circulares son el cerebro²²⁴, los testículos²²⁵ y las plaquetas²²⁶. Más específicamente, en el cerebro humano se han descrito más de 2000 genes capaces de generar diez o más especies circulares en cada caso. Además, el perfil de expresión de los *circRNAs* es diferente en función de la región cerebral y durante distintas etapas del desarrollo, observándose un incremento significativo de estas especies en cerebros humanos fetales y adultos en comparación con los niveles detectados en estadios embrionarios²²⁷. Cabe destacar también que, en los casos de *circRNAs* formados a partir de regiones codificantes, se han observado incluso niveles más altos de estos que de sus respectivas isoformas lineales²²⁴.

Muchos *circRNAs* cuya expresión es especialmente abundante en el cerebro se han asociado con funciones relevantes en la neurotransmisión, así como en la maduración neuronal y la actividad sináptica. La función sináptogénica de estos se ve respaldada por la localización de sus propios genes huésped, particularmente

abundantes en sinaptosomas y además con papeles relacionados con la actividad sináptica¹⁸⁹. Además de sus correspondientes genes lineales, la disposición de varias especies circulares en las neuronas muestra su más que probable importancia en funciones relacionadas con la sinapsis, pues estudios de hibridación *in situ* han revelado la presencia de altos niveles de esos transcritos en zonas específicas como las dendritas.

Uno de los ejemplos mejor descritos de ARN circular implicado en vías esenciales para el correcto desarrollo y funcionamiento neuronal es el caso de *CDR1as* (transcrito anti-sentido de *CDR1*, gen relacionado con degeneración del cerebelo)²²⁸. *CDR1as* contiene más de 70 sitios de unión al *miRNA* miR-7, pudiendo actuar por tanto como esponja de dicho *miRNA* y afectando a los niveles de los ARNs diana de éste. Uno de esos transcritos diana es *UBE2A* (*ubiquitin protein ligase A*), esencial para la “limpieza” de péptidos amiloides y la degradación de proteínas no necesarias, dañadas y/o neurotóxicas en las células neurales. Recientemente se ha demostrado la relación entre la desregulación del sistema *CDR1as-miR-7-UBE2A* y la enfermedad de Alzheimer²²⁹. Por otro lado, se ha demostrado también la importancia de la regulación por parte de *CDR1as* y *miR-7* en la degradación de *APP* y *BACE1*, ambos genes relacionados también con la enfermedad de Alzheimer, a través de la inhibición de la traducción de *NF-κB*²³⁰.

Cabe destacar que últimas evidencias sitúan los ARNs circulares como importantes biomarcadores de distintas patologías debido a su estabilidad, sus patrones de expresión específicos y su capacidad de expresión bajo ciertas condiciones concretas²³¹. Siendo estas especies fácilmente identificables en fluidos como la sangre²³², la saliva²³³ o el plasma²³⁴, es necesaria una mayor exploración del potencial uso de estos transcritos como biomarcadores en enfermedades neurológicas debido a la inaccesibilidad del tejido cerebral.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Usando tanto un modelo murino de la enfermedad, muestras *post-mortem* de pacientes RTT y a través del diseño y generación de un modelo neural humano *in vitro* deficiente para MeCP2, el principal objetivo del presente proyecto ha sido identificar nuevas rutas moleculares reguladoras en las que participen *T-UCRs*, *circRNAs* y otros transcritos no codificantes, afectados por los niveles alterados de MeCP2. Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer el patrón de expresión de las poblaciones de *circRNAs* y *T-UCRs* en las regiones cerebrales más afectadas del modelo Rett de ratón (*KO*) en comparación con la cepa *wildtype* (*WT*).
2. Establecer el patrón de expresión de las poblaciones de *circRNAs* y *T-UCRs* en un modelo de células progenitoras neuronales deficiente para MeCP2 generado en nuestro grupo.
3. Caracterizar aquellos *circRNAs* y *T-UCRs* con mayor interés en el contexto de la enfermedad de RTT en el modelo murino, el modelo humano *in vitro* y en muestras cerebrales *post-mortem* de pacientes con Síndrome de Rett.
4. Entender el posible papel de los *T-UCRs uc.478* y *uc.479* en la regulación de la edición del ARN de *GRIA3* y los efectos de dicha regulación en la modulación de las propiedades de los receptores de glutamato de tipo AMPA.

5. Estudiar nuevas vías reguladoras en las que participen distintas clases de *ncRNAs* junto con su impacto en la expresión de genes codificantes.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

1. Muestras biológicas

1.1. Muestras de tejido cerebral de ratón

Hembras murinas heterocigotas (*Mecp2* +/-) B6.129P2 (C) *Mecp2*^{tm1.1Bird/J} (Ref:003890) procedentes de *The Jackson Laboratory* fueron apareadas con machos C57BL/6J. La descendencia fue genotipada mediante PCR y las muestras de tejido cerebral fueron obtenidas a partir de machos hemizigotos deficientes de *Mecp2* (*Mecp2*^{-/-}), llamados también *KO* para *Mecp2*, y machos de tipo salvaje (*WT*) de la misma camada. Las muestras se obtuvieron de animales pre-sintomáticos (3-4 semanas de edad) y animales sintomáticos (8-9 semanas de edad). Todos los procedimientos y experimentos con ratones fueron aprobados por el comité de ética para experimentos con animales del centro IDIBELL, bajo las pautas establecidas en las leyes españolas de bienestar animal. Los ratones fueron sacrificados siguiendo las pautas de puntos finales para animales utilizados en investigación biomédica. Los tejidos se congelaron en hielo seco inmediatamente después de su extracción y fueron almacenados a -80 °C hasta su uso.

1.2. Líneas celulares

Se obtuvo comercialmente la línea celular progenitora neural humana ReNcell® VM (SCC008, *Sigma-Aldrich*), con capacidad de diferenciación a células neuronales y gliales. Todas las placas en las que se sembraron las células fueron siempre pretratadas con 20 µg/ml

de laminina (CC095, *Merck Millipore*) para su correcta adherencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el mantenimiento de dicha línea celular en su estado progenitor, ésta fue cultivada en medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* suplementado con F-12 (DMEM/F12, 11320033, *Gibco*). Dicho medio fue suplementado con 2% de B-27 (17504001, *Life Technologies*), 0,1% de solución de heparina al 0,2% (07980, *Stemcell Technologies*), 1% de antibiótico/antimicótico (L001-100, *biowest*), 0,001% de factor de crecimiento epidérmico *EGF* (SRP302, *Sigma*) y 0,00125% de factor de crecimiento básico de fibroblastos *FGF2* (SRP4037, *Sigma-Aldrich*). Para la libre diferenciación de la línea neural progenitora a células neurales maduras, fueron retirados del medio los factores *EGF* y *FGF2*. Las células se cultivaron en condiciones estándar a 37°C con un 5% (v/v) de dióxido de carbono. Todas las líneas celulares fueron testadas para comprobar la ausencia de micoplasma.

Para la expansión celular a distintas placas, se utilizó la solución de separación *ACCUTASE* (L0950-100, *biowest*), recomendada para un mejor mantenimiento de la estructura neural en lugar de la tripsina.

Para la criogenización de aquellas células que se quisieron preservar hasta su uso, se utilizó el medio específico de congelación *ReNcell Neural Stem Cell Freezing Medium* (SCM007, *Merck Millipore*) y se guardaron en nitrógeno líquido.

1.2.1. Generación de una línea neural humana *in vitro* KO para MeCP2

Con el objetivo de deplecionar la proteína MeCP2 en la línea humana neural progenitora *in vitro*, previamente en el grupo se llevó a cabo un protocolo de edición génica mediante el sistema *CRISPR/Cas9*, cuyos

detalles se podrán encontrar en la tesis doctoral de Edilene Siqueira. En resumen, tras varias pruebas de transfección y la selección del ARN guía con mayor eficiencia (tabla 2), se pudo obtener una línea neural progenitora con alteraciones en la secuencia del gen *MECP2* y, en consecuencia, *KO* para el producto proteico correspondiente. La transfección del ARN guía en las células neurales progenitoras (ReNcells VM) se llevó a cabo mediante el uso de *Basic Nucleofector Kit for Primary Mammalian Neurons* (VPI-1003, Lonza) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Tras la nucleofección, las células transfectadas y, por tanto, positivas para *GFP*, fueron seleccionadas mediante el proceso de *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)* y se dejaron crecer durante dos semanas.

ARN guía CRISPR/Cas9

oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')
ARN guía	AAAAGCCTTTCGCTCTAAAG
ARN guía_complementario	CTTTAGAGCGAAAGGCTTTT

Tabla 2. Secuencia del ARN guía y su complementaria para la edición génica del gen *MECP2* mediante el sistema CRISPR/Cas9.

1.3. Muestras *post-mortem* de tejido cerebral humano

Las muestras de tejido cerebral humanas *post-mortem* utilizadas en el presente proyecto fueron obtenidas del *NIH (National Institutes of Health) NeuroBioBank*, pudiéndose acceder a tres regiones cerebrales distintas: hipocampo, cerebelo y sección BA10 de cortex frontal. Las características de cada una de las muestras se encuentran expuestas en la tabla 3.

Muestras de tejido cerebral usadas en análisis proteómico

ID	Región	Edad donante (años)	Sexo	Mutación <i>MECP2</i>
RTT1	Hipocampo	28	Femenino	NM_004992.3c.1162_1179del
RTT2	Hipocampo	20	Femenino	NM_004992.3c.806delG
RTT3	Hipocampo	6	Femenino	NM_004992.3: c.965C>T (p.Pro322Leu)
CTL1	Hipocampo	29	Femenino	Sin mutación en <i>MECP2</i>
CTL2	Hipocampo	24	Femenino	Sin mutación en <i>MECP2</i>
CTL3	Hipocampo	10	Femenino	Sin mutación en <i>MECP2</i>
CTL4	Hipocampo	7	Femenino	Sin mutación en <i>MECP2</i>

Muestras de tejido cerebral usadas en análisis de expresión y edición de *GRIA3*

ID	Región	Edad donante (años)	Sexo	Mutación <i>MECP2</i>
RTT1	Hipocampo	28	Femenino	NM_004992.3c.1162_1179del
RTT2	Hipocampo	20	Femenino	NM_004992.3c.806delG
RTT4	Hipocampo, Cerebelo, BA10	8	Femenino	NM_004992.3c.316C>T (p.Arg106Trp)
RTT5	Cerebelo, BA10	17	Femenino	NM_004992.3c.768delA (p.Ala257Leu) y c.773insA (p.Glu258Lys)
RTT6	Cerebelo, BA10	24	Femenino	NM_004992.3c.763C>T (p.Arg255X)
RTT7	Cerebelo, BA10	10	Femenino	NM_004992.3c.808C>T (p.Arg270X)
CTL1	Hipocampo	29	Femenino	Sin mutación en <i>MECP2</i>
CTL3	Hipocampo, BA10	10	Femenino	Sin mutación en <i>MECP2</i>
CTL4	Hipocampo, Cerebelo	7	Femenino	Sin mutación en <i>MECP2</i>
CTL5	Cerebelo, BA10	16	Femenino	Sin mutación en <i>MECP2</i>
CTL6	Cerebelo, BA10	25	Femenino	Sin mutación en <i>MECP2</i>
CTL7	Cerebelo, BA10	20	Femenino	Sin mutación en <i>MECP2</i>

Tabla 3. Muestras de tejido cerebral humanas *post-mortem* usadas en los distintos análisis. Cada muestra de paciente con Síndrome de Rett (RTT) y las obtenidas de personas no afectadas por la enfermedad (CTL) se identificó con un número (ID). Cada región fue utilizada para uno o varios experimentos distintos en función de la cantidad disponible de tejido. También se determinó la edad, el sexo y la mutación específica en *MECP2* descrita para cada una de las muestras.

2. Análisis de expresión

2.1. Análisis transcripcionales mediante chips (*arrays*) de expresión

El ARN total de los tejidos obtenidos de animales fue extraído mediante el kit de aislamiento de ARN *miRCURY™- cell & plant* (300110, *Exiqon*) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ARN total obtenido de líneas celulares neurales humanas fue extraído con el uso del kit *Maxwell RSC miRNA Tissue* (AS1460, *Promega*) con el dispositivo automático Maxwell RSC (*Promega*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se usaron 20 mg de tejido de hipocampo y córtex frontal de 3 animales sintomáticos (8 semanas de edad) y 3 animales pre-sintomáticos (4 semanas de edad) por condición (*WT* y *KO*). En el caso de las líneas celulares neurales se usaron tres réplicas biológicas para cada una de las condiciones temporales (progenitores y células neurales de libre diferenciación) y génicas (*WT* y *KO* para MeCP2). Tras la extracción, el ARN fue tratado con DNasa (*RQ1 RNase-Free DNasa*; *Promega*) y se evaluó su integridad mediante el sistema de electroforesis de microcapilaridad *BioAnalyzer* (*Agilent Technologies*) con el kit *Agilent RNA Nano 6000* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis de integridad del ARN fue llevado a cabo para todas las muestras aisladas usando un total de 5 ng de ARN por muestra.

La preparación e hibridación del chip de expresión (*microarray*) de regiones transcritas ultraconservadas (*T-UCRs*) con muestras de tejido cerebral del modelo animal se llevó a cabo, siguiendo su propio procedimiento, en el laboratorio del profesor George Calin, en el MD Anderson Cancer Center de la universidad de Texas en Houston, EEUU.

La preparación e hibridación de los chips de expresión de ARNs circulares en muestras de tejido cerebral del modelo animal, así como en progenitores neurales y células libremente diferenciadas fue llevada a cabo en base a los protocolos estándar de la compañía *Arraystar*. En resumen, el ARN total fue digerido con RNasa R (*Epicentre, Inc.*) para eliminar los ARNs lineales y enriquecer los transcritos circulares. A continuación, los ARNs circulares fueron amplificados y transcritos a ARN fluorescente con el uso de cebadores al azar (*Arraystar Super RNA Labeling Kit; Arraystar*). Los ARNs marcados fueron hibridados en el array de ARNs circulares humanos de *Arraystar V2 (AS-S-CR-H-V2.0, 8x15K, Arraystar)*. Tras el lavado de los portaobjetos, los chips fueron escaneados con el escáner Agilent G2505C. Para el análisis de las imágenes adquiridas del *array* se usó el programa *Agilent Feature Extraction* (versión 11.0.1.1). La normalización de cuantiles y el subsecuente procesamiento de datos se llevaron a cabo con el paquete *limma* del programa R. Los ARNs circulares expresados de manera diferencial con significancia estadística entre dos grupos fueron identificados mediante filtro por *Volcano Plot*. Los ARNs circulares diferencialmente expresados entre dos muestras se identificaron a través del filtro de cambio (*Fold Change*).

En el caso del *array* llevado a cabo para el análisis de expresión de *lncRNAs* en progenitores neurales y células libremente diferenciadas fue también llevado a cabo en base a los protocolos estándar de la compañía *Arraystar*. En resumen, el ARN mensajero fue purificado del ARN total tras la eliminación del ARN ribosómico (*mRNA-ONLY™ Eukaryotic mRNA Isolation Kit, Epicentre*). A continuación, cada muestra fue amplificada y transcrita a ARN complementario fluorescente sin sesgo de 3' utilizando una mezcla de oligo (dT) y cebadores aleatorios (*Arraystar Flash RNA Labeling Kit, Arraystar*). Los ARNs complementarios marcados fueron hibridados en el array para *lncRNAs*

humanos V4 (8 x 60K, *Arraystar*). Tras el lavado de los portaobjetos, el *array* fue escaneado con el escáner de Agilent G2505C. Para el análisis de las imágenes adquiridas del *array* se usó el programa *Agilent Feature Extraction* (versión 11.0.1.1). La normalización de cuantiles y el procesamiento de los datos se realizaron mediante el uso del programa *GeneSpring GX v12.1 (Agilent Technologies)*. Los *lncRNAs* expresados diferencialmente con significancia estadística fueron identificados a través del filtro por *Volcano plot* entre dos grupos.

2.2. Análisis de expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Para el análisis de expresión de ARNm, *circRNAs* y *T-UCRs* el ARN total fue retrotranscrito con el kit *RevertAid RT Reverse Transcription* (K1691, *Thermo Scientific*). Las reacciones de PCR en tiempo real fueron llevadas a cabo por triplicado en el sistema *Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR*, usando un total de 5-25 ng de cDNA por muestra, 6 μ l de *SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)* y cebadores a 416 nM en un volumen final de 12 μ l en placas de 384 pocillos. Todos los datos fueron adquiridos y analizados con el programa *QuantStudio Design & Analysis v1.3.1* y normalizados respecto a los controles endógenos *B2m* y *L13* en muestras murinas y humanas, respectivamente. Los niveles relativos de ARN se calcularon mediante el uso del método comparativo de Cts ($\Delta\Delta$ Ct).

Par la detección de especies circulares, los cebadores fueron diseñados de manera divergente y priorizando el solapamiento de uno de ellos con la unión entre dos exones (figura 11).

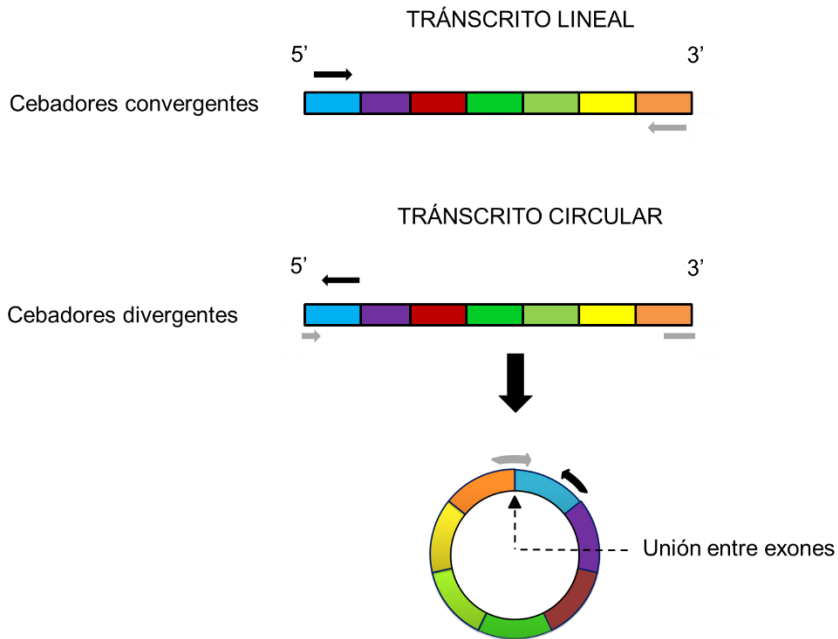


Figura 11. Diseño de cebadores para la amplificación de especies circulares por *RT-qPCR*. A diferencia de los cebadores convergentes comúnmente utilizados para la amplificación y detección de transcritos lineales, la amplificación de transcritos circulares requiere del diseño de cebadores divergentes usando como referencia la unión de los extremos 5' y 3' del primer y último exón.

Transcritos lineales

Cebadores	Secuencia (5'-3')
hcircSIRT2_0050945_Fw	TGGATGGAAGAACATAGATACCC
hcircSIRT2_0050945_Rv	GCTGACGCAGTGTGATGTGT
hcircSIRT2_0050946_Fw	GCTGGCCAGAACATAGATACC
hcircSIRT2_0050946_Rv	GCTGACGCAGTGTGATGTGT
hcircSIRT2_0050948_Fw	TTCAAGCCAACCATCTGTCA
hcircSIRT2_0050948_Rv	GTGGATGGAGAGCGAAAGTC
hCNIH3_Fw	ATGCTGTCTCTGGTGTGTGTG
hCNIH3_Rv	CATGAACAGGATTGCACTGG
hEZH_Fw	GCGGAAGCGTGTAAAATCAG
hEZH_Rv	CGCTGTTTCCATTCTTGTT
hGria3 flip exon Fw	TGGTACGATAAGGGGGAATG
hGria3 flip exon Rv	ATAGAAAACGCCTGCCACAT
hGria3 flop exon Fw	GGCCTCTTGGACAAATTGAA
hGria3 flop exon Rv	ATAGAAAACGCCTGCCACAT
hGria3_Fw	TCACTACATGCTCGCTAACCT
hGria3_Rv	CCATGCATGACTCTTTCCAG
hKDM1A_Fw	ACCACAACAGACCCAGAAGG
hKDM1A_Rv	TGGAGAGTAGCCTCAAATGTCA
hPSEN1_Fw	GCTGTTTTGTGTCCGAAAGG
hPSEN1_Rv	TCTGCCATATTCACCAACCA
hSIRT2_Fw	CCGGCCTCTATGACAACCTA
hSIRT2_Rv	GGAGTAGCCCCTTGTCCCTTC
hTCF4_Fw	AGCAATAATCCCCGAAGGAG
hTCF4_Rv	GGCAAACCTGGAGGAACTTT
hUBE3A_Fw	AGCCTACGCTCAGATCAAGG
hUBE3A_Rv	TTTTACAAGCTGTGGCCATTC
mBirc6_Fw	CAGGATGGGACGTGGAACAA
mBirc6_Rv	CCCATTGACAGCACCCTCA
mBtrc_Fw	CCAGGCTTTGCATAAACCAA
mBtrc_Rv	CACAATCATGCTGGAAGTGC
mCask_Fw	CGCCAACCTATCACTCCAGGT
mCask_Rv	AGCTCGACAGCTTCTTCCAG
mDlx2_Fw	ATGTCTCCTACTCCGCCAAA
mDlx2_Rv	GGAGTAGATGGTGCCTGGTT
mDlx5_Fw	CTTATGGCAAAGCGCTCAAC

mDlx5_Rv	CTCCGCCACTTCTTTCTCTG
mDlx6_Fw	CCAGTCCTACCACAACAGCA
mDlx6_Rv	TCCGTTGAACCTGATTTCC
mDnah2_Fw	CTTGCGGACCTGCACTCCTA
mDnah2_Rv	GAGTCTCCAGGTTGGGTAGGT
mFoxp1_Fw	CAGTCTTGTGGCGTTCTGC
mFoxp1_Rv	CGTCTCACCCCTGAGCTTTTA
mGli3_Fw	CCTTCCATCCTCCTGTACCA
mGli3_Rv	TCTGGATACGTCCGGGCTACT
mGria3 flip exon Fw	AGCAGAGAAAGCCGTGTGAT
mGria3 flip exon Rv	GAGTCCTTGGCTCCACATTC
mGria3 flop exon Fw	AGCAGAGAAAGCCGTGTGAT
mGria3 flop exon Rv	AAGAGGCCTTGCTCATTAG
mGria3_Fw	ACAGAAGGCAGGAAAAACGA
mGria3_Rv	ATGTTTCCCCAGGATCACAA
mHnrph1_Fw	CGGCTTAGAGGACTCCCTTT
mHnrph1_Rv	TATCCCATTTGGCACGATTT
mMap1a_Fw	TAGAACCCGAGGGAGACCTT
mMap1a_Rv	GCAGGAAACAGTGAGGAAGG
mMllt3_Fw	GGAGTCTGATGAGGCAGAGG
mMllt3_Rv	TTCATGATGGAGAGGGGAAG
mQk_Fw	GCGGTGGCTACTAAAGTTCCG
mQk_Rv	CAAGCAAAGGCGATTACCAG
mSfpq_Fw	GGTGGTGGTGGCATAGGTTA
mSfpq_Rv	TTCTCTAGGACCCTGTCCA
mShh_Fw	CCAATTACAACCCCGACATC
mShh_Rv	AGAGATGGCCAAGGCATTTA
mSirt2_Fw	CGCTGCTACACGCAGAACAT
mSirt2_Rv	CATCCAGCCCATCGTGTATT
mSox5_Fw	GGGAAACTGTGCTTTTCCAG
mSox5_Rv	GCTTGTCACCATGGCTACCT
mTra2a_Fw	CGAGGGCAGAGAGTCTCGCTC
mTra2a_Rv	CGAGAATGGGATTCAGAATGT
mZeb2_Fw	CCAATCCCAGGAGGAAAAAC
mZeb2_Rv	GAGGGTTTGCAAGGCTATCA

Trancritos de regiones ultraconservadas

Cebadores	Secuencia (5'-3')
uc.12_Fw	CCACAGGTACCGGGAACATA
uc.12_Rw	GGCTCAAGTGGGAACATACC
uc.19_Fw	TTATCGCCTTTTTCCCTCCT
uc.19_Rv	TAATGCGATTAGCGGTCTCA
uc.75_Fw	AAATTGAAAAATCCCATCTCACA
uc.75_Rv	TCATTTGGGCAAATTTTACG
uc.77_Fw	CTGTCACACTGCTCCCAAGA
uc.77_Rv	TCAGCCAAAGATGCTTGAAA
uc.78_Fw	TTGAAGGTGGCTGTTTCTGA
uc.78_Rv	GAGCTAATGCCCGTGTTA
uc.186_Fw	TATCCCATTTGGCACGATTT
uc.186_Rw	TCATTTCTGGGCTTGTGATG
uc203_Fw	CAATGATGACCTGACCATGC
uc203_Rv	GATGGTAAGACGAACGGACAA
uc.208_Fw	GGACCCATTCATTCTTCCAG
uc.208_Rv	GAATTGGGGAAGAATACACGAA
uc.220_Fw	AATTGCCTCCTTCCAGAAAGT
uc.220_Rw	CCCAAGTAAAAGTGCCTTCG
uc.221_Fw	CCCAGGATCAATTCTGAAC
uc.221_Rw	CAGCGGGCTACATGAAAAAT
uc.223_Fw	TTTCTTCTGACCAATTTCTCCTG
uc.223_Rv	CTCTCACCAGTCCTGCATCA
uc.224_Fw	TGGTTGTGCACGCTTTATTC
uc.224_Rv	CATGAGGCATTAGCCATGTG
uc.308_Fw	AGCGGCTGTTGTAATCCAAT
uc.308_Rv	ACCATTCGGGCAGATTTATG
uc.309_Fw	GCTCATTTCTGGCAGGTTTT
uc.309_Rv	GAACTTGATCGATGGCTGCT
uc.336_Fw	TCTCTGGAGGCAGACACAAA
uc.336_Rv	GCTTCCGAGTGAATGCCTAA
uc.436_Fw	TCCACCGTTCTTTCTTACCG
uc.436_Rv	TCCGATTGTGTTTTCTCAA
uc.472_Fw	AAGCAGCATCTATTTTGTGCAG
uc.472_Rv	TCCTTTGGAATGTTATATTTTTGGA
uc.478_Fw	GGCCTCTTGGACAAATTGAA

uc.478_Rv	GGTGACATTGAGGCTGACCT
uc.479_Fw	CCCCTGCTTTATCGTTTCT
uc.479_Rv	CGTTCTTCACGTGGGAAATAA

Trancritos circulares

Cebadores	Secuencia (5'-3')
mcircBirc6_Fw	TTCTGGAGCTCCTCAGTCAGT
mcircBirc6_Rv	CCTGCGGCGGAGTCGTT
mcircDnah2_Fw	CTCATCTCAGACCTGCGGAATC
mcircDnah2_Rv	CGCATTGTTAGTCATGCCAC
mcircFoxp1_Fw	GTGAGACGTGACCTTTGGAG
mcircFoxp1_Rv	GCCATAAAAAGCCTGGGGTC
mcircMap1a_Fw	TCAGCTCAGAGGTTCCACCAT
mcircMap1a_Rv	ACCTGGGCGAAGTTTTGATA
mcircMlIt3_Fw	ACATTCTGCAGCAGGTCCTT
mcircMlIt3_Rv	TGCCTCATCAGACTCCTCCT
mcircSirt2_Fw	CCAACCATCTGCCACTACTTC
mcircSirt2_Rv	CCCACCAAACAGATGACCTT
hcircEZH2_Fw	AGAATGGAAACAGCGAAGGA
hcircEZH2_Rv	CTGGCCCATGATTATTCTCC
hcircPSEN1_Fw	GGTCCACTTCGTATGCTGGT
hcircPSEN1_Rv	GCTGTCTAAGGACCGCAAAG
hcircTCF4_Fw	TGCCATGGAGGTACAGACAA
hcircTCF4_Rv	GCCCATATCCATGTCACCTC
hcircUBE3A_Fw	TTGAAGCTAGCCGAATAGGG
hcircUBE3A_Rv	TGATCCCTACCATCAATCAGC
hcircKDM1A_Fw	AGCCAACGGACAAGCTGTAG
hcircKDM1A_Rv	TCCTTCTCTGCTTTGGCATT
hcircCNIH3_Fw	CATGAATGCCGACACTTTGA
hcircCNIH3_Rv	CATGAACAGGATTGCACTGG

Tabla 4. Lista de cebadores empleados para los análisis de expresión por *RT-PCR* cuantitativa.

2.3. Detección de proteínas mediante inmunoblot

Se usaron 20 mg de tejidos de ratón y muestras *post-mortem* humanas y las células fueron recogidas en frío mediante raspado/*scraping*. Todas las muestras fueron resuspendidas en tampón Laemli 1X (62.5 mM Tris-HCl pH=6.8, 25% glicerol, 2% SDS, 0.01% de azul de bromofenol, 5% de β -mercaptoetanol), sonicadas y hervidas durante 5 minutos a 95 °C. La concentración de cada muestra se determinó cuantificando la absorbancia a 260nm con el espectrofotómetro de UV *NanoDrop™ One/OneC Microvolume* y mediante el uso de la equivalencia entre la cantidad de histonas y ADN (6 unidades de absorbancia a 260nm (ADN) = 1 μ g / μ l de proteína). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (*Whatman, GE Healthcare*) e incubadas toda la noche a 4 °C y en agitación con el anticuerpo primario diluido en leche descremada (232100, *BD Difco*) al 5% en PBS y 0,1% *Tween-20*. Tras tres lavados con PBS con 0,1% *Tween-20*, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante con el anticuerpo secundario conjugado con *horseradish peroxidase* diluido con 5% de leche descremada en PBS y 0,1% *Tween-20*. Tras 3 lavados con PBS, los resultados se revelaron empleando reactivos ECL (*Enhanced Chemiluminescence; Luminata-HRT; Merck-Millipore*). Se empleó Lamin B1, β -actina y α -tubulina como controles endógenos, según el caso.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial	Dilución
ADAR2	HPA018277	<i>Atlas antibodies</i>	1:400
GRIA3	#4676	<i>Cell signaling</i>	1:2000
HISTONA H3	ab1791	<i>Abcam</i>	1:500
LAMIN B1	ab16048	<i>Abcam</i>	1:5000
MAP6	#4265	<i>Cell signaling</i>	1:1000
MAPT	ab64193	<i>Abcam</i>	1:1000
MeCP2	ab2829	<i>Abcam</i>	1:1000
S100b	Z0311	<i>Dako</i>	1:1000
SIRT2 humano	ab51023	<i>Abcam</i>	1:1000
Sirt2 ratón	ab211033	<i>Abcam</i>	1:2000
STMN1	#3352	<i>Cell signaling</i>	1:500
α-Tubulina	ab40742	<i>Abcam</i>	1:5000
α-Tubulina acetilada	T6793	<i>Sigma-Aldrich</i>	1:2000
β-ACTINA HRP	A3854	<i>Sigma-Aldrich</i>	1:30000
<i>Anti- mouse HRP</i>	NA9310	<i>GE healthcare</i>	1:5000
<i>Anti-rabbit HRP</i>	A0545	<i>Sigma-Aldrich</i>	1:10000

Tabla 5. Lista de anticuerpos empleados para los análisis de expresión proteica por *western blot*.

3. Análisis de edición del ARN

Para conocer los niveles de edición de la posición R/G en el ARN de *Gria3*, la posición susceptible de edición fue amplificada con cebadores específicos usando 250 ng de ADN complementario de cada muestra con *Immolase Taq polymerase* (BIO-21047, *Bioline*) durante 35 ciclos. Los productos de PCR resultantes fueron purificados con el kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (740609.50, *Macherey-Nagel*) y clonados en el vector *pGEM®-T Easy* (A1360, *Promega*) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Tras 24 horas de ligación, los plásmidos conteniendo los fragmentos de interés se transformaron en bacterias *E. coli* competentes. Posteriormente, las bacterias se sembraron en placas de LB-Agar con 100 µg/ml de ampicilina (BIA0104, *Apollo Scientific Limited*), 20 µl de IPTG (1M; BIMB1008, *Apollo Scientific Limited*) y 20 µl de X-gal (50mg/ml; AS471851 *Apollo Scientific*) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se picaron para cada muestra un total de 96 colonias blancas (que habían incorporado el plásmido con el fragmento de interés) y se cultivaron individualmente en placas de 96 pocillos con 1 ml de medio LB a 37°C con agitación constante durante 90 minutos. Los insertos de cada colonia fueron amplificados de nuevo con *Immolase Taq polymerase* (BIO-21047, *Bioline*) durante 35 ciclos y con el uso de cebadores específicos del plásmido *pGem-T*. Los productos de PCR resultantes fueron precipitados con 87,7% de etanol absoluto y 12,3% de acetato de sodio (NaAc) 3M. Los fragmentos resultantes se secuenciaron empleando 1 µl de ADN por colonia y con el uso del kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (4337457, *Life Technologies*) y el cebador T7: TAATACGACTCACTATAGGG, específico para el vector *pGem-T*. Para la reacción de secuenciación, el ADN se desnaturalizó a 96°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de

96°C, 10 segundos; 50°C, 5 segundos; 55°C, 4 minutos; y un ciclo de extensión final de 55°C, 7 minutos. Los productos amplificados se purificaron empleando el kit *BigDye XTerminator Purification* (*ThermoFisher Scientific*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR resultantes fueron secuenciados con el equipo *3730 DNA Analyzer* (*Applied Biosystems*) y analizados con el programa *BioEdit v7.2.5*. Tras el análisis de las secuencias, el porcentaje de cambio de Adeninas (A) a Inosinas (I), siendo éstas últimas leídas como Guaninas (G) por la transcriptasa reversa, en la posición de interés fue calculado y analizado estadísticamente con la prueba exacta de Fisher.

4. Análisis específico de metilación en exones “flip” y “flop” de *GRIA3*

1 µg total de ADN genómico fue tratado con bisulfito con el kit *EZ DNA Methylation Gold* (*Zymo Research, Orange, CA, USA*) para convertir las citosinas no metiladas en uracilos de acuerdo con el protocolo del fabricante. El estado de metilación de las CpGs localizadas en las zonas de los exones “flip” y “flop” de *GRIA3* en líneas celulares neurales y muestras *post-mortem* humanas de hipocampo se determinó a través de la secuenciación genómica por bisulfito de un fragmento de 200-300 pares de bases amplificado mediante una PCR convencional usando *Immolase Taq polymerase* (BIO-21047, *Bioline*) con cebadores específicos para cada caso. Los productos de PCR resultantes fueron purificados con el kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (740609.50, *Macherey-Nagel*) y clonados en el vector *pGEM®-T Easy* (A1360, *Promega*) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Tras 24 horas de ligación, los plásmidos conteniendo los fragmentos de interés se

transformaron en bacterias *E. coli* competentes. Posteriormente, las bacterias se sembraron en placas de LB-Agar con 100 µg/ml de ampicilina (BIA0104, *Apollo Scientific Limited*), 20 µl de IPTG (1M; BIMB1008, *Apollo Scientific Limited*) y 20 µl de X-gal (50mg/ml; AS471851 *Apollo Scientific*) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se picaron para cada muestra un total de 96 colonias blancas (que habían incorporado el plásmido con el fragmento de interés) y se cultivaron individualmente en placas de 96 pocillos con 1 ml de medio LB a 37°C con agitación constante durante 90 minutos. Los insertos de cada colonia fueron amplificados de nuevo con *Immolase Taq polymerase* (BIO-21047, *Bioline*) durante 35 ciclos y con el uso de cebadores específicos del plásmido *pGem-T*. Los productos de PCR resultantes fueron precipitados con 87,7% de etanol absoluto y 12,3% de acetato de sodio (NaAc) 3M. Los fragmentos resultantes se secuenciaron empleando 1 µl de ADN por colonia y con el uso del kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (4337457, *Life Technologies*) y el cebador T7: TAATACGACTCACTATAGGG, específico para el vector *pGem-T*. Para la reacción de secuenciación, el ADN se desnaturalizó a 96°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 96°C, 10 segundos; 50°C, 5 segundos; 55°C, 4 minutos; y un ciclo de extensión final de 55°C, 7 minutos. Los productos amplificados se purificaron empleando el kit *BigDye XTerminator Purification* (*ThermoFisher Scientific*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR resultantes fueron secuenciados con el equipo *3730 DNA Analyzer* (*Applied Biosystems*) y analizados con el programa *BioEdit v7.2.5*. Para cada muestra, se secuenciaron un mínimo de 8 clones. Las citosinas se representaron gráficamente empleando un programa desarrollado por el Dr. Balazs Balint.

5. Análisis de localización de ARN

5.1. Fragmentación núcleo-citoplasma

El fraccionamiento subcelular se llevó a cabo con el kit *PARIS*[™] (AM1921, *Life Technologies*). A continuación, se realizó *RT-qPCR* de cantidades iguales de ARN de cada fracción y los resultados fueron normalizados teniendo en cuenta la cantidad total de ARN recuperado de cada fracción. La pureza del fraccionamiento se confirmó a nivel proteico mediante *western blot* con el uso de anticuerpos contra la histona H3, de localización nuclear, y α -TUBULINA, de localización citoplásmica. El enriquecimiento de ARN en cada fracción fue analizado por *RT-qPCR* usando *GAPDH* y *RNU6B* como controles.

5.2. Hibridación *in situ* fluorescente

Las líneas celulares neurales humanas fueron sembradas en placas de 6 pocillos con cubreobjetos y pretratadas con laminina para la correcta adherencia de las células. Dos días después de la siembra en el caso de progenitores neurales y 30 días después en el caso de células en diferenciación, se recuperaron los cubreobjetos con las células. Tras dos lavados con PBS 1X, las células fueron fijadas durante 10 minutos con paraformaldehído al 4%. A continuación, se llevaron a cabo de nuevo dos lavados con PBS 1X y se realizó la preparación de las muestras para la hibridación *in situ* fluorescente de sondas específicas para el ARN circular humano de *SIRT2 hsa_circ_0050946* (VPTZ76X, *ThermoFisher scientific*). Para ello, se utilizó el kit *ViewRNA*[™] *ISH Cell Assay* (QVC0001, *ThermoFisher scientific*) siguiendo las recomendaciones del fabricante y el horno para el sistema de hibridación *HybEZ*[™] *II* (*bio-technique*).

Una vez terminado el protocolo de hibridación *in situ*, se llevó a cabo la inmunotinción de la proteína específica de neurona TUJ 1 (*Neuron-specific class III beta-tubulin*) con un anticuerpo específico (T8660, *Sigma-Aldrich*) para delimitar la estructura neuronal de cada muestra y la marcación fluorescente del núcleo con *DAPI* (4',6-diamidino-2-phenylindole). Para ello, tras fijarse de nuevo las células con 4% de paraformaldehído durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavaron los cubreobjetos tres veces con PBS 1X y las células fueron bloqueadas con solución de bloqueo (5% de suero de cabra y 0,1% de tritón 100X en PBS 1X) durante una hora a temperatura ambiente. Una vez llevado a cabo el bloqueo, los cubreobjetos fueron incubados con el anticuerpo primario de TUJ 1 diluido (1:1000) en solución de bloqueo a 4° C durante toda la noche evitando la luz y rodeados de papel húmedo. Al día siguiente los cubreobjetos se lavaron tres veces en PBS y fueron incubados con el anticuerpo secundario (*anti-mouse HRP, NA9310; GE healthcare*) diluido (1:5000) en solución de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras tres lavados más con PBS, las muestras se incubaron con *DAPI* diluido (1:10000) en agua mili Q durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a cabo finalmente un último lavado con PBS y se procedió al montaje de los cubreobjetos en portaobjetos añadiendo 10 µl de medio de montaje acuoso *Fluorsave* (345789, *Merck Millipore*). Los portaobjetos se dejaron secar a temperatura ambiente toda la noche en condiciones de oscuridad y guardados posteriormente a 4 °C. Al día siguiente, se pudieron visualizar y capturar las imágenes de interés mediante microscopía de fluorescencia (Leica DM4). Finalmente, dichas imágenes se trataron y analizaron con el uso del programa *ImageJ*.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Modelo murino

1.1. Identificación y análisis de *T-UCRs* y *circRNAs* con expresión alterada en hipocampo y córtex frontal de ratones RTT

En primer lugar y mediante el uso de chips (*arrays*) de expresión, se evaluaron los niveles transcripcionales de las poblaciones de *circRNAs* y *T-UCRs* en muestras de hipocampo y córtex frontal de ratones *KO* para MeCP2, comparándose siempre con muestras de los mismos tejidos procedentes de ratones *WT* de la misma camada a modo de controles. Por lo que respecta a las muestras hibridadas en el *array* de *T-UCRs*, se incluyeron tres réplicas biológicas *WT* y *KO* tanto de animales sintomáticos (8-9 semanas de edad) como pre-sintomáticos (3-4 semanas de edad) de cada tejido. Sin embargo, para el análisis de expresión de *circRNAs* únicamente se evaluaron muestras correspondientes a hipocampo y córtex frontal de ratones sintomáticos. Los datos más significativos entre los obtenidos en el estudio se muestran en el anexo de la presente tesis.

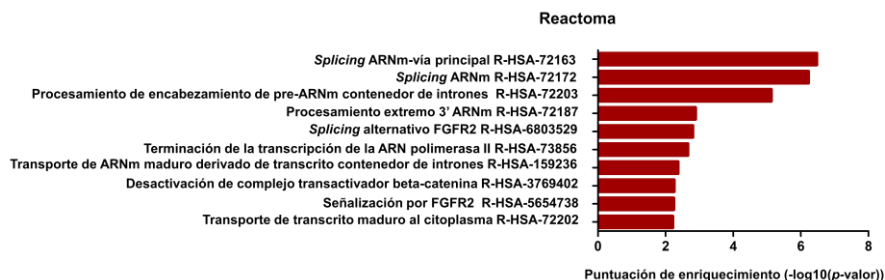
1.1.1. Selección de *T-UCRs* candidatos

Los análisis realizados en el *array* de expresión con sondas específicas para transcritos de regiones ultraconservadas mostraron la desregulación de varias de estas especies tanto en hipocampo como en córtex frontal de ratones *KO* para MeCP2 en comparación con los animales *WT*. Con los datos obtenidos, se llevó a cabo el estudio del reactoma (vías biológicas en las que se encuentran enriquecidos

determinados genes de interés) de aquellos genes huésped correspondientes *T-UCRs* que presentaban alteraciones en su expresión bajo condiciones de supresión de MeCP2. En dicho análisis se incluyeron todos los genes candidatos presentados en los resultados del *array*, agrupando animales pre-sintomáticos y sintomáticos, con independencia de los niveles de cambio observados (*fold change*) y en cada una de las regiones de estudio (córtex frontal e hipocampo) por separado (figura 12).

A.

CÓRTEX FRONTAL



B.

HIPOCAMPO

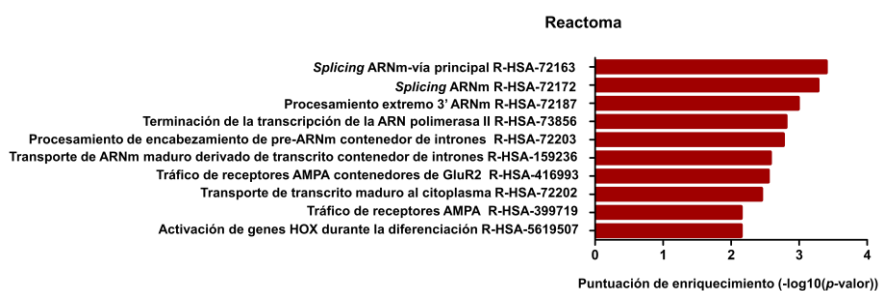


Figura 12. Análisis del reactoma de genes huésped correspondientes a *T-UCRs* con expresión alterada en córtex frontal (A) e hipocampo (B) del modelo RTT de ratón. Enriquecimiento diferencial de dichos genes de acuerdo con las reacciones celulares en las que se encuentran implicados (se muestran las diez principales). El eje Y muestra los términos de vía molecular y el eje X muestra la significancia estadística. El estudio se llevó a cabo a través de la herramienta *online* reactome.org.

De manera notable, se observó un enriquecimiento de genes con papeles relevantes en mecanismos relacionados con la expresión génica y el procesamiento del ARN en las muestras correspondientes a ambas regiones cerebrales de animales RTT (figura 12A). Es importante destacar que estos resultados son perfectamente comparables y similares a datos de enriquecimiento mostrados previamente para el número total de *T-UCRs* descritos¹⁵⁴, en los que también se resaltaban vías como el *splicing* o la regulación transcripcional como las más representativas para estos genes. No obstante, el caso de las muestras procedentes de hipocampo generó un especial interés debido a la sobrerrepresentación de genes con funciones implicadas en vías relevantes en el sistema neural, en concreto relacionadas con la señalización por glutamato como el tráfico de receptores de glutamato de tipo AMPA (figura 12B).

Entre todos aquellos *T-UCRs* cuyos niveles se encontraban alterados bajo condiciones de deficiencia de MeCP2, se seleccionaron algunos candidatos de interés utilizando como criterio principal el papel biológico ejercido por sus *genes huésped*, priorizando aquellos que tuvieran relevancia en vías relacionadas con la función o desarrollo neural (tabla 6). Los *T-UCRs* en los que finalmente se llevó a cabo un análisis más exhaustivo de sus niveles transcripcionales fueron *uc.309*, *uc.472*, *uc.203*, *uc.12*, *uc.186*, *uc.478/479*, *uc.75/77/78*, *uc.336* y *uc.208/209*, correspondientes a los *genes huésped* *Btrc*, *Cask*, *Qk*, *Sfpq*, *Hnrph1*, *Gria3*, *Zeb2*, *Sox5* y *Tra2a*, respectivamente.

Gen huésped (cadena)	Nombre completo en inglés	Papel biológico	T-UCR (cadena)	Localización del T-UCR en relación a su gen huésped
Btrc (+)	<i>Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>	<p>Papel en ubiquitinación dependiente de fosforilación.</p> <p>Requerido para el procesamiento de proteínas como NF-KB²³⁵ y GLI3²³⁶.</p> <p>Relación con malformaciones en manos y pies²³⁷.</p>	<i>uc.309 (-)</i>	Intrón
Cask (-)	<i>Calcium/ Calmodulin Dependent Serine Protein Kinase</i>	<p>Importante para el anclaje y transporte de los canales iónicos de las membranas celulares²³⁸.</p> <p>Contribuye al desarrollo neural y mutaciones en este gen se han asociado a discapacidad intelectual y microcefalia, entre otros fenotipos²³⁹.</p>	<i>uc.472 (+)</i>	Exón, 3'UTR
Qk (-)	<i>Quaking</i>	<p>Fundamental en la regulación del <i>splicing</i>, la exportación de ARNm desde el núcleo, la traducción de proteínas y la estabilidad del ARNm.</p> <p>Implicación en la mielinización, la diferenciación de oligodendrocitos y papel en el desarrollo de la esquizofrenia²⁴⁰.</p>	<i>uc.203 (-)</i>	Exón, 3'UTR
Sfpq (+)	<i>Splicing factor proline/ glutamine rich</i>	<p>Factor esencial requerido para la formación del espliceosoma.</p> <p>Alteraciones en este gen pueden producir, entre otras enfermedades, demencia frontotemporal²⁴¹.</p>	<i>uc.12 (-)</i>	Intrón

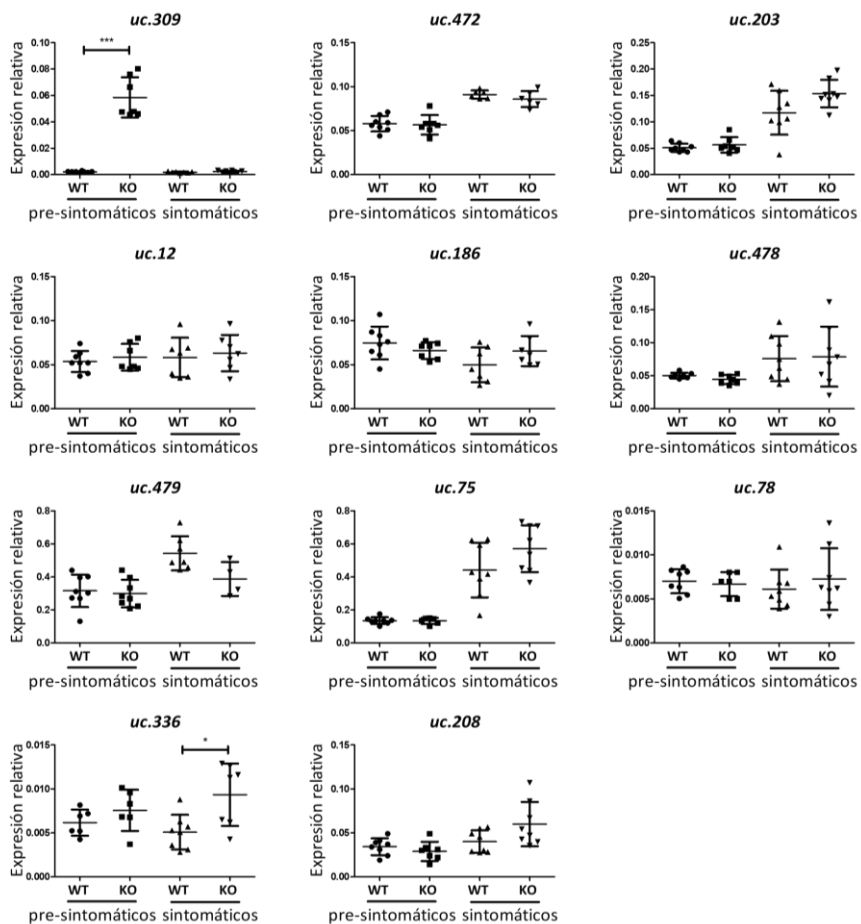
Hnrph1 (+)	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1</i>	Implicación en el procesamiento del ARN mensajero precursor y otros aspectos relacionados con el metabolismo y transporte del ARNm.	<i>uc.186 (-)</i>	Exón/ intrón
Gria3 (+)	<i>Glutamate receptor, ionotropic, AMPA3</i>	Subunidad de receptores de glutamato de tipo AMPA, receptores principales en la neurotransmisión excitatoria.	<i>uc.478 (+)</i>	Exón alternativo/intrón
		Alteraciones en este gen se asocian, entre otros desórdenes, a retraso mental síndrónico ligado al cromosoma X ²⁴² .	<i>uc.479 (+)</i>	Exón alternativo/intrón
Zeb2 (-)	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 2</i>	Papel esencial en la regulación del desarrollo del sistema nervioso ²⁴³ .	<i>uc.75 (+)</i> <i>uc.77 (+)</i> <i>uc.78 (+)</i>	Exón, 3'UTR Intrón Intrón
Sox5 (-)	<i>SRY (sex determining region Y)-box 5</i>	Factor de transcripción involucrado en el desarrollo embrionario y la determinación del linaje celular. Influencia en la migración de oligodendrocitos en la médula espinal y el cerebro anterior ²⁴⁴	<i>uc.336 (+)</i>	Intergénico <i>upstream</i>
Tra2a (-)	<i>Transformer 2 alpha</i>	Papel esencial en la regulación del <i>splicing</i> .	<i>uc.208 (-)</i>	Intrón
		Implicación en la patogénesis del síndrome de temblor/ataxia asociado a X frágil ²⁴⁵ .	<i>uc.209 (+)</i>	Intrón

Tabla 6. Lista de T-UCRs y genes huésped candidatos con niveles de expresión alterados en hipocampo y/o córtex frontal de ratones KO para MeCP2.

1.1.1.1. Análisis mediante *RT-qPCR* de la expresión de *T-UCRs* candidatos en hipocampo y córtex frontal de ratones RTT

Tras la selección de aquellos *T-UCRs* en los que llevar a cabo un estudio más exhaustivo de su potencial influencia en el desarrollo de la enfermedad, se analizaron los niveles de expresión de éstos y de sus genes huésped correspondientes mediante *RT-PCR* cuantitativa o *RT-qPCR*. La validación de cada *T-UCR* se realizó en el tejido específico en el que se habían observado alteraciones transcripcionales a partir de los datos del *array*.

A.



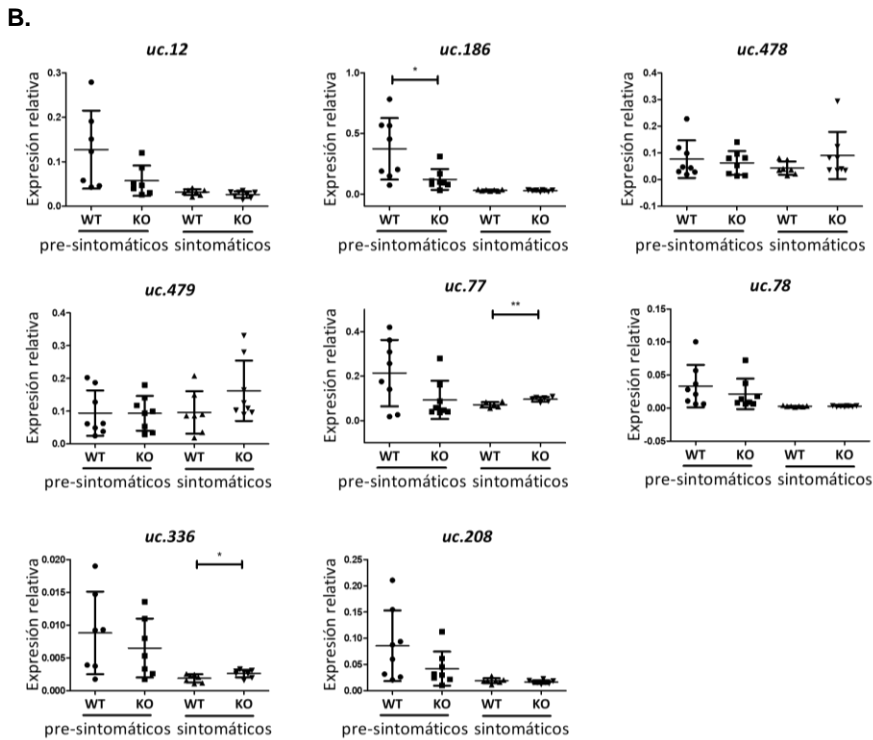
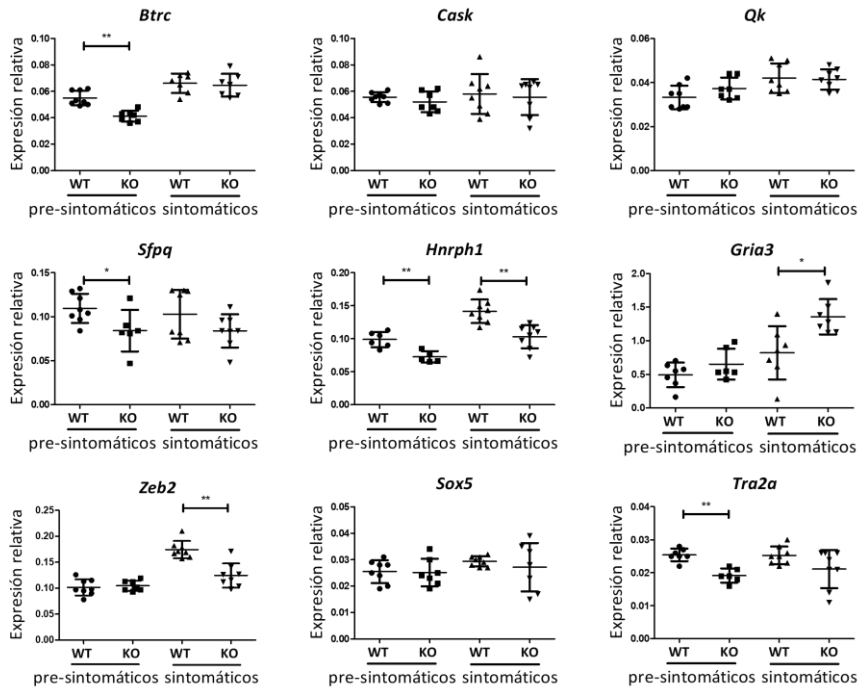


Figura 13. Niveles de expresión relativos de T-UCRs candidatos en córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratones pre-sintomáticos (3-4 semanas) y sintomáticos (8-9 semanas). Los gráficos representan la mediana de 6-8 réplicas de distintos animales con el rango intercuartílico (IC 95%) por condición (* $p < 0,005$, ** $p < 0,01$, test de Mann-Whitney bilateral). Se empleó *B2m* como control endógeno.

Tanto en córtex frontal como en hipocampo se constataron variaciones estadísticamente significativas (test de Mann Whitney, $p < 0,05$) en la expresión de algunos T-UCRs (figura 13), así como también en los niveles de algunos de sus genes huésped correspondientes (figura 14) en fase pre-sintomática y/o sintomática de animales KO. Ejemplos como los T-UCRs *uc.309* (figura 13A), *uc.186* y *uc.77* (figura 13B) mostraron una expresión significativamente alterada en córtex frontal o en hipocampo de animales KO, apreciándose también variaciones relevantes de alguna especie en ambos tejidos, como es el caso de *uc.336* (figura 13A,B). Dichos resultados certificaron la desregulación en la expresión de varios transcritos ultraconservados en tejidos notablemente afectados en ratones deficientes para MeCP2.

A.



B.

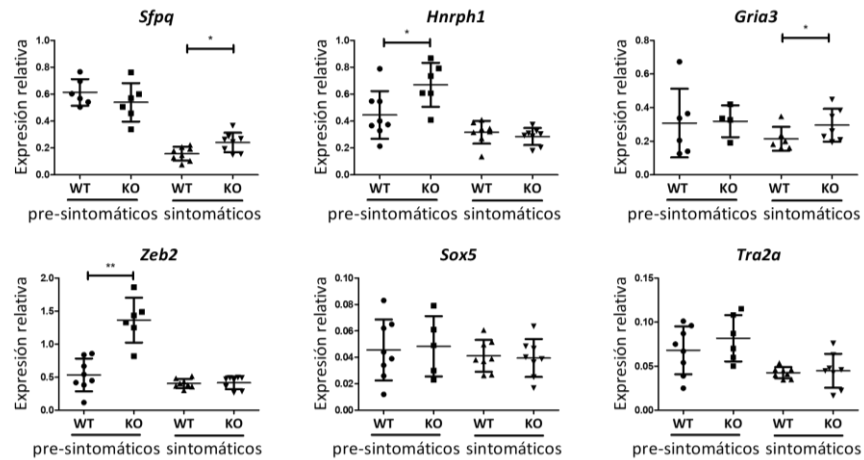


Figura 14. Niveles de expresión relativos de genes huésped correspondientes a *T-UCRs* candidatos en córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratones pre-sintomáticos (3-4 semanas) y sintomáticos (8-9 semanas). Los gráficos representan la mediana de 6-8 réplicas de distintos animales con el rango intercuartílico (IC 95%) por condición (*p<0,005, **<0,01, Test de Mann-Whitney bilateral). Se empleó *B2m* como control endógeno.

Por lo que respecta a los genes lineales codificantes anotados para cada uno de los *T-UCRs*, se pudieron confirmar también alteraciones significativas en su expresión en ambos tejidos, sugiriéndose una desregulación transcripcional potencialmente coordinada por la propia perturbación en la transcripción de sus *T-UCRs* y pudiendo implicar efectos colaterales relevantes en procesos moleculares esenciales para el desarrollo y función neural. Cabe destacar los cambios significativamente relevantes observados en los niveles del gen *Gria3* en ambos tejidos de ratones RTT sintomáticos (figura 14A,B), cuyo impacto en la adecuada funcionalidad de las redes sinápticas es especialmente determinante.

Las posiciones relativas de los transcritos ultraconservados candidatos para este estudio en referencia a sus genes huésped se encuentran representadas en la figura 15.

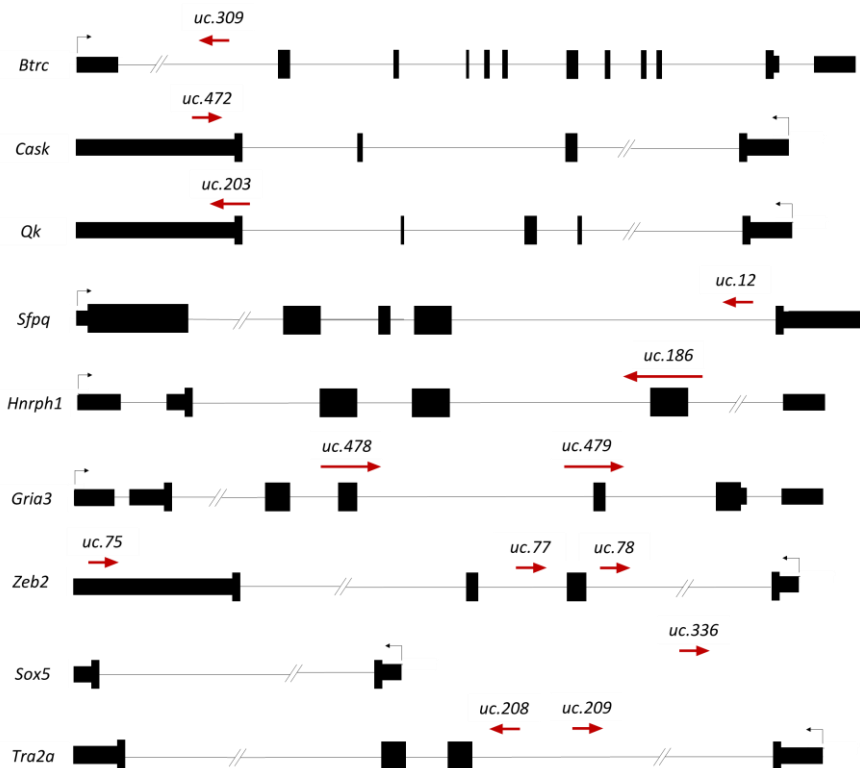


Figura 15. Posición relativa de *T-UCRs* candidatos en referencia a sus genes huésped correspondientes.

1.1.1.2. Análisis de alteraciones en el sistema *Evf2* en córtex frontal e hipocampo de ratones RTT

A través de los resultados obtenidos en el *array* de expresión llevado a cabo para la detección de especies ultraconservadas cuya transcripción resultara alterada en el modelo RTT de ratón, se observó una sutil desregulación en los niveles de los *T-UCRs* *uc.220* y *uc.221*, transcritos cuyo gen huésped correspondiente anotado era *Dlx5*. Tras lanzar las secuencias (obtenidas de la herramienta web *ucbase 2.0*, <https://ucbase.unimore.it/>) de ambos transcritos contra el genoma de ratón en el navegador genómico online *UCSC* (<https://genome.ucsc.edu/>), se demostró que la localización de dichos *T-UCRs* correspondía con zonas solapantes a la secuencia genómica del *lncRNA Evf2*, llamado también *Dlx6os1* en ratón. Más específicamente, la secuencia descrita para el *T-UCR uc.220* se encuentra en una zona intrónica de *Evf2* y “aguas arriba” (*upstream*) al gen *Dlx6* y en sentido opuesto. Por otro lado, la secuencia descrita para el *T-UCR uc.221* es parcialmente solapante con el primer exón correspondiente a *Evf2*, se encuentra “aguas abajo” (*downstream*) de *Dlx6* y coincide con gran parte del elemento potenciador ultraconservado *ei* (figura 16).

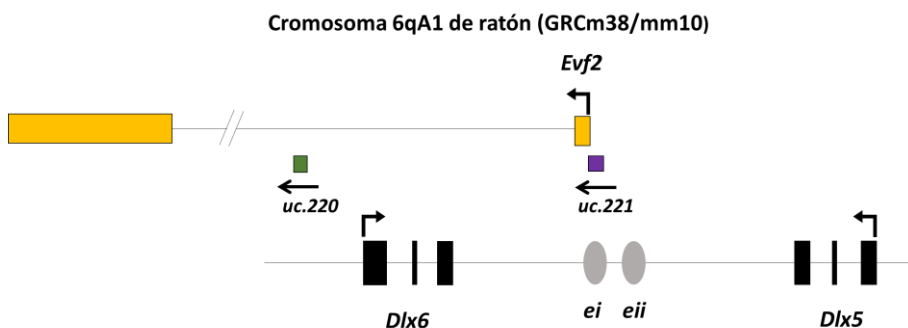
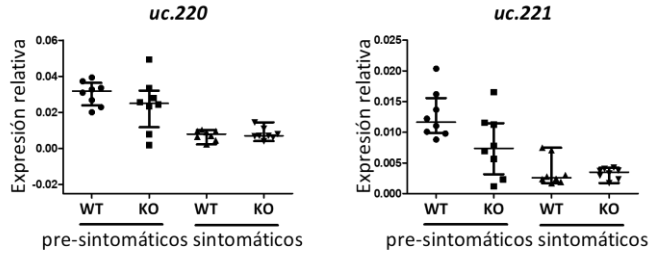


Figura 16. Organización genómica de los genes *Dlx5*, *Dlx6*, *Evf2* y las regiones ultraconservadas *uc.220*, *uc.221*, *ei* y *eii*. Las coordenadas son referentes al navegador genómico *UCSC* (GRCh/mm10).

Dada la relevante localización genómica de ambos *T-UCRs* y las pequeñas alteraciones transcripcionales observadas en los resultados del chip de expresión, se decidió llevar a cabo el análisis mediante *RT-qPCR* de los niveles de dichos transcritos en muestras de córtex frontal e hipocampo de ratón (figura 17). También se comprobó la posible desregulación en los niveles de expresión de los genes *Dlx5*, *Dlx6*, *Evf2* y otros candidatos relacionados con la vía de señalización de *Sonic hedgehog* (*Shh*) (figura 18). Como se ha mencionado previamente en la introducción de este proyecto, *Shh* es esencial para la especificidad interneuronal durante el desarrollo, proceso en el que se ha demostrado su interacción con genes de la familia *Dlx*, así como con los transcritos no codificantes *Evf2* y *Evf1* (isoforma alternativa de *Evf2*). Más concretamente, en ensayos *in vivo* realizados en estados embrionarios de ratón se demostraba que *Shh* es capaz de activar la expresión de *Evf2*, *Dlx2*, *Dlx5* y *Dlx6* en el prosencéfalo o también llamado cerebro anterior²⁴⁶. Siendo conscientes de dichos datos y sabiendo que MeCP2 tiene la capacidad de interactuar también con *Evf2* en la regulación de la transcripción de *Dlx5/6*, se decidió llevar a cabo el estudio de los niveles de expresión de factores directamente relacionados con la vía de señalización de *Shh* con el objetivo de comprobar posibles alteraciones resultantes de la deficiencia de MeCP2. Entre los candidatos de dicha vía, se seleccionó como transcrito importantemente representativo el del gen *Gli3* (*Gli Family Zinc Finger 3*). *Gli3* es un factor de transcripción que parece ser importante para la especificación celular en la zona cerebral dorsal, región en la que se generan principalmente neuronas glutamatérgicas. Sin embargo, la función de *Shh* es esencial en el direccionamiento para la formación celular de la región ventral, en la que se generan principalmente neuronas inhibitorias GABAérgicas. En ambos casos, *Shh* y *Gli3* son capaces de inhibirse mutuamente y el balance en la expresión de ambos genes es primordial para el correcto desarrollo cerebral²⁴⁷.

A.



B.

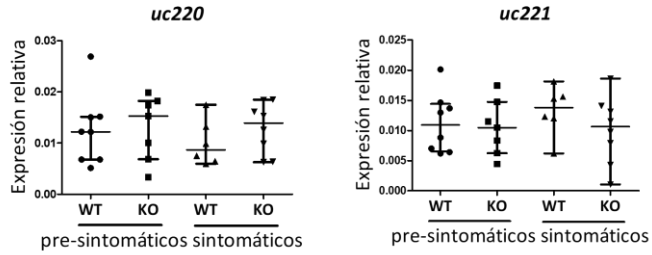
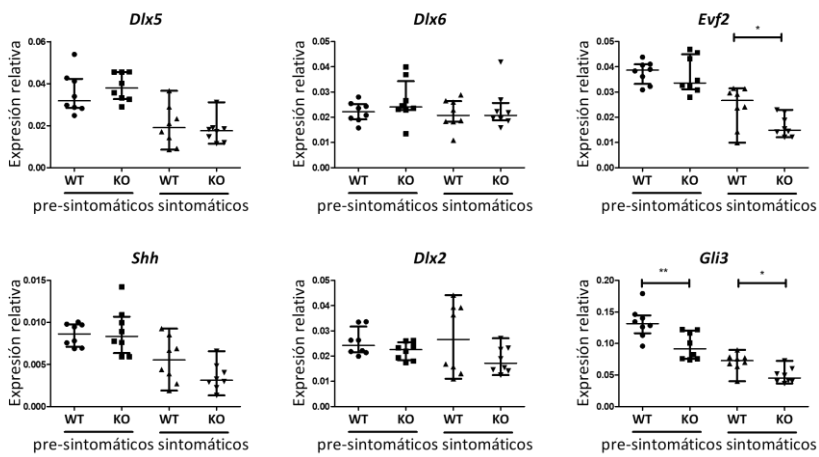


Figura 17. Niveles de expresión relativos de *T-UCRs uc.220* y *uc.221* en córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratones pre-sintomáticos (3-4 semanas) y sintomáticos (8-9 semanas). Los gráficos representan la mediana de 6-8 réplicas de distintos animales con el rango intercuartílico (IC 95%) por condición (* $p < 0,005$, ** $< 0,01$, Test de Mann-Whitney bilateral). Se empleó *B2m* como control endógeno.

A.



B.

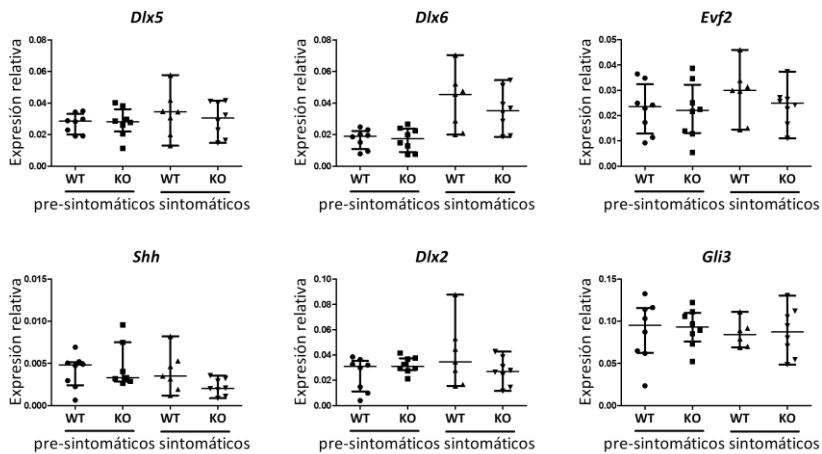


Figura 18. Niveles de expresión relativos de genes codificantes de la familia *Dlx*, la vía de *Shh* y el *lncRNA Evf2* en córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratones pre-sintomáticos (3-4 semanas) y sintomáticos (8-9 semanas). Los gráficos representan la mediana de 6-8 réplicas de distintos animales con el rango intercuartílico (IC 95%) por condición (* $p < 0,005$, ** $< 0,01$, Test de Mann-Whitney bilateral). Se empleó *B2m* como control endógeno.

Los análisis de expresión de *uc.220* y *uc.221* en muestras de ratón no mostraron alteraciones significativas de estos transcritos. No obstante, sí se observaron cambios relevantes en los niveles de algunos genes como el *lncRNA Evf2* y el transcrito *Gli3* en córtex frontal de ratones *KO*.

Dichos resultados muestran, por tanto, alteraciones transcripcionales en genes importantemente relacionados con el neurodesarrollo en condiciones de deficiencia de MeCP2, lo que indica la necesidad de profundizar en el estudio de dichas vías y cómo éstas pueden estar directamente afectadas por la desregulación de determinadas especies no codificantes como los *T-UCRs*.

1.1.1.3. Análisis de alteraciones en la expresión y edición del ARN de *Gria3* en córtex frontal e hipocampo de ratones RTT

Como se muestra en la tabla 6, dos de los *T-UCRs* candidatos de interés seleccionados a partir de los datos del *array* en el modelo animal fueron *uc.478* y *uc.479*, cuyas localizaciones genómicas son parcialmente solapantes a los exones “flop” y “flip”, respectivamente, del gen *Gria3* (figura 19) gen codificante de la subunidad 3 que forma parte de los receptores de glutamato de tipo AMPA. Dada la demostrada importancia de dichos receptores en el correcto balance de las transmisiones sinápticas inhibitorias y excitatorias, se decidió llevar a cabo, en primer lugar, el análisis de posibles alteraciones transcripcionales de ambos *T-UCRs*, así como del transcrito total de *Gria3* y de las isoformas específicas *flip* y *flop* (figura 20).



Figura 19. Representación intrónica/exónica de exones mutuamente excluyentes “flip” (verde) y “flop” (naranja) y *T-UCRs uc.478/479* en el locus de *Gria3*.

Pese a no observarse cambios significativos en los niveles de expresión de los *T-UCRs uc.478* y *uc.479*, se aprecia una tendencia negativa en la regulación de *uc.479* en córtex frontal de animales sintomáticos *KO* para MeCP2 (figura 20A).

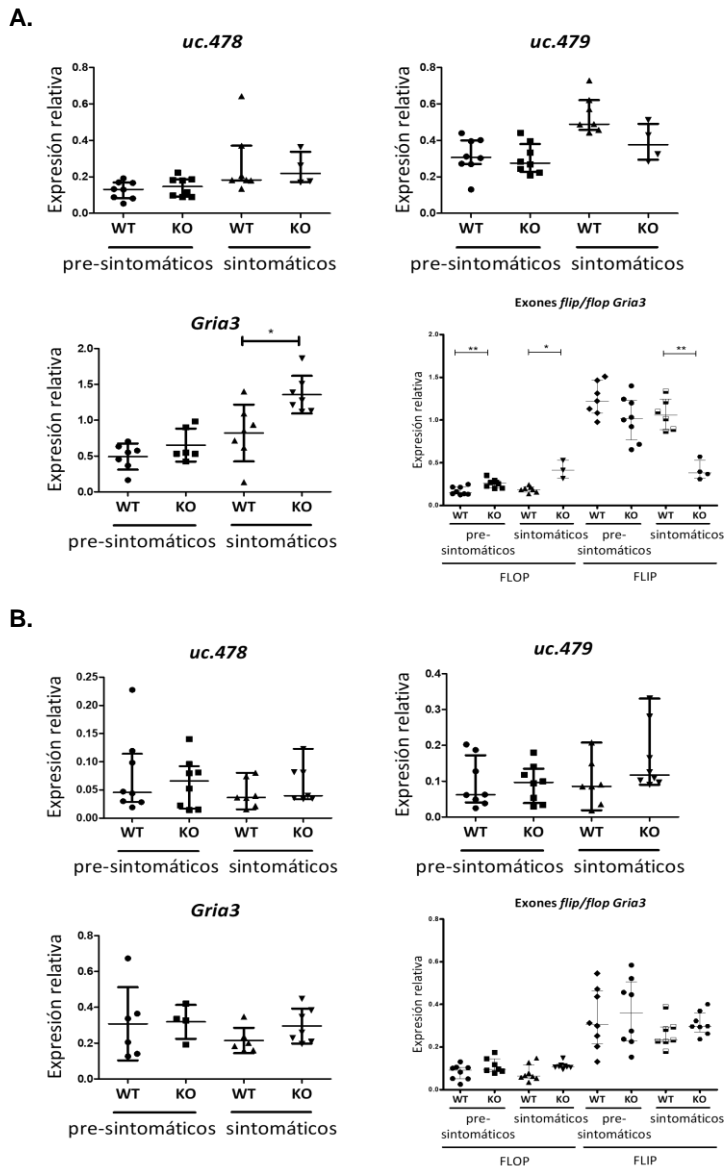


Figura 20. Niveles de expresión relativos de *T-UCRs uc.478/479*, *Gria3* total y transcritos alternativos *flip/flop* en córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratones pre-sintomáticos (3-4 semanas) y sintomáticos (8-9 semanas). Los gráficos representan la mediana de 6-8 réplicas de distintos animales con el rango intercuartílico (IC 95%) por condición (* $p < 0,005$, ** $< 0,01$, Test de Mann-Whitney bilateral). Se empleó *B2m* como control endógeno.

Asimismo, en dicho tejido se muestran alteraciones relevantes en la expresión del transcrito total de *Gria3* y también de las isoformas *flip* y *flop* particularmente (figura 20A), sugiriéndose una regulación aberrante tanto de los niveles de estabilidad del ARN mensajero total de *Gria3* como de la selección de los exones alternativos durante el *splicing* del pre-ARNm bajo condiciones de ausencia de MeCP2. Dada la importante disposición genómica de ambos *T-UCRs* y la demostrada relevancia de los mecanismos de *splicing* alternativo de los exones “flip” y “flop” y de edición de la posición R/G (situada en el primer exón constitutivo tan solo dos nucleótidos *upstream* del sitio aceptor de *splicing*) en la posterior función del receptor, se hipotetizó una posible alteración en los niveles de edición del ARN de *Gria3* resultante de la desregulación del mecanismo transcripcional en dicha zona. Por ello, se llevó a cabo el análisis estadístico por secuenciación de los niveles de edición del transcrito de *Gria3*, en el que se compararon muestras de hipocampo de ratones *WT* y *KO* para MeCP2 (figura 21). Lamentablemente, dicho estudio no llegó a optimizarse para muestras procedentes de córtex frontal debido a problemas recurrentes con la secuenciación de dichas muestras, pese a un mayor interés en esta región debido a los datos significativos observados en los análisis de expresión previos. En lo referente al estudio de los niveles proteicos de *Gria3* en muestras procedentes del modelo animal, tampoco se pudo llegar a poner a punto el anticuerpo necesario para la detección de dicha proteína. Sin embargo, sería necesario llevar a cabo dicho estudio en futuros experimentos.

				HIPOCAMPO			
				WT		KO	
	FLOP	FLIP	TOTAL		FLOP	FLIP	TOTAL
R (no editado)	4,2 % (3/71)	7 % (5/71)	11,3 % No editado (8/71)	R (no editado)	1,4 % (1/73)	4,1 % (3/73)	5,5 % No editado (4/73)
G (editado)	15,5 % (11/71)	73,2 % (52/71)	88,7 % Editado (63/71)	G (editado)	28,8 % (21/73)	65,8 % (48/73)	94,5 % Editado (69/73)
TOTAL	19,7 % Flop (14/71)	80,3 % Flip (57/71)		TOTAL	30,1 % Flop (22/73)	69,9 % Flip (51/73)	

p-valor test de Fisher (bilateral) 0,1864 p-valor test de Fisher (bilateral) >0,9999

Figura 21. Cuantificación de los niveles de edición de las variantes *flip/flop* del gen *Gria3* en muestras de hipocampo de ratones sintomáticos (8-9 semanas) *WT* y *KO* para *MeCP2*. Se empleó la prueba exacta de Fisher bilateral para medir la significancia estadística de los análisis de edición.

Los resultados obtenidos en el estudio de la edición del ARN de *Gria3* en la posición R/G mostraron un pequeño incremento, aunque no significativo, de los niveles totales de dicho proceso en animales *KO* (del 88,7% de transcritos totales editados al 94,5%). Por otro lado, también se observó un cambio en el balance de expresión de las isoformas *flip/flop* bajo condiciones de supresión de *MeCP2*, favoreciéndose la transcripción (del 19,7% al 30,1%) y con ello también el aumento de la edición (del 15,5% al 28,8%) de la variante *flop* de *Gria3*.

1.1.2. Selección de *circRNAs* candidatos

Los resultados obtenidos a partir del chip de expresión realizado para la caracterización de la población de *circRNAs* en tejidos cerebrales de ratones RTT mostraron también alteraciones en la transcripción de un gran número de estas especies. En especial se destacan variaciones en muestras de hipocampo, en las que se observó una mayor proporción de transcritos circulares con una expresión significativamente reducida en comparación a las muestras *WT* (figura 22B).

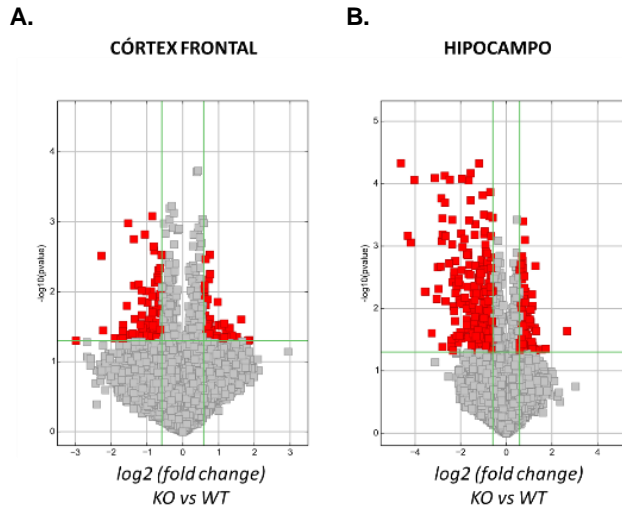


Figura 22. Caracterización de la población de *circRNAs* alterados en regiones de córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratones deficientes para MeCP2. *Volcano plots* indicando la expresión diferencial (izquierda= decreciente, derecha=creciente) en córtex frontal e hipocampo entre ratones *WT* y *KO*. Las líneas verdes verticales corresponden a un cambio de 1,5 arriba y abajo, respectivamente, y la línea verde horizontal representa un p-valor de 0,05 (*t-test* no pareado bilateral).

Por otro lado, es importante remarcar que el estudio del reactoma realizado para los genes huésped correspondientes a los transcritos circulares significativamente alterados mostró un enriquecimiento de éstos en procesos biológicos relacionados con el sistema neuronal (figura 23A,C), especialmente en muestras procedentes de hipocampo (figura 23C). En las categorías obtenidas destacaron, del mismo modo que en el análisis de *T-UCRs*, aquellas directamente relacionadas con los receptores de glutamato. También es necesario resaltar la significativa representación de dichos genes en compartimentos celulares como el axón neuronal principal, así como en zonas esenciales para el correcto desarrollo del citoesqueleto (figura 23 B,D).

CORTEX FRONTAL

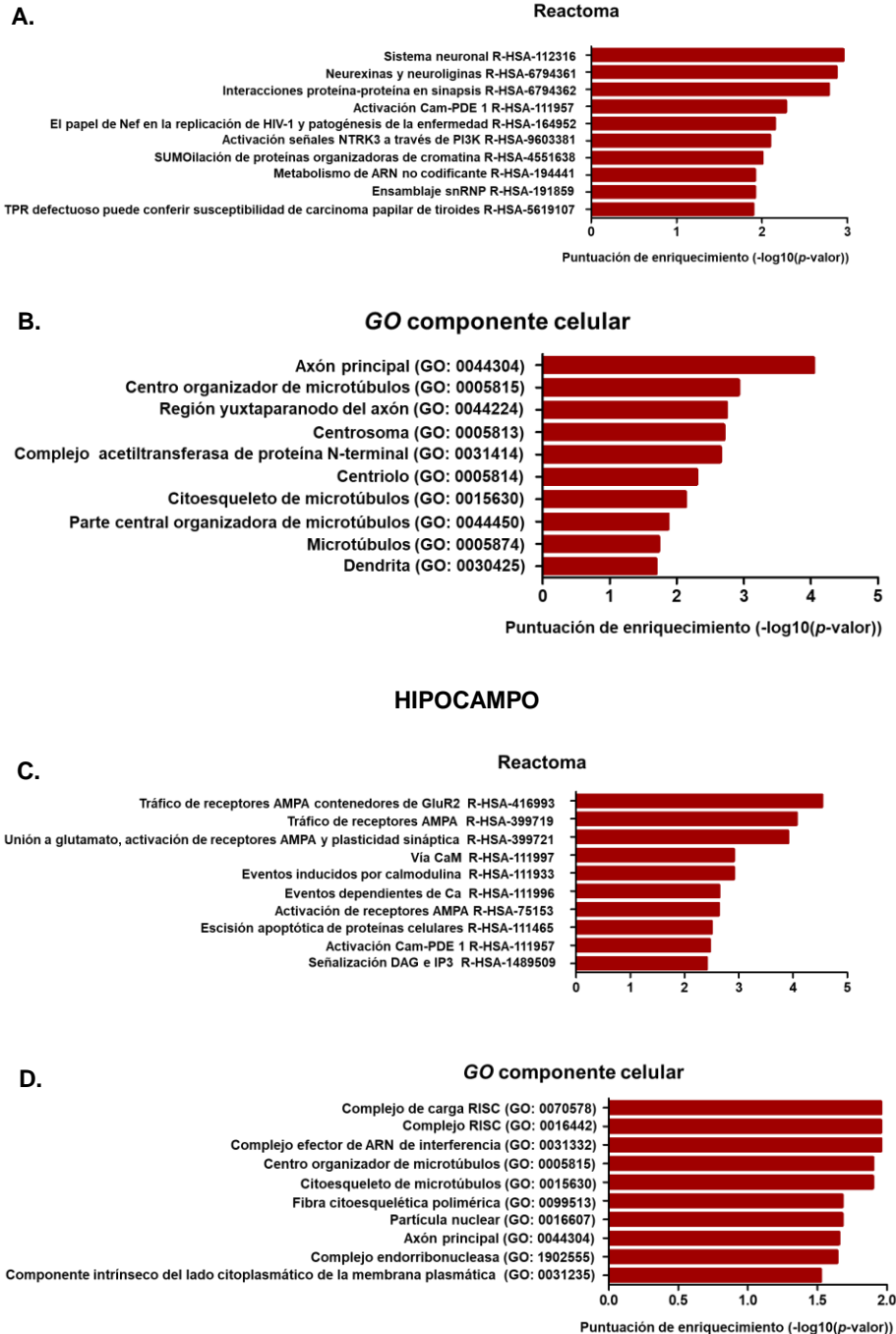


Figura 23. Análisis del reactoma y componente celular de genes huésped correspondientes a *T-UCRs* con expresión alterada en córtex frontal (A) e hipocampo (B) del modelo RTT de ratón. Enriquecimiento diferencial de dichos genes de acuerdo con las reacciones celulares en las que se encuentran implicados, así como los compartimentos celulares en los que se localizan (se muestran las diez principales). El eje Y muestra los términos de ontología génica y el eje X muestra la significancia estadística.

Del mismo modo que con la población de *T-UCRs*, se llevó a cabo de nuevo una selección de *circRNAs* candidatos para su posterior análisis. En base a los valores de cambio (*fold change*) observados para estas especies en ratones *KO*, así como las funciones biológicas descritas para sus genes lineales correspondientes, se siguió con un estudio más exhaustivo de aquellos potencialmente relevantes en vías relacionadas con el neurodesarrollo (tabla 7).

<i>circRNAs</i> con expresión alterada en muestras de hipocampo			
<i>Gen huésped (cadena)</i>	Nombre completo en inglés	Papel biológico	<i>circRNA</i>
<i>Birc6</i> (+)	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 6</i>	Inhibición de la apoptosis facilitando la degradación de proteínas apoptóticas por ubiquitinación. Implicación en neurodegeneración causada por ácido kaínico ²⁴⁸ .	<i>mmu_circRNA_013298</i>
<i>Sirt2</i> (+)	<i>Sirtuin 2</i>	Desacetilación de histonas. Implicación en varios trastornos neurodegenerativos como la degeneración Walleriana (degeneración de axones y sinapsis tras lesión) ²⁴⁹ .	<i>mmu_circRNA_41253</i>
<i>Dnah2</i> (-)	<i>Dynein axonemal heavy chain 2</i>	Permite la actividad motora de microtúbulos y tiene función ATPasa.	<i>mmu_circRNA_23592</i>
<i>Foxp1</i> (-)	<i>Forkhead Box P1</i>	Factor de transcripción con funciones importantes en la regulación de la especificidad celular y tisular durante el desarrollo. Asociación con retraso mental con deterioro lingüístico con o sin rasgos autistas ²⁵⁰ .	<i>mmu_circRNA_40615</i>

<i>Mllt3</i> (+)	<i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 3</i>	Mediación en la activación transcripcional. Contribución en el desarrollo de neuronas corticales ²⁵¹ .	<i>mmu_circRNA_37101</i>
------------------	---	--	--------------------------

circRNAs con expresión alterada en muestras de córtex frontal

Gen huésped (cadena)	Nombre completo en inglés	Papel biológico	circRNA
<i>Sirt2</i> (+)	<i>Sirtuin 2</i>	Desacetilación de histonas. Implicación en varios trastornos neurodegenerativos como la degeneración Walleriana (degeneración de axones y sinapsis tras lesión) ²⁴⁹ .	<i>mmu_circRNA_41253</i>
<i>Map1a</i> (+)	<i>Microtubule-associated protein 1 A</i>	Permite el anclaje de receptores de glutamato de tipo NMDA (<i>N-methyl-D-aspartate</i>) al citoesqueleto. Papel fundamental en el mantenimiento de la plasticidad sináptica ²⁵² .	<i>mmu_circRNA_34414</i>

Tabla 7. Lista de circRNAs y genes huésped candidatos con niveles de expresión alterados en hipocampo y/o córtex frontal de ratones KO para MeCP2.

1.1.2.1. Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de circRNAs candidatos en hipocampo y córtex frontal de ratones RTT

Los resultados de la validación de los niveles transcripcionales de las especies circulares seleccionadas por su potencial significación funcional en vías esenciales para el neurodesarrollo mostraron cambios significativos en la expresión de varios candidatos, especialmente en muestras de córtex frontal de ratones afectados (figura 24A).

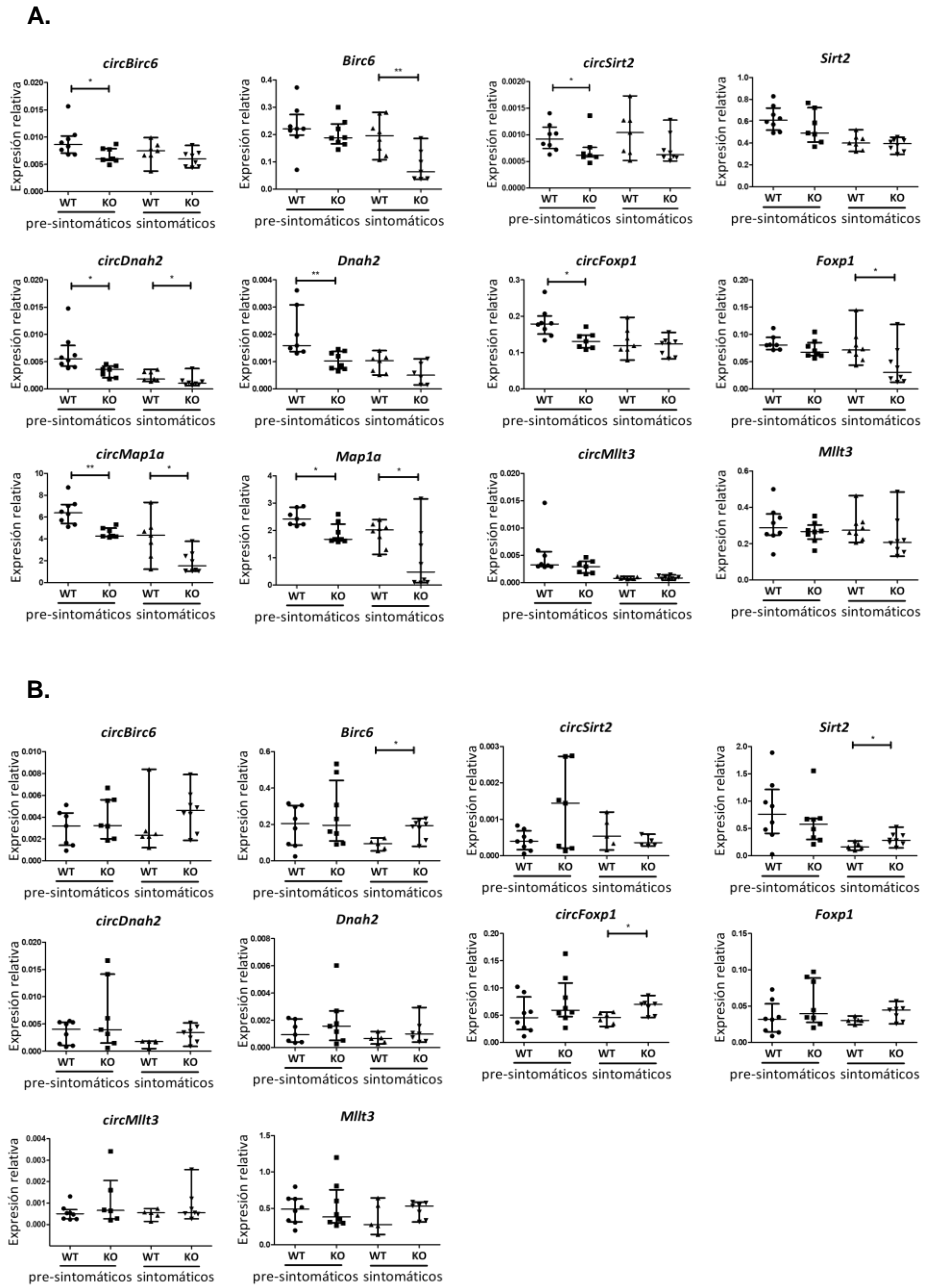


Figura 24. Niveles de expresión relativos de *circRNAs* candidatos (izquierda) y sus genes huésped (derecha) correspondientes en córtex frontal (A) e hipocampo (B) de ratones pre-sintomáticos y sintomáticos. Los gráficos representan la mediana de 6-8 réplicas de distintos animales con el rango intercuartílico (*IC* 95%) por condición (* $p < 0,005$, ** $< 0,01$, test de Mann-Whitney bilateral). Se empleó *B2m* como control endógeno.

El estudio de expresión manifestó también alteraciones transcripcionales importantes en varios de los genes lineales correspondientes a los *circRNAs* candidatos, mostrándose de nuevo niveles aberrantes de transcritos sustanciales en vías relacionadas con la función y desarrollo neural. Entre ellos destacan transcritos como *Birc6*, con expresión significativamente desregulada en córtex frontal e hipocampo; *Map1a*, con cambios también relevantes en córtex frontal de animales pre-sintomáticos y sintomáticos; y *Sirt2*, con niveles notablemente incrementados en hipocampos de ratones sintomáticos con supresión de MeCP2.

1.1.2.2. Caracterización de los niveles de expresión de *Sirt2* en el modelo RTT de ratón

Tras la exploración de la función biológica de los genes lineales correspondientes a *circRNAs* cuya expresión se mostraba desregulada en el *array* y una selección de aquellos que pudieran ser relevantes en vías relacionadas con el neurodesarrollo, uno de los que suscitaron mayor interés fue el gen *Sirt2*, cuya importancia en la funcionalidad neuronal ha sido previamente demostrada²⁵³. SIRT2 forma parte de una familia de enzimas conocidas como sirtuinas y cuyo papel principal es la catálisis de la desacetilación de histonas, así como de otros sustratos²⁵⁴. De manera importante, publicaciones previas muestran un incremento significativo de los niveles proteicos de HDAC6, con función desacetilasa de α -tubulina igual que SIRT2, en neuronas y astrocitos deficientes para MeCP2^{255,256}. Dichas observaciones refuerzan la potencial relevancia del papel que podría desempeñar SIRT2 en la enfermedad de Rett.

La validación mediante *RT-qPCR* en muestras de ratón para la especie circular *circSirt2* (*mmu_circRNA_41253*) mostró una disminución significativa en los niveles de dicho transcrito en córtex frontal de animales pre-sintomáticos *KO* para MeCP2 (figura 25B). No obstante, no se apreciaron cambios relevantes en referencia al ARN lineal. Por otro lado, también en muestras procedentes de córtex frontal, aunque en este caso de animales sintomáticos, se pudo observar un aumento considerable de la proteína Sirt2 bajo un contexto de ausencia de MeCP2. Dichos resultados sugieren un posible papel del transcrito circular de *Sirt2* en *cis* en la regulación a un nivel traduccional. Finalmente, cabe destacar también la disminución en los niveles de α -Tubulina acetilada en correspondencia con el incremento en los niveles de *Sirt2*, siendo la α -Tubulina una proteína diana directa de la acción desacetilasa de Sirt2 (figura 25B).

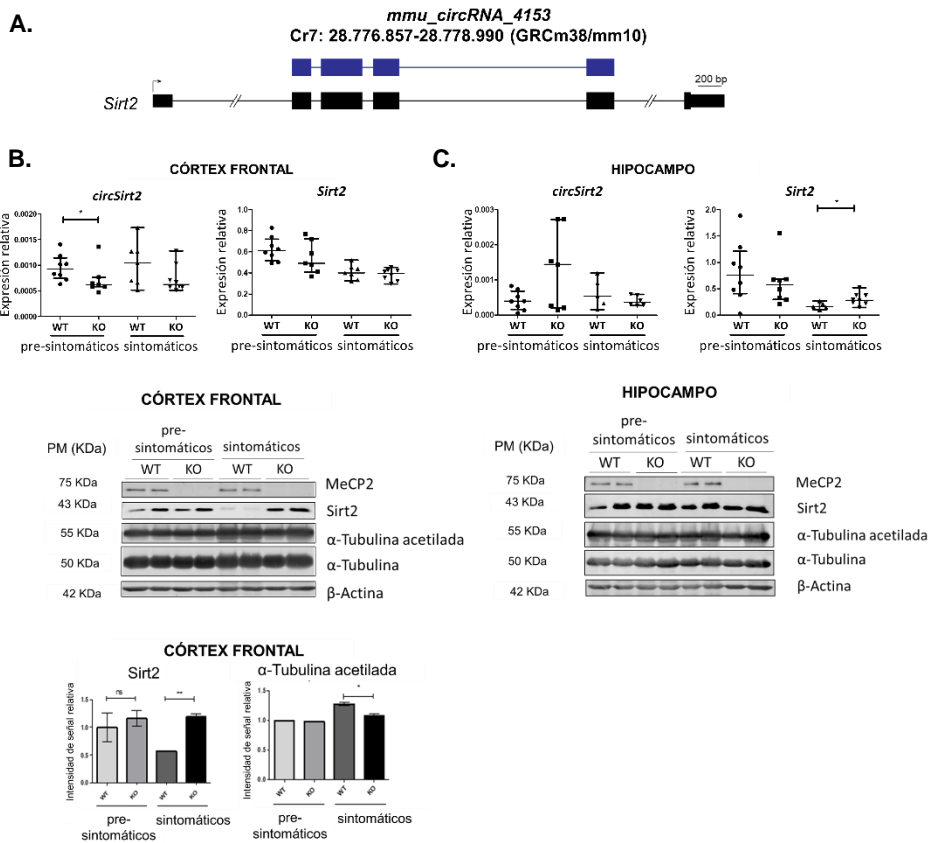


Figura 25. Caracterización de los niveles de expresión de Sirt2 en córtex frontal (B) e hipocampo (C) de ratones WT y KO para MeCP2. A. Organización exónica/intrónica de los transcritos lineal (negro) y circular (azul) en el locus de *Sirt2*. Las coordenadas son referentes al navegador genómico UCSC (GRCh/mm10). Solo los exones potencialmente circularizados y las regiones 5' y 3' del transcrito lineal de *Sirt2* se encuentran incluidos. B, C. Arriba: Los niveles de expresión de los transcritos *Sirt2* y *circSirt2* fueron analizados mediante RT-qPCR en córtex frontal (B) e hipocampo (C) de ratones pre-sintomáticos (3-4 semanas) y sintomáticos (8-9 semanas) WT y KO para MeCP2. Los gráficos representan la mediana de 6-8 réplicas de distintos animales con el rango intercuartílico (IC 95%) por condición (* $p < 0,005$, ** $< 0,01$, test de Mann-Whitney bilateral). Se empleó *B2m* como control endógeno. Abajo: Análisis por western blot de proteínas MeCP2, Sirt2, α -Tubulina acetilada, α -Tubulina y β -actina como control endógeno de carga en córtex frontal (B) e hipocampo (C) de ratones pre-sintomáticos y sintomáticos WT y KO para MeCP2.

En referencia a los análisis llevados a cabo en muestras de hipocampo (figura 25C), los resultados no mostraron alteraciones destacables en la expresión del transcrito circular o los niveles proteicos de Sirt2 en animales *KO*. Sí se observó, sin embargo, un aumento en la transcripción del transcrito lineal en ratones sintomáticos.

2. Modelo celular

2.1. Caracterización del modelo celular neural humano *knockout* para MeCP2

En paralelo a los análisis realizados en el modelo RTT de ratón del que se disponía en el grupo, se llevó a cabo el diseño y generación de una línea neural progenitora (ReNcell VM) deficiente para MeCP2 a través de la aplicación del sistema de edición génica *CRISPR/Cas9*. Como resultado del corte de doble hebra provocado en la secuencia genómica de *MECP2*, se pudo observar la delección de seis nucleótidos en dicho gen (figura 26A), resultando en la aparición de un codón *stop* prematuro y la subsecuente traducción aberrante de la proteína (figura 26B). El producto final fue descrito de la siguiente manera tras la secuenciación y traducción *in silico* del transcrito generado: NM_004992.3c.398_403del. NP_004983:p.(Arg133Ter). Los resultados del análisis por *western blot* para la detección de la proteína MeCP2 revelaron la supresión de ésta en el modelo celular *in vitro* generado, tanto en su estado progenitor como tras la inducción de la libre diferenciación de dicha línea durante 30 días (figura 26C).

2.2. Identificación y análisis de *T-UCRs* y *circRNAs* con expresión alterada en el modelo celular neural humano *knockout* para MeCP2

Pese a la alta conservación descrita en los patrones de expresión de un gran número de transcritos circulares entre la especie murina y la especie humana, especialmente en el sistema nervioso central²⁵⁷, el traslado de los datos obtenidos en un modelo animal al sistema humano tiene varias limitaciones. Por tanto, se hace imprescindible la ejecución de los estudios llevados a cabo en el modelo animal también en un modelo humano, razón por la cual se realizó de nuevo el análisis transcripcional de *circRNAs* mediante chips de expresión comerciales en el modelo neural *in vitro* generado en el laboratorio. Del mismo modo, se interrogaron también otros *lncRNAs* lineales en las mismas muestras, entre los que se encontraron varios *T-UCRs* con niveles de expresión alterados.

En este caso, los análisis de expresión diferencial se llevaron a cabo mediante distintas comparaciones. Por un lado, las líneas *KO* para MeCP2 se equipararon con líneas *WT* en las mismas condiciones de tiempo de diferenciación (estado progenitor o células neurales de libre diferenciación). Por otro lado, el estudio de posibles cambios transcripcionales se llevó a cabo también confrontando los niveles de los transcritos interrogados en células neurales con 30 días de diferenciación con células neurales progenitoras bajo las mismas condiciones génicas (*WT* o *KO*).

2.2.1. Análisis de alteraciones en la expresión y edición del ARN de *GRIA3* en el modelo celular neural humano *knockout* para MeCP2.

Tras los datos observados en referencia a las posibles alteraciones transcripcionales del gen *Gria3* y los transcritos ultraconservados *uc.478* y *uc.479* solapantes con los exones “flop” y “flip” de dicho gen en el modelo animal, se llevaron a cabo también análisis de expresión y de edición del ARN de *GRIA3* en el modelo humano generado en el laboratorio (figura 27). En este caso, el estudio se realizó en distintos puntos temporales durante el proceso de diferenciación de dicha línea neural: estado progenitor y células en proceso de diferenciación durante 3, 7, 14 y 30 días. El análisis mostró cambios significativos en un contexto de deficiencia de MeCP2 para las variantes *flip/flop* de *GRIA3* (figura 27B) y el *T-UCR uc.479* (figura 27C) tanto en estado progenitor como con 30 días de maduración de la línea neural. En referencia a los niveles transcripcionales del *T-UCR uc.478*, los valores de Ct observados eran prácticamente indetectables en estas muestras, imposibilitando la cuantificación de dicho transcrito de manera fiable. Por lo que respecta a los niveles de edición del ARN de *GRIA3* en la posición R/G, se observó una caída significativa en la línea celular *KO* para MeCP2 (de un 70% de edición aproximadamente en muestras *WT* a un 50% en condiciones *KO*) en el mayor estado de maduración analizado (30 días), siendo además la variante *flip* la más abundante en ambos casos de nuestro modelo celular (figura 27D). Por otro lado, el análisis por *western blot* de la proteína *GRIA3* en estas mismas muestras también revelaba, de la misma forma que el estudio de los niveles de ARNm, una disminución en las células diferenciadas en las que MeCP2 había sido suprimido (figura 27E).

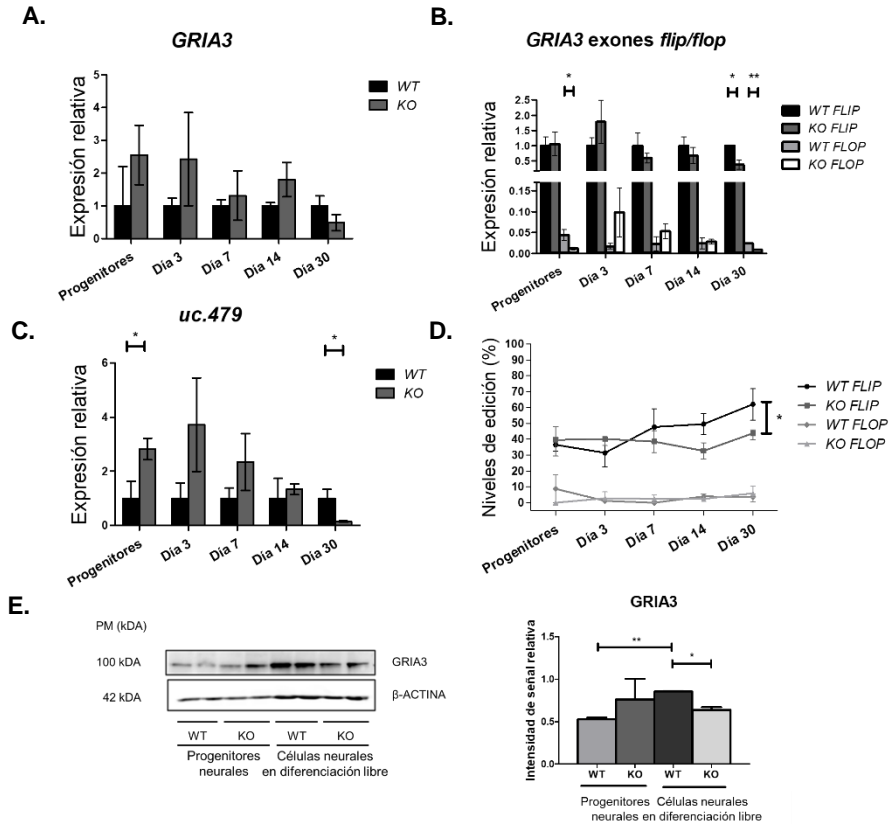


Figura 27. Caracterización de los niveles de expresión de *GRIA3* y *T-UCRs uc.478/479* y cuantificación de la edición del ARN de *GRIA3* en el modelo celular neural humano. **A.** Niveles de expresión relativos de *GRIA3* total. **B.** Niveles de expresión relativos de los transcritos alternativos *flip* y *flop*. **C.** Niveles de expresión relativos del *T-UCR uc.479*. Los niveles de expresión fueron analizados por *RT-qPCR* en células neurales progenitoras y libremente diferenciadas durante 3, 7, 14 y 30 días, *WT* y *KO* para *MECP2*. Los gráficos representan la media de tres réplicas con la desviación estándar por condición (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, test bilateral de Mann-Whitney) y normalizados respecto a la línea *WT*. Se empleó *RPL13* como control endógeno. **D.** Niveles de edición de los transcritos *flip* y *flop* en células neurales progenitoras y libremente diferenciadas durante 3, 7, 14 y 30 días, *WT* y *KO* para *MECP2*. Los gráficos representan la mediana de tres réplicas con el rango intercuartílico (*IC* 95%) por condición (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, test bilateral de Mann-Whitney). **E.** Izquierda: Análisis por *western blot* de las proteínas *GRIA3* y β -*ACTINA* como control de carga endógeno en células neurales progenitoras y en diferenciación libre durante 30 días, *WT* y *KO* para *MeCP2*. La imagen muestra duplicados de cada condición. Derecha: Medida cuantitativa correspondiente a los niveles proteicos de *GRIA3* observados en los progenitores neurales y células en diferenciación libre.

2.2.1.1. Análisis de metilación en exones “flip” y “flop” en el modelo celular neural humano *knockout* para MeCP2

Estudios recientes han demostrado el papel crítico de MeCP2 en la regulación del *splicing* alternativo en células neurales²⁵⁸. Es por ello por lo que los cambios significativos observados en la expresión de las isoformas *flip* y *flop* de *GRIA3* en condiciones de ausencia de MeCP2 fueron indicio para el estudio comparativo de los niveles de metilación de dinucleótidos CpG localizados en regiones cercanas a ambos exones. Para dicha validación, se interrogaron un total de siete posiciones en zonas colindantes al exón “flip” (figura 28A) y doce en la región “flop” (figura 28B), comparando los niveles de metilación en células *KO* para MeCP2 con células *WT*, tanto en estado progenitor como tras 30 días de diferenciación libre.

Los resultados del análisis de metilación mostraron, por un lado, altos niveles de metilación en las posiciones interrogadas del exón “flop” (figura 28B), además de no observarse diferencias significativas en dichos valores en la comparación de las condiciones *WT* y *KO*. Por otro lado, en lo que respecta al exón “flip”, éste presentaba zonas con niveles de metilación más bajos en los extremos del exón, y se observó un cambio especialmente notable en los valores de dicha modificación epigenética en la tercera posición interrogada (CpG3) en células libremente diferenciadas, con un mayor estado de metilación en dicha región en condiciones *KO* (figura 28A).

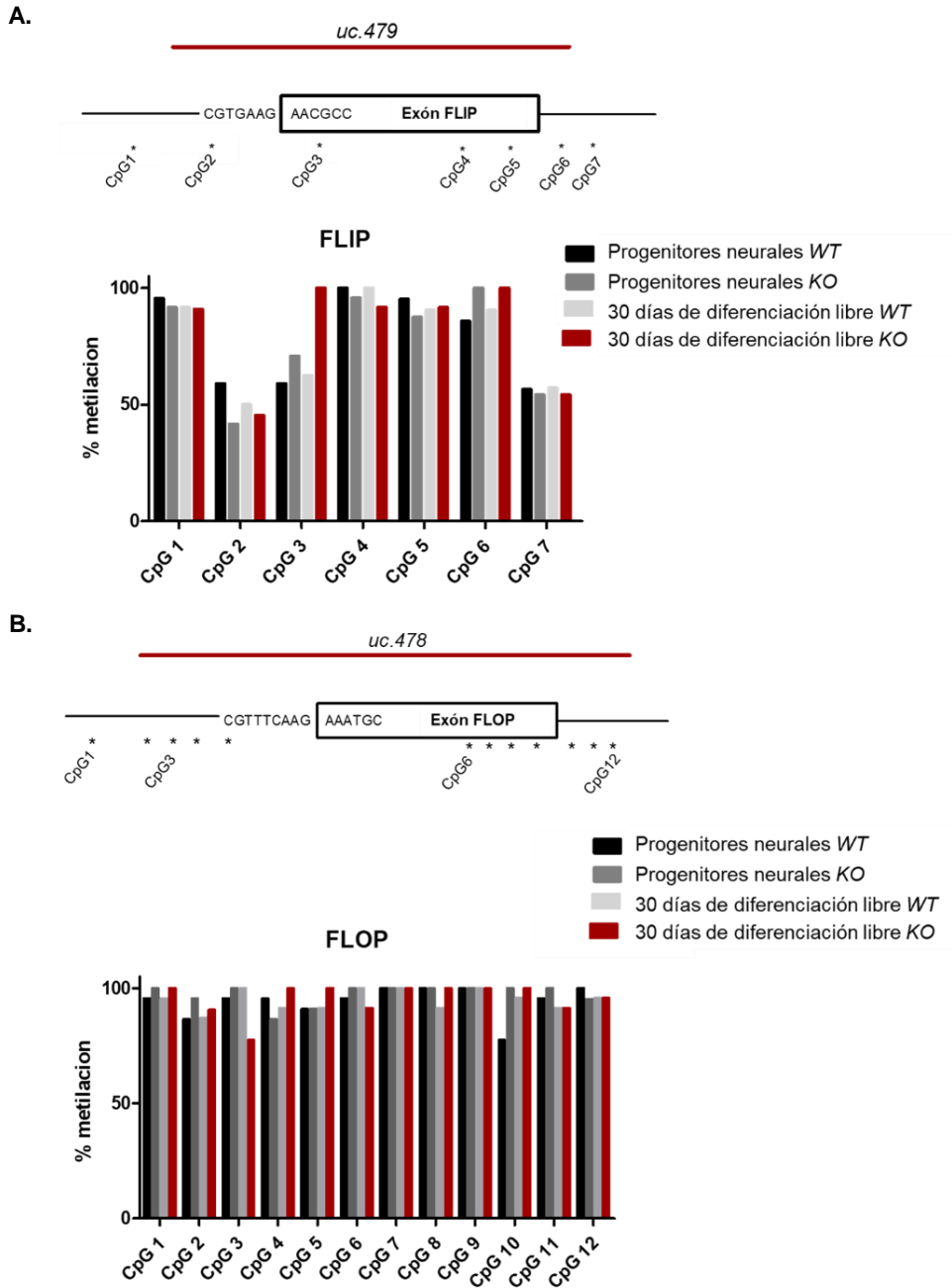


Figura 28. Análisis de metilación en exones “flip” (A) y “flop” (B) del gen *GRIA3* en el modelo celular neural humano. Los valores de metilación para cada posición CpG se muestran en %.

2.2.2. Identificación y análisis de *circRNAs* con expresión alterada en el modelo celular neural *knockout* para MeCP2

Los resultados en el modelo humano *in vitro* también mostraron la desregulación de varios transcritos circulares en un contexto de ausencia de MeCP2, especialmente en un estado diferenciado (figura 29B). Además, se observó también el aumento en los niveles de un gran número de dichas especies tras 30 días de diferenciación en condiciones *WT* (figura 29C), demostrándose la potencial significancia funcional de varios *circRNAs* durante el neurodesarrollo. Sin embargo, la cantidad de transcritos circulares con una expresión incrementada durante la maduración de las líneas neurales con supresión de MeCP2 era menor (figura 29D) en comparación con las líneas *WT*, sugiriéndose alteraciones relevantes en el proceso de diferenciación en dichas células.

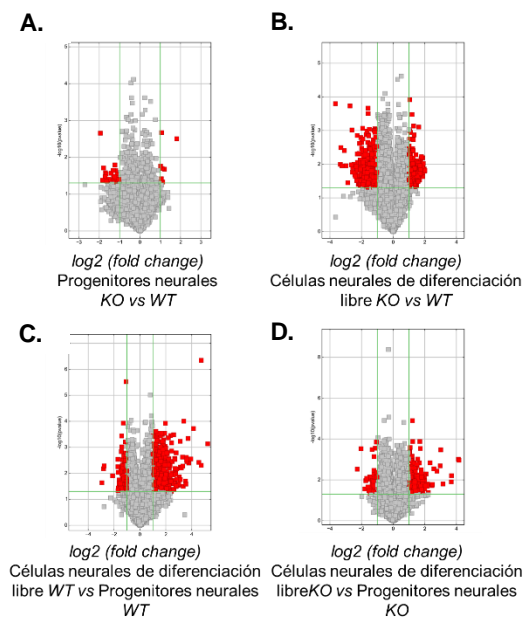


Figura 29. Caracterización de la población de *circRNAs* alterados en el modelo celular neural humano. *Volcano plots* indicando la expresión diferencial (izquierda=decreciente, derecha=creciente) entre líneas *WT* y *KO* en el mismo estado de desarrollo (A,B) y entre líneas en distinto estado de diferenciación y en las mismas condiciones genéticas (C,D). Las líneas verdes verticales corresponden a un cambio de 1,5 arriba y abajo, respectivamente, y la línea verde horizontal representa un p-valor de 0,05 (*t-test* no pareado bilateral).

Dadas las distribuciones de los *genes huésped* observadas en los *volcano plots* que se muestran en la figura 29, decidimos llevar a cabo el análisis del reactoma y ontologías génicas poniendo especial atención hacia los genes lineales correspondientes a ARNs circulares con expresión alterada durante el proceso de diferenciación en células *WT* y *KO*. En lo que a ello respecta, los cambios más destacables se observaron en los genes huésped correspondientes a especies circulares con expresión negativa durante el proceso de diferenciación. Concretamente, en células *WT* se observó un enriquecimiento de genes con expresión disminuida relacionados en gran parte con procesos del ciclo celular. Dichos resultados cobran sentido teniendo en cuenta que las líneas neurales pierden su capacidad de división durante el proceso de diferenciación. Sin embargo, las líneas *KO* mostraban categorías asociadas a la respuesta celular a estrés, vías apoptóticas y muerte celular, comprobándose la función crítica de MeCP2 en el correcto desarrollo neural.

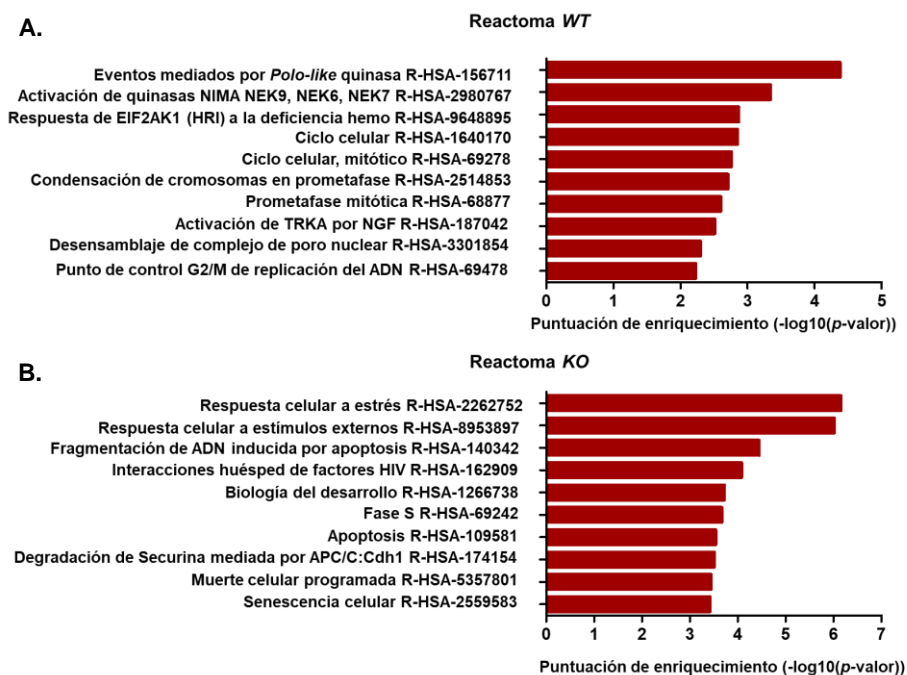


Figura 30. Análisis de reactoma de genes huésped correspondientes a *circRNAs* con regulación negativa durante el proceso de diferenciación de células *WT* (A) y *KO* (B) para MeCP2 en el modelo celular neural humano.

2.2.2.1. Selección de *circRNAs* candidatos

Tras llevar a cabo de nuevo el protocolo de selección de candidatos relevantes para su posterior validación por *RT-qPCR*, se decidió continuar con el análisis de los niveles de expresión de las formas circulares y lineales de los genes *EZH2*, *PSEN1*, *TCF4*, *UBE3A*, *KDMA1* y *CNIH3* (tabla 8).

Gen huésped (cadena)	Nombre completo en inglés	Papel biológico	<i>circRNA</i>
<i>EZH2</i> (+)	<i>Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i>	Implicación en el mantenimiento del estado represivo transcripcional. Papel en sistema hematopoyético y sistema nervioso central ²⁵⁹ .	<i>hsa_circRNA_104517</i>
		Actividad peptidasa.	
<i>PSEN1</i> (+)	<i>Presenilin 1</i>	Pacientes con forma hereditaria de la enfermedad de Alzheimer son portadores de mutaciones en presenilinas 1 y 2 ²⁶⁰ .	<i>hsa_circRNA_101396</i>
<i>TCF4</i> (-)	<i>Transcription Factor 4</i>	Factor de transcripción involucrado en el inicio de la diferenciación neuronal ²⁶¹ .	<i>hsa_circRNA_047733</i>
		Actividad coactivadora de la transcripción y actividad ligasa.	
<i>UBE3A</i> (-)	<i>Ubiquitin Protein Ligase E3A</i>	La delección de la copia materna de este gen causa síndrome de Angelman, caracterizado por disfunciones motoras e intelectuales severas ²⁶² .	<i>hsa_circRNA_005147</i>
<i>KDMA1</i> (+)	<i>Lysine Demethylase 1A</i>	Función en el silenciamiento génico a través de actividad demetilasa de histonas. Asociado con neurodegeneración hipocampal y cortical ²⁶³ .	<i>hsa_circRNA_100098</i>

<i>CNIH3</i> (+)	<i>Cornichon Family AMPA Receptor Auxiliary Protein 3</i>	Regulación del tráfico y propiedades de apertura de receptores de glutamato de tipo AMPA.	<i>hsa_circRNA_016598</i>
------------------	---	---	---------------------------

Tabla 8. Lista de *circRNAs* y genes huésped candidatos con niveles de expresión alterados en células neurales progenitoras y libremente diferenciadas durante 30 días *KO* para MeCP2.

2.2.2.1.1. Análisis mediante *RT-qPCR* de la expresión de *circRNAs* candidatos en el modelo celular neural humano *knockout* para MeCP2

Los análisis de expresión de los candidatos seleccionados revelaron alteraciones estadísticamente significativas tanto en los niveles de las variantes circulares (figura 31A) como en sus formas lineales (figura 31B) en varias situaciones. Por un lado, se observaron cambios sustanciales al compararse líneas celulares *KO* para MeCP2 con líneas *WT*, especialmente en condiciones progenitoras. Entre ellos destacan los transcritos circular y lineal de los genes *EZH2* y *CNIH3*, así como *circPSEN1* y *circKDM1A*. Por otro lado, se mostraron también niveles de expresión alterados de todos los candidatos analizados debido al proceso de diferenciación neural.

Cabe destacar que, de manera general, los transcritos circulares interrogados y sus genes huésped correspondientes presentan cambios de expresión en la misma dirección, siendo solo el gen *KDM1A* el que muestra una tendencia inversa entre ambas especies, sugiriéndose un posible caso de expresión antagónica.

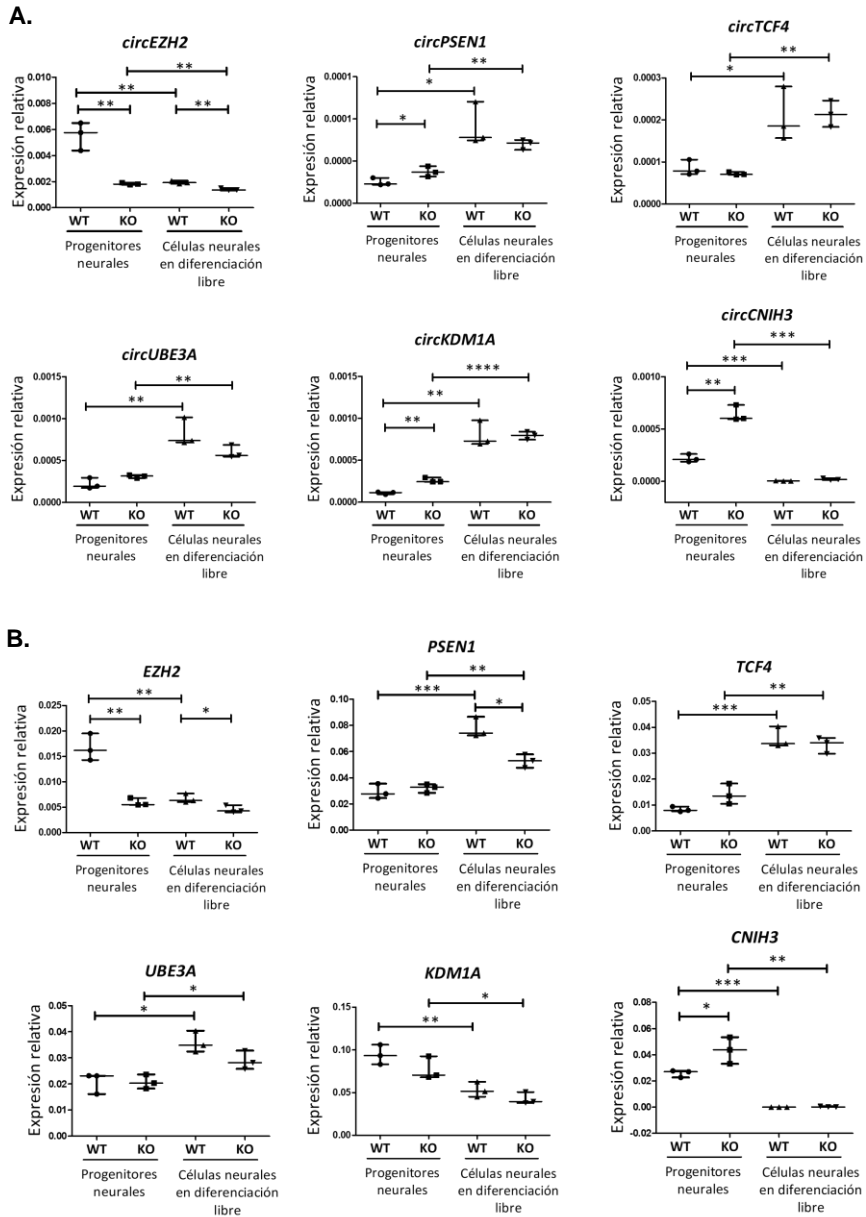


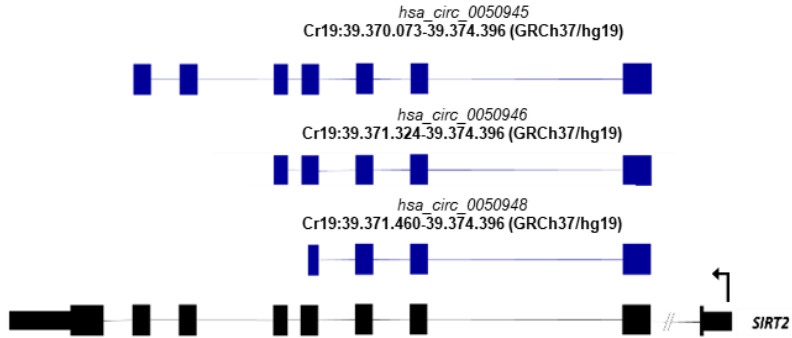
Figura 31. Niveles de expresión relativos de *circRNAs* candidatos (A) y *genes huésped* correspondientes (B) en progenitores neurales y células neurales en diferenciación libre WT y KO para MeCP2. Los gráficos representan la mediana de 3 réplicas y el rango intercuartílico (IC 95%) por condición (*p<0,005, **<0,01, test de Mann-Whitney bilateral). Se empleó *RPL13* como control endógeno.

2.2.2.1.2. Caracterización de los niveles de expresión de SIRT2 en el modelo celular neural humano *knockout* para MeCP2

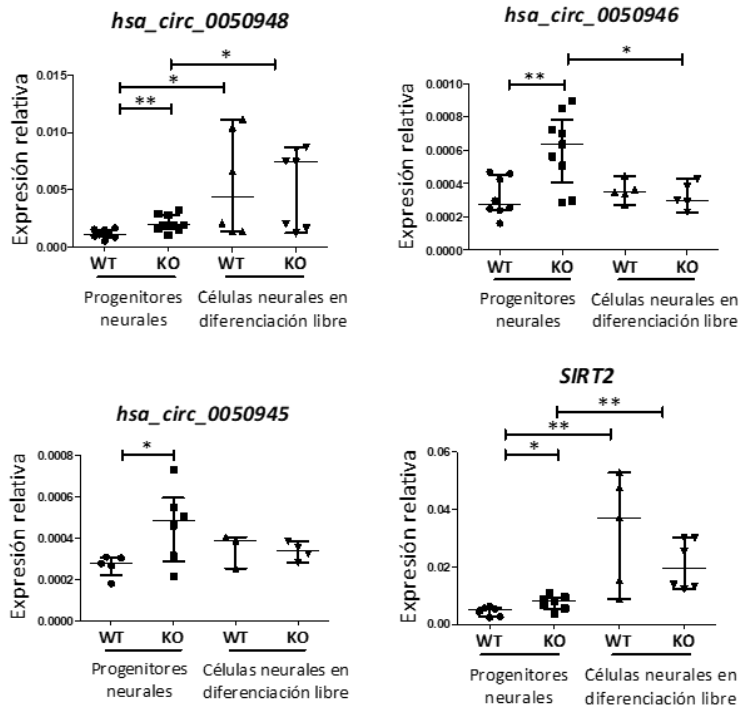
Dada la desregulación observada en muestras de córtex frontal de ratones RTT tanto en los niveles de transcrito de la forma lineal y circular como en la expresión proteica de Sirt2, se decidió llevar a cabo el mismo análisis en la línea neural humana *in vitro* generada. Para ello, se buscaron en primer lugar aquellos transcritos circulares descritos para *SIRT2* en el genoma humano mediante el uso de la herramienta *online circbase* (<http://www.circbase.org/>). Tras el diseño de cebadores específicos para cada una de las formas descritas (siete variantes en total), se pudieron detectar y analizar finalmente los niveles de expresión de tres transcritos circulares: *hsa_circ_0050945*, *hsa_circ_0050946* y *hsa_circ_0050948* (figura 32A). Los estudios por *RT-qPCR* mostraron alteraciones significativas tanto en la expresión de la forma lineal como de todos los *circRNAs* interrogados cuando se compararon líneas *WT* con el modelo *KO* para MeCP2, especialmente en su estado progenitor (figura 32B). Además, se apreciaron tendencias de cambio opuestas en los niveles de los transcritos circulares *hsa_circ_0050945* y *hsa_circ_0050946* en comparación con el gen huésped durante el proceso de diferenciación de las células *KO*, lo que sugería una regulación antagónica de la expresión. Por lo que respecta a los niveles proteicos de SIRT2, se observó un aumento notable de éstos en líneas neurales progenitoras y especialmente en células con 30 días de diferenciación libre en un contexto de deficiencia de MeCP2 (figura 32C). Dichos resultados contrarrestaban con unos valores de expresión muy similares en células diferenciadas *WT* y *KO* del ARN mensajero, advirtiéndose, del mismo modo que en el modelo animal, una posible regulación en la traducción de la proteína. En lo que a ello respecta, es importante destacar también el descenso significativo de

la acetilación de α -Tubulina en dicho modelo celular, correlacionándose muy bien con el incremento de los valores proteicos de SIRT2.

A.



B.



C.

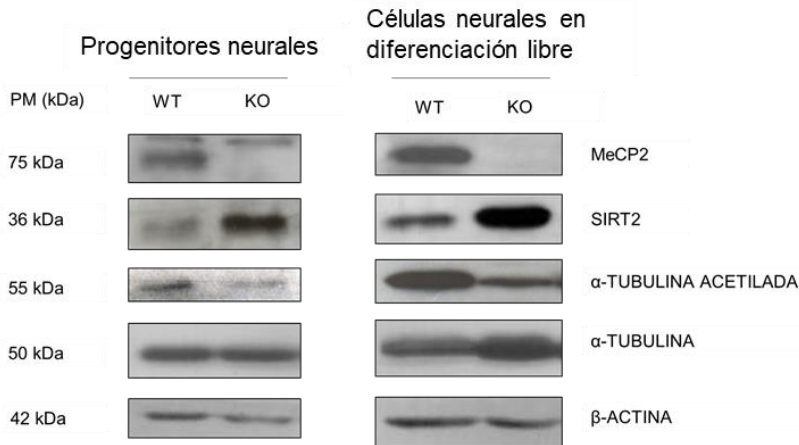


Figura 32. Caracterización de los transcritos circulares y lineal del gen *Sirt2* en progenitores neurales y células neurales en diferenciación libre WT y KO para MeCP2. A. Organización exónica/intrónica de los transcritos lineal (negro) y circulares (azul) en el locus de *Sirt2*. Las coordenadas son referentes al navegador genómico UCSC (GRCh37/hg19). B. Los niveles de expresión de los transcritos circulares y lineal de *Sirt2* fueron analizados mediante *RT-qPCR* en progenitores neurales y células en libre diferenciación durante 30 días WT y KO para MeCP2. Los gráficos representan la mediana de 6-8 réplicas y el rango intercuartílico (IC 95%) or condición (* $p < 0,005$, ** $< 0,01$, test de Mann-Whitney bilateral). Se empleó *RPL13* como control endógeno. C. Análisis por *western blot* de proteínas MeCP2, SIRT2, α-TUBULINA ACETILADA, α-TUBULINA y β-ACTINA como control endógeno de carga en progenitores neurales (izquierda) y células en diferenciación libre (derecha) WT y KO para MeCP2.

2.2.2.1.3. Estudio de localización celular de *circRNAs* en células neurales

En los estudios de expresión previos llevados a cabo en este proyecto, se observó una correlación negativa en los niveles de algunos transcritos lineales y *circRNAs* interrogados al compararse líneas neurales en estado de diferenciación con células progenitoras. Genes como *PSEN1* o *SIRT2* son ejemplos de dicha advertencia, añadiéndose además en este último caso cambios relevantes a nivel traduccional o de estabilidad proteica en condiciones KO para MeCP2. Tras

exponerse estos datos, se quiso explorar la posibilidad de que algunas de estas especies circulares pudieran ejercer un papel regulador post-transcripcional sobre su gen huésped, razón por la cual se creyó necesario determinar su localización celular específica.

Publicaciones recientes demuestran el enriquecimiento de varios ARNs circulares en sinaptoneurosomas en comparación con el resto del cerebro²⁵⁷, lo que sugiere un papel específico de estas moléculas en los procesos sinápticos. Sin embargo, todavía se carece de información en lo que se refiere al papel de los ARNs no codificantes en distintos circuitos cerebrales, subtipos neuronales, su localización en compartimentos subcelulares y su presencia en la glía. Por ello, es esencial determinar la importancia funcional que representa la ubicación de los transcritos circulares en las neuronas y, más importante, en las enfermedades neurológicas. Con el objetivo de delimitar la localización neuronal de *hsa_circ_0050946*, uno de los ARNs circulares de mayor interés resultantes del gen *SIRT2* debido a su perfil de expresión más inverso en relación al transcrito lineal, se llevó a cabo en primer lugar un proceso de hibridación fluorescente *in situ* para la visualización específica de dicho transcrito (figura 33A) en células *WT* y *KO* con 14 días de libre diferenciación. Adicionalmente, tras el fraccionamiento subcelular realizado en estas mismas células, se comprobó de nuevo la disposición diferencial de dicha variante entre núcleo y citoplasma (figura 33B).

Ambos estudios mostraron una distribución principalmente citoplásmica del transcrito *hsa_circ_0050946* en ambas condiciones *WT* y *KO*, observándose además en las imágenes resultantes de la hibridación *in situ* una localización específica en el soma neuronal. Esto sería compatible con un papel de dicho *circRNA* en la regulación traduccional de la proteína *SIRT2*, y estudios en marcha en el laboratorio abordarán esta posibilidad.

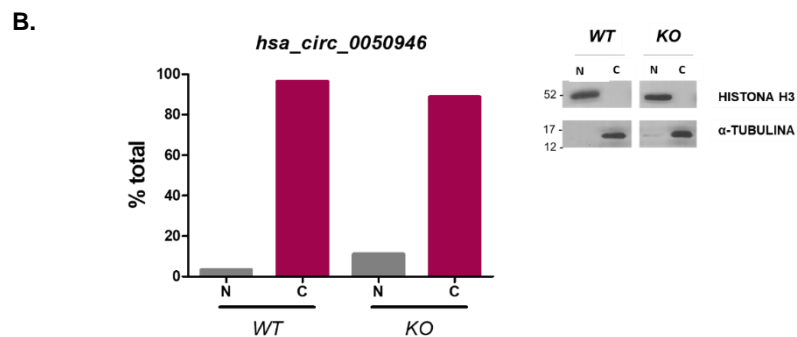
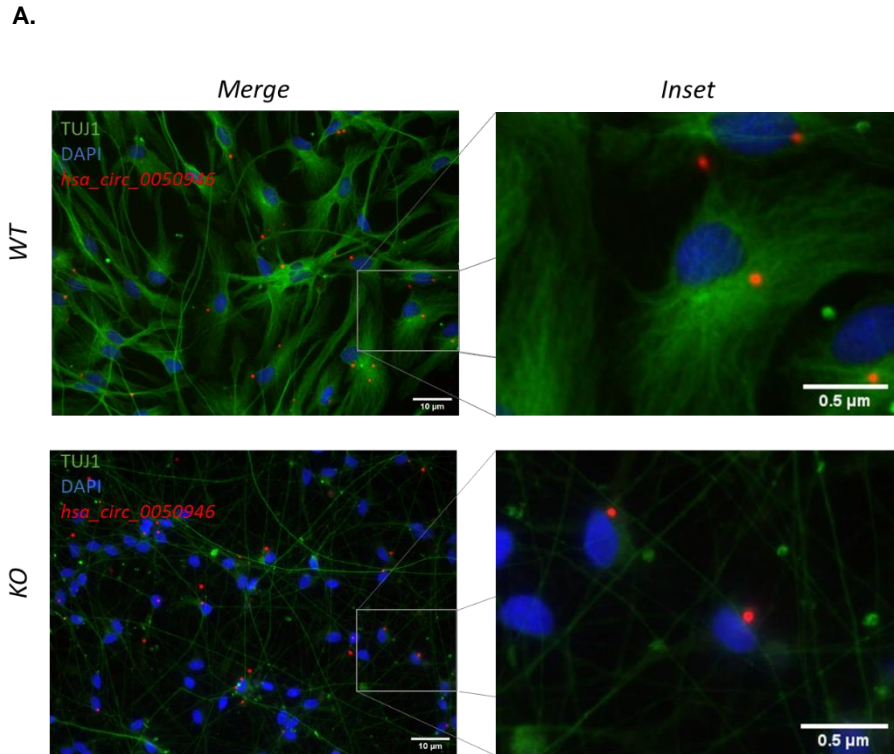


Figura 33. Localización celular de *hsa_circ_0050946* (*circSIRT2*) en células neurales. **A.** Imágenes de hibridación *in situ* fluorescente mostrando la distribución del ARN circular *hsa_circ_0050946* (*circSIRT2*) en células neurales con 14 días de maduración en condiciones *WT* (arriba) y *KO* (abajo) para MeCP2 (40X) y el encuadre (*inset*) de señalización específica a la derecha de cada condición. Las señales emitidas por las sondas del transcrito circular se muestran en color rojo, con las marcaciones del núcleo con *DAPI* en azul y la estructura neuronal con *TUJ 1* (*Neuron-specific class III beta-tubulin*) en verde. **B.** Fraccionamiento núcleo/citoplasma de células neurales con 14 días de diferenciación en condiciones *WT* y *KO* para MeCP2. Análisis por *RT-qPCR* de la expresión de *hsa_circ_0050946* (*circSIRT2*) en cada compartimento celular (izquierda) y comprobación por *western blot* de la pureza del fraccionamiento (derecha). N=Núcleo. C=Citoplasma.

3. Muestras de pacientes *post-mortem*

3.1. Estudio proteómico de muestras *post-mortem* de hipocampo de pacientes RTT

Con tal de ampliar y validar la información obtenida en los modelos animal y celular, se realizó también un estudio proteómico en muestras de cerebros de pacientes con síndrome de Rett. Para ello, se llevó a cabo un estudio comparativo entre cuatro muestras adquiridas *post-mortem* de hipocampos de pacientes RTT y cuatro muestras del mismo tejido procedentes de sujetos no afectados, tratando de delimitar un rango de edad lo más similar posible entre pacientes y controles.

Los resultados mostraron un número de proteínas cuya expresión se veía significativamente reducida en hipocampos de pacientes RTT en comparación a hipocampos sanos (figura 34A), así como también una lista de péptidos sobrerrepresentados en hipocampos afectados por la enfermedad (figura 34B). Cabe destacar que el análisis de ontologías génicas en lo que se refiere al compartimento celular mostró el enriquecimiento de proteínas con regulación decreciente en muestras RTT en regiones específicamente neuronales como áreas sinápticas y, en particular, componentes relacionados con receptores de tipo AMPA. Por otro lado, se observó una importante representación de proteínas con expresión significativamente incrementada en regiones relacionadas con el citoesqueleto, sugiriéndose un desarrollo morfológico neural aberrante en los casos RTT. De manera representativa, se decidió llevar a cabo la validación mediante *western blot* de la expresión proteica de ciertos candidatos relacionados con la estabilidad de los microtúbulos como *MAPT* (*Microtubule Associated Protein Tau*), *MAP6* (*Microtubule Associated Protein 6*) y *STMN1* (*Stathmin 1*), todos ellos con niveles incrementados en hipocampos de

pacientes RTT. En relación a la validación por *western blot* de la proteína S100B, cuya disminución fue la más destacable en el estudio proteómico, lamentablemente no se consiguió poner a punto el anticuerpo con muestras humanas. No obstante, se pudo llevar a cabo dicha comprobación en muestras de hipocampo de ratones sintomáticos, confirmándose, tal y como se mostraba en el análisis del proteoma en hipocampos humanos *post-mortem*, la reducción significativa de los niveles de dicha proteína en condiciones de ausencia de MeCP2 (figura 35).

A.

Nombre de la proteína en inglés	Nombre del gen	Acceso Uniprot	log2(Rett/Ctrl)	p-val ajustado
<i>Protein S100-B</i>	S100B	P04271	-2.70775763	0.01922416
<i>ADP-ribosylation factor-like protein 15</i>	ARL15	Q9NXU5	-1.27314675	0.01922416
<i>Leucine-rich repeat-containing protein 7</i>	LRRC7	Q96NW7	-1.210758	0.02973914
<i>Engulfment and cell motility protein 2</i>	ELMO2	Q96JJ3	-1.20179324	0.01922416
<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2</i>	RPN2	P04844	-1.2001666	0.01922416
<i>Glutamate receptor 3</i>	GRIA3	P42263	-1.15042678	0.01922416
<i>Tubulin beta-3 chain</i>	TUBB3	Q13509	-1.04225768	0.01922416
<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 11</i>	ADAM11	O75078	-1.04038073	0.04232514
<i>Catechol O-methyltransferase</i>	COMT	P21964	-0.98648784	0.02760286
<i>Gamma-aminobutyric acid receptor subunit gamma-2</i>	GABRG2	P18507	-0.96989588	0.02503716
<i>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>	MAP2K4	P45985	-0.93027271	0.01967203
<i>Hippocalcin-like protein 4</i>	HPCAL4	Q8UM19	-0.8980576	0.04802789
<i>40S ribosomal protein S13</i>	RPS13	P62277	-0.84664289	0.04923533
<i>Leucine-rich repeat-containing protein 4B</i>	LRRC4B	Q9NT99	-0.82281357	0.04232514
<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 3</i>	ARPC3	O15145	-0.81538614	0.01967203
<i>Redox-regulatory protein FAM213A</i>	FAM213A	Q9BRX8	-0.76698715	0.04232514
<i>Coiled-coil domain-containing protein 132 (Syndetin)</i>	VPS50	Q96JG6	-0.68120045	0.04867456
<i>Coronin-2B</i>	CORO2B	Q9UQ03	-0.67962661	0.03770545
<i>Exocyst complex component 2</i>	EXOC2	Q96KP1	-0.66087499	0.02760286
<i>Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A alpha isoform</i>	PPP2R1A	P30153	-0.64841821	0.02653616
<i>Serine/threonine-protein kinase DCLK2</i>	DCLK2	Q8N568	-0.64483401	0.04326695
<i>Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein</i>	SLC25A11	Q02978	-0.63013339	0.04232514
<i>Disks large-associated protein 3</i>	DLGAP3	O95886	-0.61958448	0.04923533
<i>Type I inositol 3,4-bisphosphate 4-phosphatase</i>	INPP4A	Q96PE3	-0.60846155	0.04867456
<i>Leucine-rich repeat-containing protein 59</i>	LRRC59	Q96AG4	-0.55593273	0.04232514
<i>60S acidic ribosomal protein P2</i>	RPLP2	P05387	-0.50746057	0.04802789

B.

Nombre de la proteína en inglés	Nombre del gen	Acceso Uniprot	log2(Rett/Ctrl)	p-val ajustado
<i>Proteasome subunit beta type-7</i>	PSMB7	Q99436	0.5742325	0.03222336
<i>Alpha-adducin</i>	ADD1	P35611	0.63589194	0.04232514
<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1</i>	HNRNPA2B1	P22626	0.67967187	0.02760286
<i>Nebulette</i>	NEBL	O76041	0.71944281	0.02760286
<i>DnaJ homolog subfamily B member 2</i>	DNAJB2	P25686	0.72186931	0.02653616
<i>28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein</i>	PDAP1	Q13442	0.75558493	0.04232514
<i>Nuclear migration protein nudC</i>	NUDC	Q9Y266	0.83133366	0.01967203
<i>Cysteine-rich protein 2</i>	CRIP2	P52943	0.83303251	0.02653616
<i>Secretogranin-1;PE-11;SAWK peptide;CCB peptide</i>	CHGB	P05060	0.84375762	0.04867456
<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	TPM1	P09493	0.91620672	0.04326695
<i>Transcription elongation factor A protein-like 5</i>	TCEAL5	Q5H9L2	0.92273116	0.04802789
<i>Calponin-3</i>	CNN3	Q15417	0.97524395	0.01922416
<i>Tubulin-specific chaperone A</i>	TBCA	O75347	0.99251943	0.04232514
<i>Microtubule-associated protein tau</i>	MAPT	P10636	1.01418616	0.01922416
<i>Phosphoglucomutase-2</i>	PGM2	Q96G03	1.04037252	0.02776272
<i>Alpha-synuclein</i>	SNCA	P37840	1.15634215	0.01922416
<i>Microtubule-associated protein 6</i>	MAP6	Q96JER	1.1751326	0.04867456
<i>Four and a half LIM domains protein 1</i>	FHL1	Q13642	1.33250407	0.02607105
<i>LIM and SH3 domain protein 1</i>	LASP1	Q14847	1.34995608	0.01922416
<i>EF-hand domain-containing protein D2</i>	EFHD2	Q96C19	1.36721622	0.04232514
<i>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i>	MARCKS	P29966	1.38120799	0.02973914
<i>Prothymosin alpha;Prothymosin alpha, N-terminally processed;Thymosin alpha-1</i>	PTMA	P06454	1.41269823	0.02653616
<i>Dermidin;Survival-promoting peptide;DCD-1</i>	DCD	P81605	1.52004953	0.01967203
<i>A-kinase anchor protein 12</i>	AKAP12	Q02952	1.61531664	0.02760286
<i>Stathmin</i>	STMN1	P16949	1.69234169	0.04874908

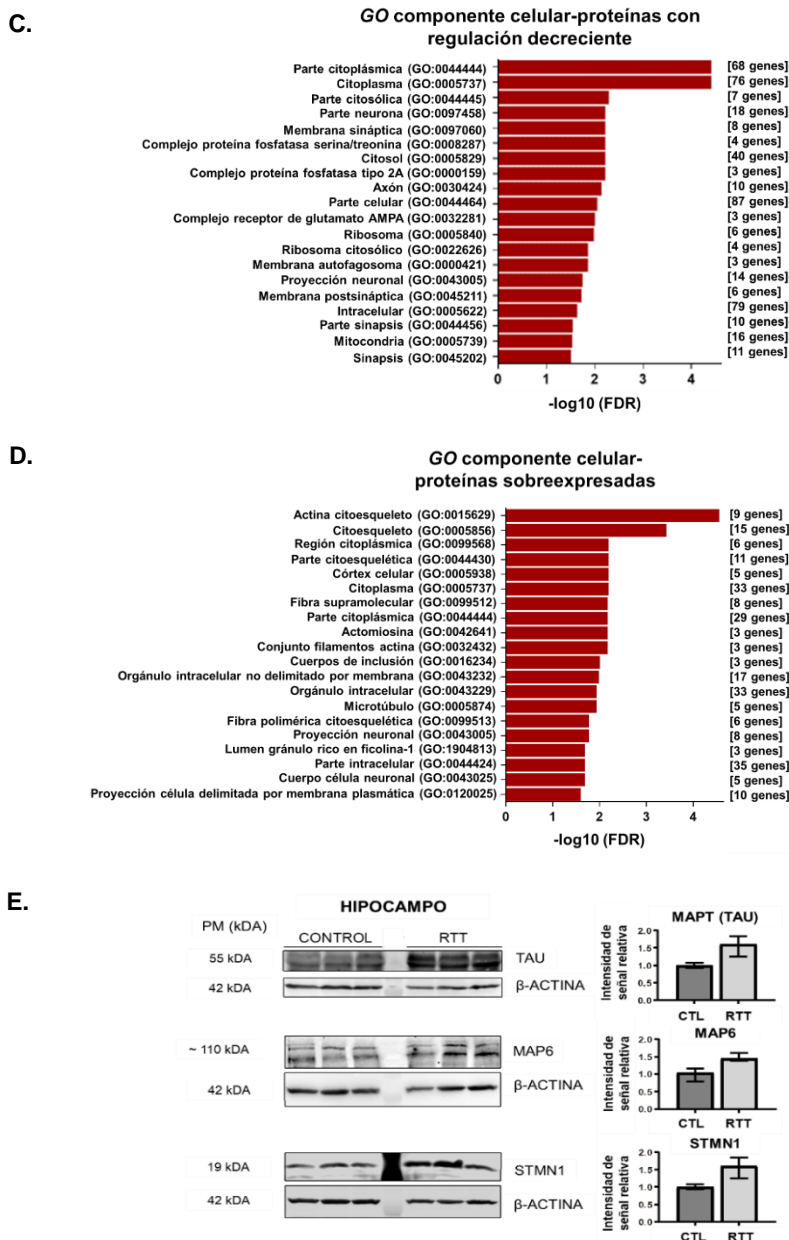


Figura 34. Caracterización proteómica en muestras *post-mortem* de hipocampo de pacientes RTT. **A.** Lista de proteínas con niveles reducidos en relación con muestras control. **B.** Lista de proteínas con niveles incrementados en relación con muestras control. **C, D.** Enriquecimiento diferencial de acuerdo con la categoría de componente celular de GO (se muestran las diez principales) de genes codificantes correspondientes a proteínas con expresión decreciente (C) o incrementada (D) en hipocampos de pacientes RTT. El eje Y muestra los términos de ontología génica y el eje X muestra la significancia estadística. **E.** Izquierda: Análisis por *western blot* de las proteínas TAU, MAP6, STMN1 y β-ACTINA como control de carga endógeno en muestras *post-mortem* de hipocampos control y de pacientes RTT. La imagen muestra tres réplicas de cada condición. Derecha: Medida cuantitativa correspondiente a los niveles proteicos de dichas proteínas.

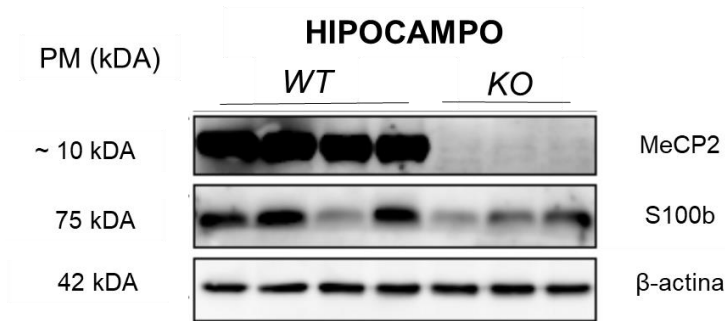


Figura 35. Validación de los niveles de expresión de la proteína S100b en muestras de hipocampo de ratones WT y KO para MeCP2. Análisis por *western blot* de las proteínas MeCP2, S100b, y β -actina como control de carga endógeno en hipocampos de ratones sintomáticos WT y KO para MeCP2.

3.2. Análisis de alteraciones en la expresión y edición del ARN de *GRIA3* en muestras cerebrales *post-mortem* de pacientes RTT

A la vista de los resultados obtenidos en el análisis proteómico, y habiéndose detectado *GRIA3* como una de las proteínas significativamente reducidas en las muestras RTT, procedimos a estudiar la expresión de *GRIA3* y los *T-UCRs uc.478/479* en los hipocampos de pacientes del mismo modo que hemos mostrado en los modelos murino y humano. Por otro lado, también se llevó a cabo dicho análisis en muestras correspondientes al área del cerebelo y en ambos casos se procedió también al estudio de los niveles de edición en la zona R/G, así como de expresión proteica de *GRIA3*.

Por lo que respecta a las muestras de hipocampo, a partir de los resultados obtenidos se advirtieron cambios en la expresión de las isoformas *flip* y *flop* de *GRIA3* (figura 36B), observándose un incremento de los niveles de ambos transcritos en muestras RTT, especialmente de la variable *flip*. Sin embargo, los niveles de transcrito total del gen no exhibían ninguna diferencia entre ambas condiciones.

En referencia a los ARNs ultraconservados *uc.478* y *uc.479* (figura 36C), y de la misma forma que las variables *flip* y *flop*, también se mostraron variaciones incrementales significativas, en este caso principalmente en el *T-UCR uc.478*, bajo un contexto de ausencia de MeCP2. De forma destacable, se mostró un aumento importante en los valores de edición total del ARN de *GRIA3* en la posición R/G en pacientes RTT (de 52% a 90,4%), además de alteraciones también en el balance de transcripción de las variantes *flip/flop* tal y como se había observado en muestras de hipocampo del modelo murino (figura 36D). Es relevante remarcar que, pese a tratarse normalmente del exón minoritario, el aumento en la selección del exón “flop” en las muestras procedentes de pacientes RTT se asoció significativamente con el incremento observado en los niveles de edición del gen. Por otro lado, el análisis por *western blot* en estas mismas muestras de la expresión la enzima ADAR2, encargada principal del mecanismo de edición del ARN, no mostraba cambios notables (figura 36E), sugiriendo por tanto que las variaciones observadas en los niveles de edición no parecen ser causa de alteraciones en dicha enzima. En lo referente a los niveles proteicos de la subunidad *GRIA3*, éstos se encontraron significativamente reducidos en hipocampos de pacientes (figura 36E), contrarrestando con los valores de expresión inalterados del ARN mensajero, advirtiéndose una regulación de dicha proteína posiblemente de manera post-transcripcional.

En el caso de aquellas muestras obtenidas del cerebelo no se apreciaron, en general, alteraciones remarcables (figura 37).

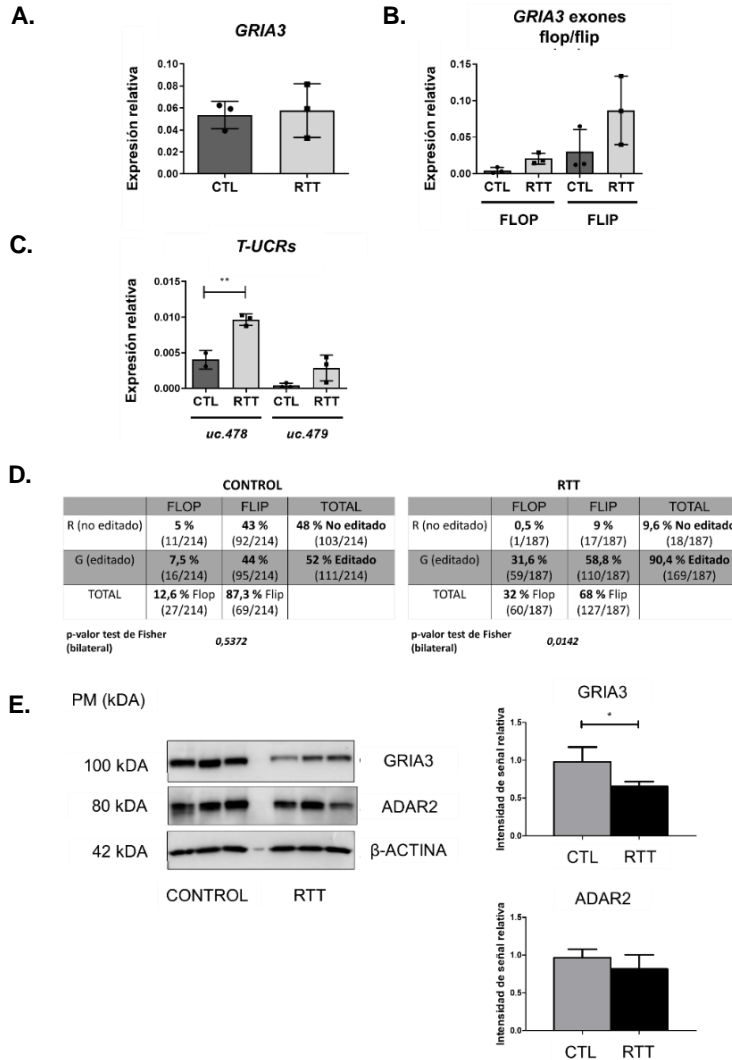


Figura 36. Caracterización de los niveles de expresión de *GRIA3* y *T-UCRs uc.478/479* y cuantificación de la edición del ARN de *GRIA3* en muestras *post-mortem* de hipocampos de pacientes RTT. A. Niveles de expresión relativos de *GRIA3* total. **B.** Niveles de expresión relativos de transcritos alternativos *flip* y *flop*. **C.** Niveles de expresión relativos de *T-UCRs uc.478/479*. Los niveles de expresión fueron analizados por *RT-qPCR* en muestras control y correspondientes a pacientes RTT. Los gráficos representan la media de tres réplicas con la desviación estándar por condición (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, test bilateral de Mann-Whitney). Se empleó *RPL13* como control endógeno. **D.** Niveles de edición de los transcritos *flip* y *flop*. Los datos se obtuvieron por secuenciación con el uso de cebadores complementarios a los exones constitutivos contiguos a los alternativos “flip” y “flop”. En cada una de las secuencias se pudo determinar qué exón se había incluido en el *splicing* y si la posición R/G se encontraba editada. Los datos corresponden a la media de tres réplicas por condición en las que se analizaron un mínimo de 60 secuencias (test bilateral exacto de Fisher). **E.** Izquierda: Análisis por *western blot* de las proteínas *GRIA3*, *ADAR2* y β -ACTINA como control de carga endógeno. La imagen muestra triplicados de cada condición. Derecha: Medida cuantitativa correspondiente a los niveles proteicos de *GRIA3* y *ADAR2* observados en muestras control (CTL) y muestras correspondientes a pacientes RTT.

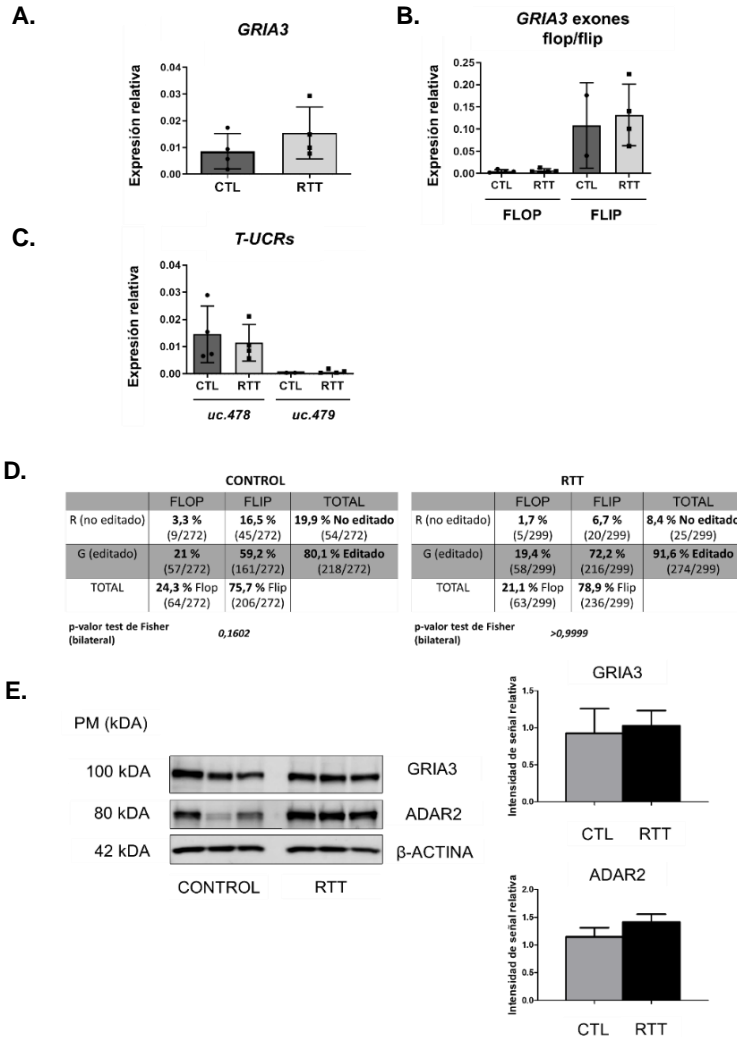


Figura 37. Caracterización de los niveles de expresión de *GRIA3* y *T-UCRs uc.478/479* y cuantificación de la edición del ARN de *GRIA3* en muestras *post-mortem* de cerebelos de pacientes RTT. **A. Niveles de expresión relativos de *GRIA3* total. **B.** Niveles de expresión relativos de transcritos alternativos *flip* y *flop*. **C.** Niveles de expresión relativos de *T-UCRs uc.478/479*. Los niveles de expresión fueron analizados por *RT-qPCR* en muestras control y correspondientes a pacientes RTT. Los gráficos representan la media de tres réplicas con la desviación estándar por condición (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, test bilateral de Mann-Whitney). Se empleó *RPL13* como control endógeno. **D.** Niveles de edición de los transcritos *flip* y *flop*. Los datos se obtuvieron por secuenciación con el uso de cebadores complementarios a los exones constitutivos contiguos a los alternativos “flip” y “flop”. En cada una de las secuencias se pudo determinar qué exón se había incluido en el *splicing* y si la posición R/G se encontraba editada. Los datos corresponden a la media de tres réplicas por condición en las que se analizaron un mínimo de 60 secuencias (test bilateral exacto de Fisher). **E.** Izquierda: Análisis por *western blot* de las proteínas *GRIA3*, *ADAR2* y β -ACTINA como control de carga endógeno. La imagen muestra triplicados de cada condición. Derecha: Medida cuantitativa correspondiente a los niveles proteicos de *GRIA3* y *ADAR2* observados en muestras control (CTL) y muestras correspondientes a pacientes RTT**

3.2.1. Análisis de metilación en exones “flip” y “flop” en muestras *post-mortem* de hipocampo de pacientes RTT

Del mismo modo que en líneas celulares neurales, se llevó a cabo también el análisis de los niveles de metilación en posiciones CpG localizadas en zonas cercanas a los exones “flip” y “flop” del gen *GRIA3*. En este caso, se interrogaron un total de trece posiciones en el exón “flip” (figura 38A) y doce en la región “flop” (figura 38B), comparando los niveles de metilación muestras *post-mortem* de hipocampo de pacientes RTT con muestras control.

De un modo similar a los datos obtenidos en líneas celulares, los resultados del análisis de metilación en muestras *post-mortem* mostraron también altos niveles de metilación en las posiciones interrogadas del exón “flop”, sin exponer cambios relevantes en dichos valores en la comparación entre pacientes y controles (figura 38B). Por otro lado, en lo que respecta al exón “flip”, se volvieron a observar niveles de metilación más bajos en los extremos del exón (CpGs 8, 9 y 13 en muestras *post-mortem*; CpGs 2, 3 y 7 en líneas neurales) y se destaca la disminución específica de dicha modificación en las CpGs 7 y 8 de muestras RTT (figura 38A)

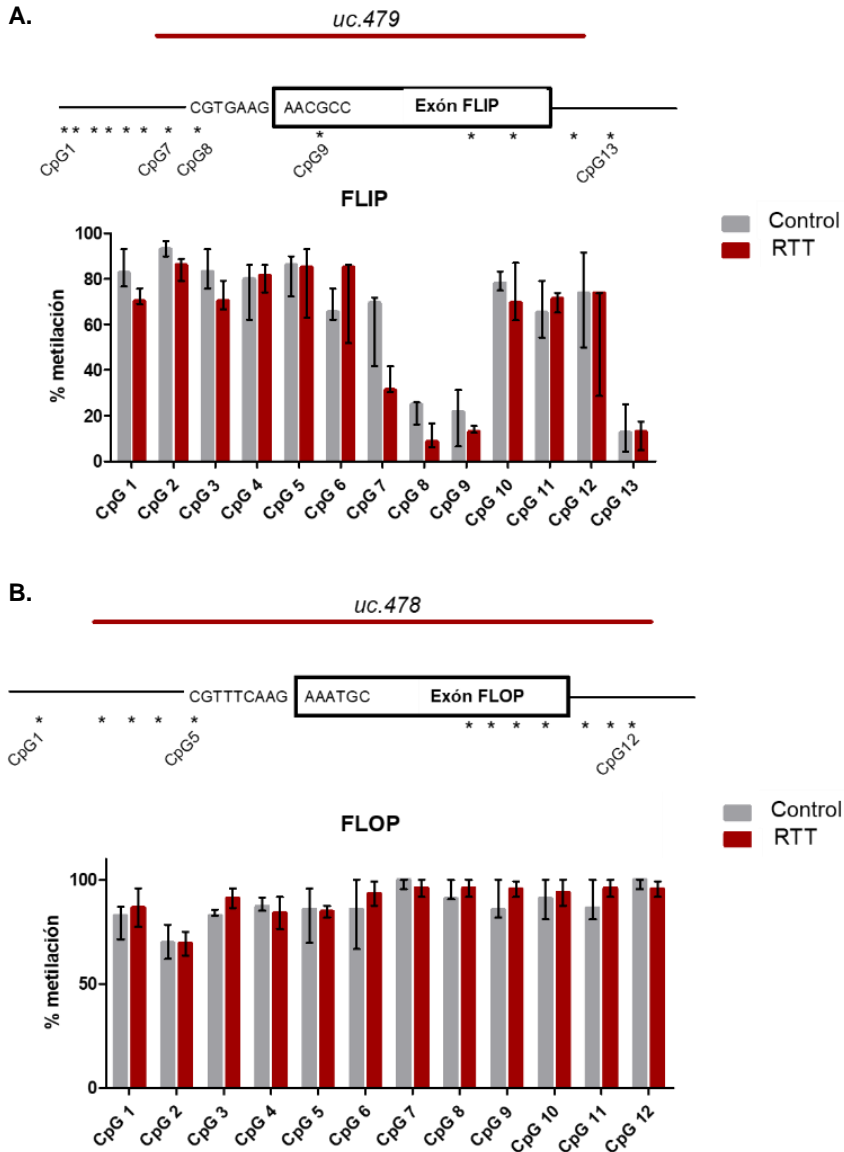


Figura 38. Análisis de metilación en exones “flip” (A) y “flop” (B) del gen *GRIA3* en muestras *post-mortem* de hipocampo de pacientes RTT. Los gráficos representan la mediana de tres réplicas con el rango intercuartílico (IC 95%) por condición (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, test bilateral de Mann-Whitney). Los valores de metilación para cada posición CpG se muestran en %.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La envergadura funcional de la proteína MeCP2 para el correcto desarrollo y competencia neuronal es un hecho indiscutible, dado que alteraciones en la dosis de dicho producto proteico en el sistema nervioso central son causa de afectaciones de extrema severidad como es el caso del Síndrome de Rett. No obstante, pese a ser objeto de estudio intensivo, las dianas directas de MeCP2 son todavía imprecisas. Considerado principalmente como represor transcripcional, varias evidencias indican que MeCP2 también participa en procesos tales como la activación transcripcional, la remodelación de la cromatina y el *splicing* de ARN. Así, además de unir ADN metilado y una plétora de proteínas, MeCP2 también puede interactuar con ARN. Además, análisis transcripcionales recientes demuestran la desregulación significativa del transcriptoma no codificante en el Síndrome de Rett, hecho que ha causado la ampliación de las áreas de interés en el campo y ha incrementado el número de estudios que abordan el impacto directo de la función de MeCP2 en la población de ARN en el cerebro normal o alterado.

En el presente proyecto, el objetivo principal se ha basado en la exploración del papel que desempeñan las regiones transcritas ultraconservadas (*T-UCRs*) y los ARNs circulares (*circRNAs*), dos tipos de transcritos no codificantes que no habían sido examinados previamente en la enfermedad de RTT, en vías moleculares clave comúnmente alteradas en dicha afectación. Asimismo, las desregulaciones observadas en los candidatos estudiados y especialmente su potencial implicación en rutas notablemente afectadas en la enfermedad como la transmisión sináptica excitatoria glutamatérgica o la dinámica del citoesqueleto, los convierte en posibles protagonistas para el abordaje de nuevas estrategias terapéuticas

dirigidas a la modificación de dichas vías y/o el uso de dichos transcritos como biomarcadores de la patología, pudiendo extenderse dicha información a tumores cerebrales u otras enfermedades del espectro autista.

1. Las poblaciones de *T-UCRs* y *circRNAs* presentan niveles de expresión alterados en los modelos murino y humano *in vitro* del Síndrome de Rett

Tanto los transcritos circulares como los resultantes de regiones genómicas ultraconservadas muestran un patrón de expresión específico de tejido y son, por lo general, especialmente abundantes en el cerebro. A pesar de ello, se ignoran todavía sus funciones e influencia en distintas patologías, incluidas entre ellas las afectaciones neurológicas, generándose por tanto la necesidad de una investigación más exhaustiva del papel de dichas especies en la fisiopatología de enfermedades severas como es el Síndrome de Rett.

Tras el análisis a gran escala de alteraciones en los niveles transcripcionales de las poblaciones de *T-UCRs* y *circRNAs* mediante el uso de chips de expresión, se pudo comprobar la desregulación de un importante número de dichas especies en hipocampo y córtex frontal, tejidos cerebrales notablemente afectados, procedentes del modelo murino RTT del que se disponía en nuestro grupo, así como en líneas neurales humanas *in vitro* con supresión de MeCP2 generadas en el laboratorio. Cabe decir que la decisión del uso de chips de expresión como método de análisis frente a otras herramientas como la secuenciación completa del transcriptoma (*RNA-seq*) fue debido a la sensibilidad que dicha metodología aporta al estudio concreto de las especies interrogadas en el presente proyecto. La baja abundancia generalizada que presentan transcritos como los *circRNAs* y *T-UCRs*

en relación a los niveles de ARNs mensajeros dificulta la cuantificación precisa de una parte significativa de dichas especies cuando el análisis de expresión diferencial se aborda mediante el uso de *RNA-seq*. No obstante, la fiabilidad de los chips de expresión no se ve tan comprometida por los niveles inferiores de transcrito. Además, en aquellos *arrays* en los que se interroga la población de *circRNAs*, se llevan a cabo protocolos previos de enriquecimiento de dichas especies como el uso de sondas específicas contra la unión de los extremos 5' y 3' en la circularización o la eliminación enzimática del ARN lineal de las muestras procesadas. Del mismo modo, los chips de expresión diseñados para la detección de *T-UCRs* permiten una mayor focalización de estas especies mediante el uso de múltiples sondas para cada una de ellas, permitiendo también una mayor precisión en la cuantificación de su expresión.

Una vez seleccionados los candidatos potencialmente más relevantes en función de los mecanismos y rutas moleculares en los que pueden verse implicados, éstos fueron validados mediante técnicas de *RT-PCR* cuantitativa, a partir de las cuales se observaron también diferencias significativas en la expresión de genes codificantes (genes huésped), muchos de ellos implicados en vías asociadas con el neurodesarrollo, directamente relacionados con los ARNs no codificantes interrogados. Dichas observaciones se exponen especialmente en los análisis llevados a cabo para especies circulares. Estudios previos ya demostraban, de hecho, que una gran proporción de *circRNAs* con expresión en células neurales son originados a partir de genes con implicación en funciones sinápticas¹⁸⁹. Por otro lado, cabe destacar que las alteraciones observadas en los niveles de varios de los genes lineales analizados sugiere, del mismo modo que se había descrito anteriormente¹⁸³, un proceso co-transcripcional de especies circulares y sus genes huésped, generándose una competición mutua por el uso

de la maquinaria de *splicing* y comprometiéndose así la expresión de ambos transcritos de manera simultánea. En lo que a ello se refiere, los resultados expuestos muestran una correlación generalmente positiva entre los niveles de los transcritos circulares interrogados y sus correspondientes genes lineales, indicando una probable desregulación de la transcripción global del locus analizado que repercutiría en ambas especies por igual. No obstante, *KDM1A* (figura 31) o *SIRT2* (figura 32) son ejemplos de correlación inversa entre ambas especies circular y lineal en líneas neurales humanas, sugiriéndose dos posibles casos interesantes de expresión antagónica.

Tras la presentación de estos datos preliminares, resulta imprescindible la realización de futuros ensayos funcionales en estos mismos modelos de estudio para determinar con exactitud el mecanismo de acción de estos transcritos todavía desconocidos. Esto se hace especialmente evidente en el caso de los *T-UCRs*, ya que, pese a la existencia de numerosas evidencias de su importancia en condiciones normales y patológicas (principalmente en cáncer), solo se han podido aportar ciertos detalles moleculares de una mínima proporción de esta población²⁶⁴. En conclusión, se han podido identificar determinadas especies del tipo ARN circular y transcritos ultraconservados exponiéndose, por primera vez, su implicación en vías notablemente alteradas en el Síndrome de Rett (vías de señalización sináptica, de procesamiento del ARN, así como de formación y soporte del citoesqueleto).

Finalmente, aunque no menos importante, en apartados previos se han descrito distintos ejemplos de microARNs especialmente relevantes en la enfermedad de Rett por su relación directa o indirecta con MeCP2, entre ellos *miR-30a*, *miR-381* y *miR-495*. Por otro lado, en diversos estudios se ha demostrado también la función que pueden ejercer las especies circulares como esponjas de *miRNAs*, pudiendo regular por

tanto su papel en distintas vías moleculares. De hecho, datos procedentes de los chips de expresión llevados a cabo en el presente proyecto nos informan de microARNs con potenciales sitios de unión para cada uno de los *circRNAs* diferencialmente expresados en muestras con ausencia de MeCP2. Lamentablemente, no se ha contado con el tiempo suficiente en el desarrollo de la presente tesis para el estudio minucioso de estas interacciones y sus posibles implicaciones en rutas alteradas en la patología. Sin embargo, el análisis general de la información obtenida a partir de los chips de expresión nos permite hacer ciertas conjeturas en relación a la relevancia que podrían tener estos microARNs y su asociación con los *circRNAs* desregulados. De hecho, podemos destacar como principal ejemplo de interés el ARN circular originado a partir del gen *EZH2* (*hsa_circRNA_104517*), seleccionado como uno de los putativos candidatos para el análisis exhaustivo de su implicación en la fisiopatología de la enfermedad. Dicho *circRNA* cuenta con potenciales sitios de unión para los transcritos *miR-30a* y *miR-495*, cuyos niveles se han visto anormalmente incrementados en cerebelos de ratones *KO* para MeCP2¹³⁵ y los cuales ejercen su función sobre el gen *BDNF*, con relevancia ampliamente demostrada en el Síndrome de Rett. Dichas observaciones estarían en consonancia con las alteraciones en la expresión de *circEZH2* en progenitores neurales y células libremente diferenciadas (figura 31A), en las que se muestra una disminución significativa de dicha especie bajo condiciones de supresión de MeCP2, resultando en la posibilidad de una mayor disponibilidad en la célula de *miR-30a* y *miR-495*. Otros ejemplos como *miR-184*, *miR-199a*, *miR-132* y *miR-134* también aparecen como posibles interactores de especies circulares con expresión alterada. De manera interesante, *miR-134*, con función relevante en el desarrollo neural y cuya regulación se ha visto influenciada por MeCP2, presenta putativos sitios de unión con *circRNAs* con expresión incrementada durante la diferenciación neural

de células *KO* para MeCP2. No obstante, no se observan especies circulares con niveles disminuidos durante ese mismo proceso que dispongan de sitios de unión para dicho *miRNA*. Esto podría indicar una menor disponibilidad de *miR-134* y la posible “desrepresión” final y la alteración de genes diana como *LIMK1*²⁶⁵, regulador del citoesqueleto con función en el desarrollo del axón, o *PUM2*²⁶⁶, involucrado en la morfogénesis dendrítica y la función sináptica. Los ejemplos expuestos ponen de manifiesto, en definitiva, el valor del estudio de las implicaciones no solo de la regulación co-transcripcional de *circRNAs* sobre sus propios genes huésped, sino también la ejercida sobre otras especies no codificantes como los microARNs, pudiendo ser causa de la desregulación de diversas vías de señalización esenciales en el desarrollo de la enfermedad de Rett.

2. Integración de distintos modelos de la enfermedad de Rett para el establecimiento de rutas alteradas comunes

En el proceso de investigación de las alteraciones moleculares y fenotípicas características de las distintas patologías, así como el diseño de potenciales tratamientos para cada una de ellas, se hace imprescindible disponer de diversos modelos para cada afectación en los que se reproduzcan los resultados observados y, por tanto, se refuercen las conclusiones obtenidas en el análisis. Por ello, en la presente tesis se exponen distintas aproximaciones para el estudio de rutas moleculares comúnmente alteradas en la enfermedad de RTT mediante el uso de tres herramientas distintas, siempre teniendo en cuenta las ventajas y las limitaciones y que presentan cada uno de los modelos descritos.

Los modelos murinos representan una de las herramientas más utilizadas en la investigación biomédica. Su proximidad a la especie humana debido a la gran similitud de sus genomas, compartiendo hasta un 95% de los genes codificantes para proteína, convierte a este modelo animal en una gran aplicación para mimetizar en un ambiente *in vivo* muchas de las enfermedades humanas conocidas. Sin embargo, existen diversas limitaciones que se deben tener en consideración cuando se hace un análisis de las observaciones hechas en dicho modelo. Es importante ser siempre conscientes de que no se trata de un modelo humano, por lo que las diferencias entre especies no se pueden pasar por alto en las variables añadidas a cualquier experimento. De hecho, en relación al presente estudio, es muy relevante destacar que el transcriptoma no codificante y las regiones reguladoras están, por lo general, mucho menos conservadas en ratón²⁶⁷. En nuestro caso, no obstante, cabe decir que, por un lado, las especies circulares parecen estar altamente conservadas en el cerebro de los mamíferos²⁵⁷ y, por otro lado, la mayor ventaja en relación al estudio de *T-UCRs* es precisamente la ultraconservación de su secuencia, lo que permite suponer una mejor traslación de los resultados obtenidos en el modelo animal hacia las observaciones en humanos. Entre otras limitaciones en el uso de modelos murinos, como la disparidad observada en muchas ocasiones en la respuesta a fármacos y la toxicocinética o el coste que representa el adecuado mantenimiento de dichos animales²⁶⁷, es relevante destacar en el caso específico del Síndrome de Rett el uso en la gran mayoría de casos de animales de sexo masculino tratándose de una patología que afecta principalmente al sexo femenino. Como se ha mencionado también en la introducción, los modelos murinos femeninos con mutaciones en *Mecp2* presentan mayores desviaciones en los rasgos fenotípicos debido al sesgo que provoca el proceso de inactivación de uno de los cromosomas X, lo que hace que los animales macho hemizogotos

mutantes para *Mecp2* en los que la proteína se encuentra completamente suprimida sean una herramienta ventajosa para la investigación en este caso. No obstante, es necesario tener consciencia de que los modelos animales de sexo femenino en este caso serían los clínicamente más relevantes⁸⁶.

En referencia a las herramientas *in vitro*, éstas nos permiten abordar el análisis en el tipo celular y la especie concreta en la que se lleva a cabo la investigación. Además, el estudio de potenciales estrategias terapéuticas y sus mecanismos de acción se simplifican en esta clase de aproximación. Esto es especialmente relevante en patologías relacionadas con el sistema nervioso central, en las que el acceso al tejido afectado es un obstáculo importante. En nuestro caso, decidimos diseñar y generar una línea celular neural estable en la que se suprimió la proteína MeCP2 mediante técnicas de edición génica CRISPR/Cas9. Esto nos permitió afrontar las distintas indagaciones de un modo más específico, sencillo, manipulable y ético en comparación con el modelo animal. Cabe destacar también la ventaja que supone dicha aplicación en términos de coste y tiempo respecto al modelo de ratón. Sin embargo, como cualquier otro modelo también presenta desventajas específicas, entre las que se destaca la imposibilidad de poner en un contexto *in vivo* las líneas celulares manipuladas. Dicha restricción es especialmente relevante en células neurales, en las que la comunicación y transmisión molecular con otros tipos celulares son imprescindibles para el correcto desarrollo y función de la red neuronal.

Finalmente, disponer de tejidos cerebrales humanos *post-mortem* de jóvenes afectadas por la enfermedad de Rett nos permitió llevar a cabo el análisis de determinadas alteraciones moleculares bajo el contexto genético exacto de dichas pacientes. Estas muestras representan una herramienta extremadamente valiosa para abordar de manera más precisa el estudio y conocimiento de las potenciales causas de la

patología. No obstante, cabe mencionar que se trata, de nuevo, de un modelo que no dispone del ambiente *in vivo* necesario para la reproducción exacta de la afectación. Por otro lado, el hecho de tratarse de una enfermedad severa en la que la esperanza de vida de las pacientes no es alta, dificulta la disponibilidad de muestras *post-mortem* de personas sanas con edades similares que se puedan usar como control de estudio. En lo que a ello respecta, la aplicación de células pluripotentes inducidas generadas a partir de fibroblastos de pacientes Rett y la diferenciación de éstas a líneas neurales, sugiere una gran ventaja frente a otros modelos, ya que se trata de una herramienta también paciente específica y con mayor accesibilidad a muestras de afectados y controles. Sin embargo, la variabilidad en el contexto genético de dichas células o alteraciones genéticas observadas durante el proceso de reprogramación son algunos de los obstáculos observados en dicho modelo²⁶⁸.

En definitiva, el estudio de la desregulación de diversos mecanismos moleculares en la investigación biomédica, así como las posibles estrategias terapéuticas aplicables a los distintos trastornos conocidos, requiere el uso en paralelo de múltiples aproximaciones que reafirmen cada uno de los resultados obtenidos, incrementándose así de manera significativa la robustez en las conclusiones. En lo que a ello se refiere, en la presente tesis se demuestran alteraciones en rutas moleculares comúnmente alteradas en el Síndrome de Rett como las implicadas en la dinámica del citoesqueleto y la transmisión sináptica glutamatérgica, poniéndose de manifiesto en los tres modelos expuestos: modelo de ratón *in vivo*, líneas humanas neurales *in vitro* y muestras *post-mortem* de pacientes, permitiéndonos confirmar de manera más firme la desregulación de dichas vías.

3. Modelos con supresión de MeCP2 muestran alteraciones en distintos niveles de expresión del gen *SIRT2*

Uno de los ejemplos en los que se ha hecho énfasis en la presente tesis es la desregulación en la expresión de las formas circulares y lineales, así como de los niveles proteicos del gen *SIRT2*, bajo un contexto de deficiencia de MeCP2 en ambos modelos murino y humano *in vitro*. Como se ha mencionado en apartados previos, *SIRT2* forma parte de la familia de enzimas sirtuinas, la función principal de las cuales es la catálisis de la desacetilación de histonas y otras dianas moleculares²⁵⁴. Aunque todas las sirtuinas se encuentran activamente expresadas en regiones cerebrales, *SIRT2* es especialmente abundante²⁶⁹ en dicho tejido y se ha descrito su implicación en vías neuronales como la diferenciación de oligodendrocitos²⁷⁰, la motilidad neuronal²⁷¹ o la neuroinflamación²⁷².

Investigaciones previas habían mostrado ya antes un incremento significativo de los niveles proteicos de HDAC6, con función desacetilasa de α -tubulina igual que *SIRT2*, en neuronas y astrocitos deficientes para MeCP2²⁵⁶. Los autores confirmaban también en las mismas muestras la disminución de la acetilación de α -tubulina, sugiriendo finalmente una posible modulación post-transcripcional de los niveles de HDAC6 por parte de MeCP2, repercutiendo así en los niveles de α -tubulina acetilada y dando respuesta a la posible causa de la inestabilidad en los microtúbulos observada en otros modelos RTT. En lo que a ello respecta, estudios llevados a cabo en cultivos primarios de fibroblastos procedentes de pacientes RTT reafirmaban el deterioro de la red de microtúbulos en dichas líneas en comparación con los controles²⁷³. También en astrocitos deficientes para MeCP2 se observaba una inestabilidad de la dinámica de dichas estructuras citoesqueleticas que se asociaba, además, con una reducción en la

expresión de STMN2²⁷⁴, cuya función está relacionada con el ensamblaje y la dinámica de los microtúbulos, así como con el desarrollo neuronal. Reforzando dichas alteraciones demostradas experimentalmente, análisis bioinformáticos llevados cabo sobre genes comúnmente desregulados en distintas muestras con deficiencia de MeCP2 también indicaban la representación de éstos en mecanismos directamente relacionados con la formación y función del citoesqueleto²⁷⁵.

Curiosamente, en otro trabajo publicado en referencia a la asociación entre la deficiencia de MeCP2 y la reducción de los niveles de α -tubulina acetilada, se mostraban cambios significativos en HDAC6 pero no se observaban variaciones en la expresión específica de SIRT2, sugiriéndose por tanto que la sobreexpresión de HDAC6 y no de SIRT2 era responsable de la mayor desacetilación de α -tubulina en los modelos RTT expuestos²⁵⁵. Dichos resultados discrepan, sin embargo, con los datos observados en los análisis de la presente tesis, los cuales muestran un aumento significativo de la dosis proteica de SIRT2 tanto en córtex frontal del modelo animal (figura 25) como en el modelo neural humano generado (figura 32). Esto plantea, de la misma manera que se ha manifestado en otras patologías neurológicas como las enfermedades de Huntington o de Parkinson^{276,277}, un papel potencialmente nocivo de dicha proteína en el desarrollo de la enfermedad de RTT. También en ambos modelos se observó una importante disminución de la acetilación de α -tubulina, dando soporte a otras evidencias de alteraciones en el citoesqueleto de líneas celulares con dosis anómalas de MeCP2. Finalmente, en el análisis proteómico llevado a cabo en muestras de hipocampos *post-mortem* de pacientes afectadas por la enfermedad de RTT se exponen, en consonancia con la información previa aportada, cambios relevantes en los niveles de proteínas esenciales para el correcto desarrollo del citoesqueleto,

especialmente de la red de microtúbulos, como MAPT, MAP6 o STMN1, confirmándose una vez más la desregulación de mecanismos críticos para la estructura celular neural en casos de ausencia de MeCP2.

Por otro lado y con especial interés, las alteraciones mostradas en la expresión de especies circulares del gen *SIRT2* en muestras de córtex frontal del modelo animal y en líneas neurales humanas, siendo los cambios del transcrito lineal poco destacables y las diferencias proteicas notablemente significativas, nos permiten plantear un sistema regulador post-transcripcional de la expresión de *SIRT2* en el que puedan verse involucradas dichas formas circularizadas del propio gen, afectando así en última instancia a funciones celulares esenciales en las que *SIRT2* juega un papel crítico. Un ejemplo de regulación post-transcripcional ejercida sobre su propio gen huésped es el descrito para *circMbl*. En este caso, se trata de un mecanismo de control de los niveles de la proteína MBNL1 (*Muscleblind Like Splicing Regulator 1*), proteína de unión a ARN con función reguladora del *splicing* y cuyos niveles alterados han sido asociados a modificaciones severas de funciones cerebrales²⁷⁸. Cuando las dosis de dicho producto se encuentran en exceso, éste es capaz de reducir la transcripción de su propio ARN mensajero promoviendo la producción del transcrito circular *circMbl*, el cual se une y actúa como esponja de la propia proteína MBNL1¹⁸³. Por otro lado, el transcrito *circPABPN1* también tiene función reguladora la traducción de su propio gen huésped, PABPN1, impidiendo la unión de HuR, proteína reguladora de los patrones de expresión proteicos, al ARN mensajero de *PABPN1*²⁷⁹, gen asociado a afectaciones severas como la distrofia muscular. En relación con este último ejemplo, es importante hacer énfasis en la dinámica temporal observada en los resultados obtenidos para la expresión de *SIRT2*. Como se aprecia tanto en muestras de córtex frontal de ratón como en líneas neurales humanas, los cambios más relevantes en los niveles de

los transcritos circulares de *SIRT2* se destacan en etapas tempranas del desarrollo (muestras de ratones pre-sintomáticos y progenitores neurales). Sin embargo, el incremento más notable de la dosis proteica de *SIRT2* se muestra en animales ya sintomáticos y en células libremente diferenciadas. Dichos datos podrían indicar una regulación indirecta por parte de las especies circulares, con alteraciones tempranas en su expresión, en la traducción en etapas futuras de sus formas lineales, posiblemente a través de la interacción con otras moléculas.

El alto enriquecimiento de especies circulares en tejidos neurales y la acumulación de dichos transcritos durante el desarrollo cerebral, probablemente debido a la no división de las células neuronales maduras, ha sido demostrado en varias publicaciones^{280,281}. Además, se ha observado que la localización de estos *circRNAs* es principalmente citoplasmática, y, más específicamente, se han expuesto evidencias de la especial abundancia de estas especies en sinaptoneurosomas en relación al cerebro completo, sugiriéndose el papel de dichas moléculas en procesos sinápticos. Ciertamente, análisis de ontologías génicas llevados a cabo en genes huésped correspondientes a ARNs circulares con expresión alterada en muestras de córtex frontal e hipocampo del modelo RTT murino mostraban el enriquecimiento de éstos en componentes celulares específicamente neurales como el axón (figura 23). De manera importante, el estudio del reactoma de estos mismos genes en muestras de hipocampo exponía también su sobrerrepresentación en categorías relacionadas con receptores glutamatérgicos de tipo AMPA, poniendo de manifiesto la relevancia de los transcritos circulares en procesos de señalización sináptica. Por otro lado, en este estudio de localización celular, se ha podido confirmar la ubicación citoplásmica de una de las formas circulares correspondientes al gen *SIRT2* con

mayor interés por su expresión inversa especialmente significativa respecto al transcrito lineal en el modelo neural humano: *hsa_circ_0050946*. En lo que a ello respecta, tanto técnicas bioquímicas de fraccionamiento como experimentos de hibridación *in situ* corroboraron este dato, proponiéndose, junto a la demostración del incremento en la dosis proteica observado en estas mismas muestras, una posible función reguladora a nivel traduccional de SIRT2 por parte de dicho *circRNA*.

Dada la importante información que puede aportar la ubicación celular de los transcritos circulares en lo que a su función respecta, es primordial llevar a cabo un estudio más exhaustivo no solo de los compartimentos subcelulares en los que se encuentran dichas moléculas, sino también de los mecanismos que permiten su localización específica, así como determinar la relación con sus propios genes huésped mediante ensayos de co-localización. En relación al Síndrome de Rett y otros trastornos neurológicos, el establecimiento de la distribución de los ARNs circulares, así como si existen cambios significativos de esta localización en condiciones fisiopatológicas, es primordial debido a la relevancia que tiene la estructura celular y la especificidad de sus compartimentos en la funcionalidad neuronal.

Aunque las evidencias expuestas sugieren la relevancia de *SIRT2* como gen candidato, cabe destacar la importancia del estudio minucioso de los mecanismos de acción a través de todas sus formas de expresión, así como también de otros candidatos con posible implicación en el neurodesarrollo, prestando especial atención a la potencial función reguladora ejercida por las especies no codificantes, cuya información respecto a su repercusión en las alteraciones observadas es todavía escasa.

4. *GRIA3* y *T-UCRs 478/479*: candidatos potencialmente relevantes en el Síndrome de Rett

El mantenimiento del equilibrio adecuado entre sinapsis inhibitorias y excitatorias en las redes neurales es condición indispensable para la correcta función y desarrollo del sistema nervioso. Para ello, juegan un papel crucial los neurotransmisores inhibitorios y excitatorios, entre los cuales destacan principalmente el ácido γ -aminobutírico o *GABA* y el glutamato, respectivamente, así como los receptores de dichas moléculas en los distintos tipos neuronales. Este equilibrio de transmisiones en los circuitos sinápticos se ha visto notablemente alterado en varias afectaciones del espectro autista, en las que la hiperexcitabilidad neuronal parece ser un factor común²⁸². No es sorprendente, por tanto, que en estudios neurobiológicos de modelos con niveles desregulados de MeCP2 también se hayan demostrado perturbaciones importantes en la sincronización de estos sistemas de neurotransmisión²⁸³. En un trabajo publicado por nuestro propio grupo recientemente, estudios de electrofisiología llevados a cabo en cultivos neuronales primarios de ratones deficientes para MeCP2 mostraban cambios significativos en la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura tras el tratamiento de estas líneas con SB216763, inhibidor de la vía de la quinasa Gsk3b (*Glycogen synthase kinase-3B*), cuya actividad en ratones *KO* para MeCP2 se había visto incrementada de manera anómala. La reducción de la frecuencia de dichas corrientes excitatorias tras la inhibición de Gsk3b ponía de manifiesto, en concordancia con otras investigaciones, alteraciones en este tipo de neurotransmisión en ratones afectados por la enfermedad, así como la potencial capacidad de SB216763 para modificar dicha vía²⁸⁴. De manera importante, cabe decir que no se observaron, sin embargo, alteraciones notables en la neurotransmisión inhibitoria modulada por GABA en estos mismos cultivos primarios, sugiriéndose

una mayor prevalencia de las deficiencias en las rutas sinápticas excitatorias glutamatérgicas bajo condiciones de supresión de MeCP2. En lo que a ello respecta, existen controversias cuando se trata de determinar la contribución de los distintos tipos neuronales en la fisiopatología de la enfermedad de RTT. De hecho, pese a que diversos trabajos presentaban el deterioro en la señalización excitatoria como la principal condición en modelos RTT^{101,285}, la supresión condicional de MeCP2 solo en neuronas GABAérgicas de ratón reproducía también la gran parte de los rasgos observados en el modelo animal nulo para dicha proteína²¹. Frente a dicho debate, Meng *et al.* ponen de manifiesto la relevancia de ambos circuitos en la enfermedad de RTT, atribuyendo distintos fenotipos a las alteraciones en la neurotransmisión inhibitoria o excitatoria para cada caso²². Entre otros ejemplos, signos como la ansiedad o el temblor observados en modelos animales de la patología, parecen estar asociados a una mayor contribución de las alteraciones en las transmisiones excitatorias. Sin embargo, los autores concluyen que los circuitos ubicados en el cerebelo son más vulnerables a perturbaciones en el sistema inhibitorio, afectando principalmente a la coordinación motora. Por otro lado, otras características fenotípicas comunes en RTT como la ataxia o la letalidad prematura se han visto reproducidas tanto bajo supresión condicional de MeCP2 en neuronas glutamatérgicas como en células GABAérgicas, confirmando la importancia del correcto equilibrio entre ambas vías de neurotransmisión para dichos síntomas.

Los datos expuestos se presentan en consonancia con las evidencias obtenidas en los análisis de enriquecimiento llevados a cabo en el presente proyecto, en los que se interrogaron los genes huésped de los transcritos no codificantes con expresión diferencial en condiciones de ausencia de MeCP2. De manera destacable, los resultados muestran categorías relacionadas con vías específicas de receptores de

glutamato, destacándose la desregulación especialmente notable de vías excitatorias no solo en lo que se refiere a los transcritos codificantes implicados, sino también a las especies no codificantes que se generan de dichos loci. Sin embargo, no se observaron rutas asociadas a la neurotransmisión inhibitoria modulada por neuronas GABAérgicas. Con mayor detalle, generaron especial interés las alteraciones observadas en los niveles de ciertas regiones ultraconservadas solapantes con el transcrito que da lugar a la subunidad 3 de receptores de glutamato de tipo AMPA (GluA3 o GRIA3) en chips de expresión, por lo que se decidió profundizar en el estudio de un posible sistema regulador que pudiera implicar a dichas especies en vías determinantes para la enfermedad de RTT. En lo que a ello respecta, las desregulaciones de los *T-UCRs uc.478/479* y el gen *GRIA3* en los distintos modelos presentados en este proyecto revelaron un posible papel regulador desempeñado por este tipo de ARNs no codificantes en distintos niveles críticos, incluidos mecanismos post-transcripcionales como la edición del ARN o la traducción. Por un lado, los datos obtenidos sugieren una posible correlación positiva entre la expresión del *T-UCR uc.479* y los niveles de edición en la posición R/G del transcrito *GRIA3* bajo condiciones de ausencia de MeCP2 en hipocampos del modelo murino, líneas neurales humanas y muestras *post-mortem* de hipocampos procedentes de pacientes RTT. No obstante, cabe decir que los resultados obtenidos en los análisis realizados en muestras humanas *post-mortem* revelan una mayor significancia en las diferencias específicas de los niveles del *T-UCR uc.478* y la variante *flop* en relación a las observaciones hechas en el modelo celular. Además, también se puede apreciar una relación clara entre la alteración en la expresión de *uc.478* y la inclusión del exón “flop” en el *splicing* alternativo con el aumento sustancial de los niveles de edición de dicha variante, mostrándose un incremento del 7,5% de isoformas *flop* editadas en muestras control al 31,6% en hipocampos

procedentes de pacientes RTT (figura 36D). De manera importante y en relación a estos últimos datos, un trabajo reciente centrado en el análisis molecular en este caso de la subunidad GluA2 de receptores de glutamato de tipo AMPA, ya indicaba, reforzando así las evidencias expuestas en el estudio del mecanismo de edición de *GRIA3* en hipocampos *post-mortem*, una mayor efectividad funcional y posterior repercusión en las propiedades del receptor de la edición en la posición R/G cuando ésta se da en la variante *flop* y no en el transcrito *flip*²⁸⁶.

Por otro lado, los resultados obtenidos en líneas neurales humanas libremente diferenciadas y en muestras humanas *post-mortem* demuestran alteraciones en el mecanismo de edición con tendencias totalmente opuestas entre ambos modelos. En el primer caso, se observa una desregulación negativa en los niveles de edición en un contexto de ausencia de MeCP2. No obstante, los análisis en hipocampos de pacientes RTT muestran cambios incrementales de dicho proceso. Pese a la aparente contradicción en dichos resultados, es importante destacar que cada modelo representa un contexto muy diferente respecto al otro, impidiendo la adecuada comparación de los datos obtenidos en cada uno de ellos. Sin embargo, cabe resaltar que en ambos casos se expone la desregulación del sistema de edición del gen *GRIA3* en condiciones de supresión de MeCP2.

En referencia a la dosis proteica de *GRIA3*, ésta se vio también claramente comprometida en ambos modelos humanos *in vitro* y muestras *post-mortem* de hipocampo pese al mantenimiento de los niveles del transcrito lineal, sugiriéndose alteraciones en la regulación post-transcripcional de su expresión. En conjunto, los datos obtenidos proponen que *GRIA3* y los procesos que regulan su expresión y función constituyen una importante diana de estudio para la comprensión de trastornos comúnmente observados en enfermedades del

neurodesarrollo como el desequilibrio en el sistema de transmisión sináptica inhibitoria/excitatoria.

Como se ha mencionado en la parte introductoria de este proyecto, el mecanismo de edición del ARN en las subunidades GluA2-GluA4 de los receptores excitatorios de glutamato de tipo AMPA es especialmente relevante en la determinación de las propiedades de dichos receptores. En lo que a ello se refiere, el notable aumento de los niveles de transcrito editado en la posición R/G, especialmente en la variante *flop*, de *GRIA3* en hipocampos *post-mortem* de pacientes RTT podrían indicar, del mismo modo que se había visto previamente para la subunidad GluA2, una transición más rápida del canal del receptor de un estado cerrado a un estado abierto tras la unión de glutamato a dicho receptor. Además, dado que el proceso de edición también parece acelerar la entrada del canal a un estado de desensibilización, este nivel de regulación post-transcripcional estaría afectando al control de la excitabilidad sináptica tras los estímulos correspondientes. Dicho esto y destacando las evidencias expuestas previamente por nuestro mismo grupo respecto a las perturbaciones en la red sináptica excitatoria en ratones RTT, así como los cambios significativos observados en el presente proyecto de los niveles de edición de *GRIA3* en condiciones de ausencia de MeCP2, es razonable sugerir que dicho mecanismo y su regulación son un potencial foco de interés clave en la neurobiología de la enfermedad. No obstante, todavía es necesario esclarecer el proceso molecular específico que se esconde tras estas observaciones y determinar el papel exacto que desempeñan transcritos no codificantes como los *T-UCRs uc.478* y *uc.479* en mecanismos como la edición del ARN, el *splicing* alternativo e incluso la traducción proteica.

En referencia a cuál es la implicación de MeCP2 en estos procesos y cómo se encuentra esto afectado en condiciones patológicas, se trata de cuestiones que permanecen todavía sin respuesta. Sin embargo, los estudios de metilación en posiciones CpG dispuestas en y alrededor de los exones “flip” y “flop” de *GRIA3* nos permiten desarrollar ciertas hipótesis en relación al papel que podría estar ejerciendo MeCP2 en la zona. Los datos obtenidos en este caso revelan, en primer lugar, una disminución notable de los niveles de metilación en los sitios de *splicing* 5’ y 3’ del exón “flip”, mientras que los valores de metilación en el exón “flop” se mantienen generalmente altos, indicando un posible motivo para la selección mayoritaria de la variante *flip* que se observa en los resultados de expresión y de edición de *GRIA3* en los tres modelos expuestos. Además, publicaciones previas demuestran también que en el proceso de *splicing* alternativo se favorece la inclusión de aquellos exones con altos niveles de metilación intragénica como los que se observan en la zona central del exón “flip”, en los que por otro lado se promovería la unión de complejos contenedores de MeCP2⁷⁶. Dichas observaciones se presentan en consonancia con estudios que demuestran la asociación entre la mayor interacción de MeCP2 en zonas intergénicas altamente metiladas y la reducción de la eficiencia del proceso de elongación mediada por *Pol II*, resultando en la provisión de más tiempo para la maquinaria de *splicing* para poder reconocer e incluir dichos exones en el transcrito final. Por otro lado, es importante resaltar de nuevo la correlación entre el aumento significativo de la cantidad del *T-UCR uc.478* y de la variante *flop* de *GRIA3* y el incremento en los niveles de edición en la posición R/G en muestras *post-mortem* de pacientes RTT. En lo que a ello respecta, los niveles elevados de metilación observados en dicho exón podrían sugerir, en condiciones de normalidad, la unión de MeCP2 en esa zona y la consecuente inhibición de la transcripción del *T-UCR uc.478* de alguna forma todavía no conocida.

Finalmente, en relación a los cambios en la regulación de la edición o de la cantidad proteica de *GRIA3*, en cuyo caso parece existir una relación inversa con el proceso de edición, la presencia de dichas especies ultraconservadas podría ser marcador de los niveles de ambos procesos. No obstante, será imprescindible llevar a cabo análisis específicos para determinar el modo en el que los *T-UCRs* interrogados pueden afectar de manera causal o no a los niveles de edición del transcrito de *GRIA3*.

En resumen, los datos presentados en este estudio abren la puerta a la descripción de posibles rutas moleculares y sistemas de regulación clave no explorados antes en patologías neurológicas con la involucración de especies no codificantes como los *T-UCRs* en los que enfocar la investigación, así como el diseño y desarrollo de posibles estrategias terapéuticas.

5. Perspectivas de futuro de los ARNs no codificantes en enfermedades del neurodesarrollo

A día de hoy, no existe un tratamiento eficiente y definitivo para muchas enfermedades neurológicas extremadamente severas. El caso del Síndrome de Rett no es una excepción y, pese a los numerosos estudios dirigidos al uso de tratamientos para paliar algunas manifestaciones graves de la enfermedad como las afecciones respiratorias o trastornos motores²⁸⁷ y mejorar así la calidad de vida de los pacientes, todavía queda lejos el desarrollo de una cura. Dado que la gran mayoría de casos se producen a causa de la pérdida funcional de la proteína MeCP2, varios proyectos han centrado sus esfuerzos en el restablecimiento de los niveles de dicha proteína, especialmente en modelos murinos²⁸⁸⁻²⁹¹. Entre ellos encontramos estudios realmente prometedores como el desarrollo de moléculas que permitan la

reactivación a nivel genómico del alelo de *MECP2* en el cromosoma X inactivo²⁹² o la transferencia de un constructo capaz de expresar dicho gen mediante el uso de vectores virales²⁹³. No obstante, uno de los retos en este tipo de terapias es evitar el incremento excesivo de la dosis génica de *MECP2*, causando en ese caso una toxicidad no deseada²⁹⁴.

Por otro lado, además de MeCP2 *per se*, moléculas directamente relacionadas con vías en las que éste se ve implicado y cuya alteración en condiciones patológicas ha sido demostrada, también forman parte de dianas terapéuticas en modelos RTT. Entre ellas destacan la inhibición de moléculas *HDAC* o la activación de la vía de señalización de *CREB*. Otro de los ejemplos más destacados es la manipulación de la expresión de *BDNF*, ya que la disminución significativa en sus niveles y, por tanto, su relevancia en el desarrollo de la enfermedad se ha comprobado en distintos estudios²⁹⁵. En referencia a las estrategias terapéuticas enfocadas a la mejora principalmente sintomática de la enfermedad, Gomathi *et al.* revisan en una publicación muy reciente todos los estudios farmacológicos clínicos (testados en pacientes) y no clínicos (en fase experimental en modelos animales e *in vitro*), así como sus mecanismos de acción, hasta el momento descritos para el Síndrome de Rett²⁹⁶ (figura 39). Entre las estrategias no clínicas se destacan aquellas dirigidas a la restauración de la expresión génica de *MECP2* o ensayos *in vivo* de terapia génica llevados a cabo en ratones deficientes para dicha proteína^{294,297}, aunque también hay una gran lista de opciones enfocadas a la mejora de determinados síntomas. Por otro lado, los estudios clínicos se encuentran, por el momento, dedicados a la determinación de la eficacia de tratamientos paliativos de manifestaciones severas y comunes de la enfermedad como la disfunción motora, la epilepsia o las alteraciones en la comunicación.

En ambos casos se ha testado el uso de modificadores génicos y epigenéticos como el folato²⁹⁸ o la gentamicina²⁹⁹, terapias con factores de crecimiento como *IGF-1*³⁰⁰ o moduladores de receptores NMDA^{301,302}, entre otros. Cabe destacar también la multitud de estrategias terapéuticas dirigidas a la modificación de distintos tipos de neurotransmisiones, entre los que se observan tratamientos serotoninérgicos³⁰³, dopaminérgicos³⁰⁴, adrenérgicos³⁰⁵, colinérgicos³⁰⁶ y, por supuesto, GABAérgicos³⁰⁷ y glutamatérgicos³⁰⁸.

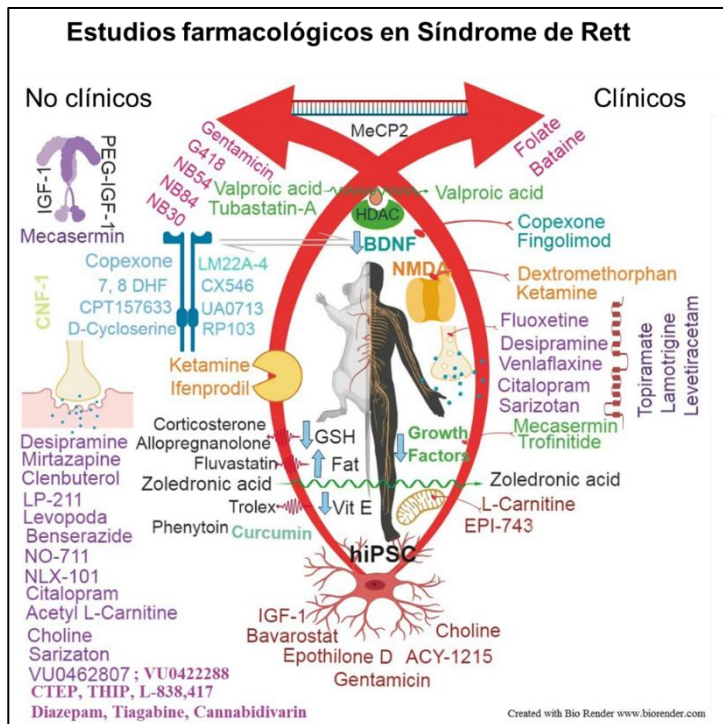


Figura 39. Estudios farmacológicos clínicos y no clínicos y sus mecanismos de acción en Síndrome de Rett. Representación de las distintas estrategias terapéuticas llevadas a cabo en modelos celulares *in vitro*, modelos animales y pacientes afectados de la enfermedad de Rett. Los códigos de colores se asocian, generalmente, a los distintos mecanismos de acción de los fármacos. En rosa, modificadores genéticos o epigenéticos de la expresión de MeCP2. En verde, inhibidores de desacetilasas de histonas y terapias de factores de crecimiento. En azul, moduladores de la expresión de BDNF. En naranja, modificadores de receptores NMDA. En violeta, moléculas moduladoras de distintas transmisiones sinápticas. En negro, modificadores de electrolitos, potenciadores metabólicos y efectores mitocondriales. En granate, distintas aproximaciones terapéuticas en células pluripotentes inducidas en Síndrome de Rett. Adaptada de Gomathi, M. *et al.*, 2020.

Como ya se ha mencionado en otros apartados, se ha demostrado que el ARN no codificante participa en múltiples funciones celulares, incluyendo la regulación génica, vías metabólicas y procesos de señalización³⁰⁹. Dada su relevancia biológica y las distintas evidencias de la alteración de dicha población en diversas patologías³¹⁰⁻³¹², su potencial valor terapéutico, así como la posibilidad de su uso como biomarcadores diagnósticos son dos aspectos en los que es importante profundizar. Sin embargo, en lo que respecta a estrategias terapéuticas en las que las distintas subpoblaciones del transcriptoma no codificante sea protagonista, éstas son muy limitadas a día de hoy. El cáncer es una de las patologías en las que este tipo de transcritos, especialmente el grupo de *miRNAs*, han sido el principal foco de interés para determinados tratamientos. La inhibición de *miRNAs* con potencial oncogénico como *miR-155* en linfomas de células T o la restauración de los niveles de *miR-34* en cáncer de pulmón o hepático son ejemplos, entre otros, de estrategias terapéuticas en fases avanzadas de ensayos clínicos³¹³. También varios *lncRNAs* significativamente asociados a fases clave de procesos tumorales como *MALAT-1*³¹⁴ o *HULC*³¹⁵ han emergido como dianas de interés para su uso como biomarcadores o para propósitos terapéuticos dirigidos a la modulación de su expresión.

En relación a trastornos neurológicos y del neurodesarrollo, el estudio y desarrollo de posibles tratamientos moleculares cuyas dianas estén centradas en ARNs no codificantes es todavía extremadamente escaso. No obstante, la demostrada implicación de ciertos *lncRNAs* en vías clave para este tipo de patologías los incluye cada vez de manera más evidente en el foco de interés. En el caso específico del Síndrome de Rett, pese a no haber sido estudiados en profundidad, se podrían sugerir importantes *lncRNAs* con gran potencial terapéutico. Uno de estos casos es el del transcrito antisentido del gen *BDNF* (*BDNF-AS*), el cual presenta actividad represiva sobre el propio ARN mensajero de

*BDNF*²¹². Las intervenciones, por tanto, dirigidas a la inhibición de dicho *lncRNA* permitirían aumentar los niveles de *BDNF*, los cuales se encuentran notablemente reducidos en la enfermedad. De manera importante, mediante el estudio masivo de *lncRNAs* circulantes en pacientes con patologías del espectro autista se han podido identificar distintos transcritos con expresión significativamente diferencial, entre los cuales se encuentra *BDNF-AS*²¹³, reforzando el potencial valor diagnóstico y terapéutico de dicho *lncRNA* en patologías como el Síndrome de Rett. De hecho, ya se ha podido demostrar el éxito de tratamientos dirigidos a la modulación de la expresión de determinados ARNs no codificantes para la mejora sintomática de algunas afectaciones con signos solapantes a los observados en RTT. Estos son los casos del Síndrome de Angelman y el Síndrome de Dravet, en los que el silenciamiento de los ARNs no codificantes antisentido de los genes *UBE3A*³¹⁶ y *SCN1A*³¹⁷, respectivamente, mostraba mejoras fenotípicas relevantes en los modelos de estudio. Dichas evidencias justifican la profundización en la investigación y desarrollo de posibles estrategias moleculares enfocadas hacia otros transcritos no codificantes cuya probable relevancia en el Síndrome de Rett ha sido expuesta en el presente proyecto, como el *lncRNA* ultraconservado *Evf2* o las especies circulares originadas a partir del gen *SIRT2*. Es importante destacar en este caso la necesidad y utilidad de modelos celulares para el diseño y desarrollo de este tipo de estrategias, especialmente en patologías relacionadas con el tejido cerebral.

Aunque por el momento no se ha explorado bien la aplicación de los *circRNAs* como biomarcadores, su estabilidad, patrones de expresión celular específicos o el hecho de que hayan podido ser identificados en varios fluidos biológicos como la sangre³¹⁸, la saliva³¹⁹ y el plasma²³⁴, sugieren una buena herramienta en el uso diagnóstico de dichas moléculas para distintas afectaciones. En el caso de las enfermedades

neurrológicas, éstos adquieren un especial interés debido a la inaccesibilidad del tejido cerebral tanto para pruebas diagnósticas como a nivel terapéutico. En lo que a ello respecta, estudios previos han demostrado que la barrera hematoencefálica se muestra significativamente comprometida en enfermedades como el Alzheimer o la Esclerosis Lateral Amiotrófica^{320,321}, favoreciéndose así la circulación de posibles ARNs circulares específicos de cerebro y su detección en tejidos periféricos. En cuanto a las posibles estrategias terapéuticas dirigidas a la modulación de transcritos circulares asociados a determinadas patologías, Lesca M. y su equipo revisan distintas aproximaciones para dicho objetivo, distinguiendo dos vertientes: la modulación (sobreexpresión, inhibición o corrección) de *circRNAs* nativos de manera endógena o la producción e incorporación de especies circulares artificiales³²². Cabe decir que algunas de estas metodologías no han sido todavía llevadas a cabo experimentalmente.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los perfiles de expresión de determinados *T-UCRs* y *circRNAs* se encuentran alterados en córtex frontal e hipocampo de ratones cuya expresión del gen *Mecp2* se encuentra deplecionada, poniéndose de manifiesto la posible relevancia de dichos transcritos no codificantes en el desarrollo de la enfermedad de Rett.
2. Todos los modelos utilizados en el presente proyecto muestran la desregulación en niveles de ARNs no codificantes derivados de genes implicados en la dinámica y función citoesquelética y la señalización sináptica glutamatérgica como rutas principales, sugiriendo el papel relevante del transcriptoma no codificante en vías comúnmente alteradas en la enfermedad de Rett y su potencial uso como dianas terapéuticas y/o biomarcadores de la patología.
3. Las diferencias en los niveles de expresión de las formas circulares y lineal de *SIRT2*, así como el aumento en los niveles proteicos, observados en el modelo murino y líneas neurales humanas con deficiencia de MeCP2, sugieren un posible papel relevante de dichas moléculas tanto en la maduración neuronal como en la fisiopatología del Síndrome de Rett.
4. Las alteraciones de la expresión de los *T-UCRs uc.478/479* en tres modelos distintos de la enfermedad, así como la posible co-regulación transcripcional de su propio gen huésped *GRIA3*, demuestran la relevancia del estudio de la regulación ejercida por *T-UCRs* en vías de señalización alteradas en un contexto de deficiencia de MeCP2.

5. Las correlaciones observadas entre los niveles de expresión de los *T-UCRs uc.478/479* y de edición de la posición R/G del ARN de *GRIA3* en humanos plantean que los cambios en los niveles de edición podrían estar regulados por dichas especies no codificantes.

6. Las variaciones en la edición del ARN de *GRIA3* en las líneas neurales humanas y en hipocampos *post-mortem* de pacientes con Síndrome de Rett podrían ser responsables de la alteración de algunas propiedades en los receptores de glutamato relevantes para la correcta función neuronal.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Rett, A. [On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood]. *Wien. Med. Wochenschr.* **116**, 723–726 (1966).
2. Rett, A. On a remarkable syndrome of cerebral atrophy associated with hyperammonaemia in childhood. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **166**, 322–324 (2016).
3. Hagberg, B., Aicardi, J., Dias, K. & Ramos, O. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann. Neurol.* **14**, 471–9 (1983).
4. Krajnc, N. Management of epilepsy in patients with rett syndrome: Perspectives and considerations. *Therapeutics and Clinical Risk Management* vol. 11 925–932 (2015).
5. Laurvick, C. L. *et al.* Rett syndrome in Australia: A review of the epidemiology. *J. Pediatr.* **148**, 347–352 (2006).
6. Amir, R. E. *et al.* Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl- CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* **23**, 185–188 (1999).
7. Neul, J. L. *et al.* Rett Syndrome: Revised Diagnostic Criteria and Nomenclature. *Annu. Neurol.* **68**, 944–950 (2010).
8. Chahrour, M. & Zoghbi, H. Y. The Story of Rett Syndrome: From Clinic to Neurobiology. *Neuron* **56**, 422–437 (2007).
9. Einspieler, C., Kerr, A. M. & Prechtl, H. F. R. Abnormal general movements in girls with Rett disorder: The first four months of life. in *Brain and Development* vol. 27 (2005).
10. Weng, S. M., Bailey, M. E. S. & Cobb, S. R. Rett syndrome: From bed to bench. *Pediatr. Neonatol.* **52**, 309–316 (2011).
11. Zappella, M. The Rett girls with preserved speech. *Brain Dev.* **14**, 98–101 (1992).
12. Rolando, S. Rett syndrome: Report of eight cases. *Brain Dev.* **7**, 290–296 (1985).
13. Hanefeld, F. The clinical pattern of the Rett syndrome. *Brain Dev.* **7**, 320–5 (1985).
14. Armstrong, D., Dunn, J. K., Antalffy, B. & Trivedi, R. Selective dendritic alterations in the cortex of rett syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **54**, 195–201 (1995).

15. Fukuda, T., Itoh, M., Ichikawa, T., Washiyama, K. & Goto, Y. I. Delayed maturation of neuronal architecture and synaptogenesis in cerebral cortex of Mecp2-deficient mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 537–544 (2005).
16. Nguyen, M. V. C. *et al.* MeCP2 is critical for maintaining mature neuronal networks and global brain anatomy during late stages of postnatal brain development and in the mature adult brain. *J. Neurosci.* **32**, 10021–10034 (2012).
17. Carter, J. C. *et al.* Selective cerebral volume reduction in Rett syndrome: A multiple-approach MR imaging study. *Am. J. Neuroradiol.* **29**, 436–441 (2008).
18. Banerjee, A. *et al.* Jointly reduced inhibition and excitation underlies circuit-wide changes in cortical processing in Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E7287–E7296 (2016).
19. Samardzic, J., Jadzic, D., Hencic, B., Jancic, J. & Strac, D. S. Introductory Chapter: GABA/Glutamate Balance: A Key for Normal Brain Functioning. in *GABA And Glutamate - New Developments In Neurotransmission Research* (InTech, 2018). doi:10.5772/intechopen.74023.
20. Jacob, T. C., Moss, S. J. & Jurd, R. GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 9 331–343 (2008).
21. Chao, H. T. *et al.* Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* **468**, 263–269 (2010).
22. Meng, X. *et al.* Manipulations of MeCP2 in glutamatergic neurons highlight their contributions to rett and other neurological disorders. *Elife* **5**, (2016).
23. Filippini, A., Bonini, D., La Via, L. & Barbon, A. The Good and the Bad of Glutamate Receptor RNA Editing. *Molecular Neurobiology* (2017) doi:10.1007/s12035-016-0201-z.
24. Sommer, B. *et al.* Flip and flop: A cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science (80-.)*. **249**, 1580–1585 (1990).
25. Lambolez, B., Ropert, N., Ferrais, D., Rossier, J. & Hestrin, S. Correlation between kinetics and RNA splicing of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors in neocortical neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1797–1802 (1996).
26. Gerber, A. P. & Keller, W. RNA editing by base deamination: More enzymes, more targets, new mysteries. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 26 376–384 (2001).

27. Bass, B. L. RNA Editing by Adenosine Deaminases That Act on RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 817–846 (2002).
28. Orlandi, C., Barbon, A. & Barlati, S. Activity regulation of adenosine deaminases acting on RNA (ADARs). *Molecular Neurobiology* vol. 45 61–75 (2012).
29. Lai, F., Chen, C. X., Carter, K. C. & Nishikura, K. Editing of glutamate receptor B subunit ion channel RNAs by four alternatively spliced DRADA2 double-stranded RNA adenosine deaminases. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2413–2424 (1997).
30. O'Connell, M. A., Gerber, A. & Keller, W. Purification of human double-stranded RNA-specific editase 1 (HRED1) involved in editing of brain glutamate receptor B pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* **272**, 473–478 (1997).
31. Higuchi, M. *et al.* Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature* **406**, 78–81 (2000).
32. Wang, Q. *et al.* Stress-induced Apoptosis Associated with Null Mutation of ADAR1 RNA Editing Deaminase Gene. *J. Biol. Chem.* **279**, 4952–4961 (2004).
33. Balik, A., Penn, A. C., Nemoda, Z. & Greger, I. H. Activity-regulated RNA editing in select neuronal subfields in hippocampus. *Nucleic Acids Res.* **41**, 1124–1134 (2013).
34. Orlandi, C. *et al.* AMPA receptor regulation at the mRNA and protein level in rat primary cortical cultures. *PLoS One* **6**, e25350 (2011).
35. La Via, L. *et al.* Modulation of dendritic AMPA receptor mRNA trafficking by RNA splicing and editing. *Nucleic Acids Res.* **41**, 617–631 (2013).
36. Kwak, S. & Kawahara, Y. Deficient RNA editing of GluR2 and neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Molecular Medicine* vol. 83 110–120 (2005).
37. Barbon, A. *et al.* Chronic phencyclidine administration reduces the expression and editing of specific glutamate receptors in rat prefrontal cortex. *Exp. Neurol.* **208**, 54–62 (2007).
38. Khermesh, K. *et al.* Reduced levels of protein recoding by A-to-I RNA editing in Alzheimer's disease. *RNA* **22**, 290–302 (2016).
39. Salpietro, V. *et al.* AMPA receptor GluA2 subunit defects are a cause of neurodevelopmental disorders. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
40. Ellison, K. A. *et al.* Examination of X chromosome markers in Rett syndrome: exclusion mapping with a novel variation on multilocus linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **50**, 278–87 (1992).
41. Schanen, C. A severely affected male born into a Rett syndrome kindred supports X- linked inheritance and allows extension of the exclusion map [1]. *American Journal of Human Genetics* vol. 63 267–269 (1998).

42. Schanen, N. C. *et al.* A new Rett syndrome family consistent with X-linked inheritance expands the X chromosome exclusion map. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 634–641 (1997).
43. Zoghbi, H. Genetic aspects of Rett syndrome. *J. Child Neurol.* **3 Suppl**, S76-8 (1988).
44. Zoghbi, H. Y., Percy, A. K., Schultz, R. J. & Fill, C. Patterns of X chromosome inactivation in the Rett syndrome. *Brain Dev.* **12**, 131–5 (1990).
45. Schönewolf-Greulich, B. *et al.* Mosaic MECP2 variants in males with classical Rett syndrome features, including stereotypical hand movements. *Clin. Genet.* **95**, 403–408 (2019).
46. Takeguchi, R. *et al.* MeCP2_e2 partially compensates for lack of MeCP2_e1: A male case of Rett syndrome. *Mol. Genet. Genomic Med.* (2019) doi:10.1002/mgg3.1088.
47. Villard, L. MECP2 mutations in males. *Journal of Medical Genetics* vol. 44 417–423 (2007).
48. Trappe, R. *et al.* MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 1093–1101 (2001).
49. Ariani, F. *et al.* FOXP1 Is Responsible for the Congenital Variant of Rett Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 89–93 (2008).
50. Tao, J. *et al.* Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 1149–1154 (2004).
51. De Bona, C. *et al.* Preserved speech variant is allelic of classic Rett syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **8**, 325–330 (2000).
52. Lucariello, M. *et al.* Whole exome sequencing of Rett syndrome-like patients reveals the mutational diversity of the clinical phenotype. *Hum. Genet.* **135**, 1343–1354 (2016).
53. Itoh, M. *et al.* Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2-e2 is dispensable for rett syndrome phenotypes but essential for embryo viability and placenta development. *J. Biol. Chem.* **287**, 13859–13867 (2012).
54. Lewis, J. D. *et al.* Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to Methylated DNA. *Cell* **69**, 905–914 (1992).
55. Nan, X., Meehan, R. R. & Bird, A. Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4886–4892 (1993).

56. Jung, B. P. *et al.* The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells. *J. Neurobiol.* **55**, 86–96 (2003).
57. Balmer, D., Goldstine, J., Rao, Y. M. & LaSalle, J. M. Elevated methyl-CpG-binding protein 2 expression is acquired during postnatal human brain development and is correlated with alternative polyadenylation. *J. Mol. Med.* **81**, 61–68 (2003).
58. Kishi, N. & Macklis, J. D. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol. Cell. Neurosci.* **27**, 306–321 (2004).
59. Krishnaraj, R., Ho, G. & Christodoulou, J. RettBASE: Rett syndrome database update. *Hum. Mutat.* **38**, 922–931 (2017).
60. Cheval, H. *et al.* Postnatal inactivation reveals enhanced requirement for MeCP2 at distinct age windows. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 3806–3814 (2012).
61. McGraw, C. M., Samaco, R. C. & Zoghbi, H. Y. Adult neural function requires MeCP2. *Science* vol. 333 186 (2011).
62. Ross, P. D. *et al.* Exclusive expression of MeCP2 in the nervous system distinguishes between brain and peripheral Rett syndrome-like phenotypes. *Hum. Mol. Genet.* ddd269 (2016) doi:10.1093/hmg/ddw269.
63. Valinluck, V. *et al.* Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* **32**, 4100–4108 (2004).
64. Mellén, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S. & Heintz, N. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* **151**, 1417–1430 (2012).
65. Sperlazza, M. J., Bilinovich, S. M., Sinanan, L. M., Javier, F. R. & Williams, D. C. Structural Basis of MeCP2 Distribution on Non-CpG Methylated and Hydroxymethylated DNA. *J. Mol. Biol.* **429**, 1581–1594 (2017).
66. Nan, X., Campoy, F. J. & Bird, A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* **88**, 471–481 (1997).
67. Kudo, S. *et al.* Heterogeneity in residual function of MeCP2 carrying missense mutations in the methyl CpG binding domain. *J. Med. Genet.* **40**, 487–493 (2003).
68. Lister, R. *et al.* Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science (80-)*. **341**, (2013).

69. Zhou, Z. *et al.* Brain-Specific Phosphorylation of MeCP2 Regulates Activity-Dependent Bdnf Transcription, Dendritic Growth, and Spine Maturation. *Neuron* **52**, 255–269 (2006).
70. Ebert, D. H. *et al.* Activity-dependent phosphorylation of MeCP2 threonine 308 regulates interaction with NCoR. *Nature* **499**, 341–345 (2013).
71. Tao, J. *et al.* Phosphorylation of MeCP2 at Serine 80 regulates its chromatin association and neurological function. *PNAS March* vol. 24 (2009).
72. Stefanelli, G. *et al.* Brain phosphorylation of MeCP2 at serine 164 is developmentally regulated and globally alters its chromatin association. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
73. Lyst, M. J. & Bird, A. Rett syndrome: A complex disorder with simple roots. *Nature Reviews Genetics* vol. 16 261–274 (2015).
74. Chahrour, M. *et al.* MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science (80-.)*. **320**, 1224–1229 (2008).
75. Young, J. I. *et al.* Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17551–17558 (2005).
76. Maunakea, A. K., Chepelev, I., Cui, K. & Zhao, K. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Res.* **23**, 1256–1269 (2013).
77. Cheng, T. L. *et al.* MeCP2 Suppresses Nuclear MicroRNA Processing and Dendritic Growth by Regulating the DGCR8/Drosha Complex. *Dev. Cell* **28**, 547–560 (2014).
78. Kinde, B., Wu, D. Y., Greenberg, M. E. & Gabel, H. W. DNA methylation in the gene body influences MeCP2-mediated gene repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 15114–15119 (2016).
79. Kokura, K. *et al.* The Ski Protein Family Is Required for MeCP2-mediated Transcriptional Repression. *J. Biol. Chem.* **276**, 34115–34121 (2001).
80. Fischle, W. *et al.* Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Mol. Cell* **9**, 45–57 (2002).
81. Lyst, M. J. *et al.* Rett syndrome mutations abolish the interaction of MeCP2 with the NCoR/SMRT co-repressor. *Nat. Neurosci.* **16**, 898–902 (2013).
82. Tillotson, R. & Bird, A. The Molecular Basis of MeCP2 Function in the Brain. *J. Mol. Biol.* (2019) doi:10.1016/j.jmb.2019.10.004.

83. Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J. E. & Bird, A. A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic rett syndrome. *Nat. Genet.* **27**, 322–326 (2001).
84. Chen, R. Z., Akbarian, S., Tudor, M. & Jaenisch, R. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat. Genet.* **27**, 327–331 (2001).
85. Pelka, G. J. *et al.* *Mecp2* deficiency is associated with learning and cognitive deficits and altered gene activity in the hippocampal region of mice. *Brain* **129**, 887–898 (2006).
86. Vashi, N. & Justice, M. J. Treating Rett syndrome: from mouse models to human therapies. *Mammalian Genome* vol. 30 90–110 (2019).
87. Fyffe, S. L. *et al.* Deletion of *Mecp2* in *Sim1*-Expressing Neurons Reveals a Critical Role for MeCP2 in Feeding Behavior, Aggression, and the Response to Stress. *Neuron* **59**, 947–958 (2008).
88. Samaco, R. C. *et al.* Loss of MeCP2 in aminergic neurons causes cell-autonomous defects in neurotransmitter synthesis and specific behavioral abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21966–21971 (2009).
89. Huang, T. W. *et al.* Progressive changes in a distributed neural circuit underlie breathing abnormalities in mice lacking MeCP2. *J. Neurosci.* **36**, 5572–5586 (2016).
90. Wan, M. *et al.* Rett syndrome and beyond: Recurrent spontaneous and familial MECP2 mutations at CpG hotspots. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 1520–1529 (1999).
91. Chao, H. T., Zoghbi, H. Y. & Rosenmund, C. MeCP2 Controls Excitatory Synaptic Strength by Regulating Glutamatergic Synapse Number. *Neuron* **56**, 58–65 (2007).
92. Cordone, V., Pecorelli, A., Amicarelli, F., Hayek, J. & Valacchi, G. The complexity of Rett syndrome models: Primary fibroblasts as a disease-in-a-dish reliable approach. *Drug Discov. Today Dis. Model.* (2019) doi:10.1016/j.ddmod.2019.11.001.
93. Warby, S. Modeling classic female Rett Syndrome in male mice. *Clin. Genet.* **62**, 368–375 (2002).
94. Calfa, G., Percy, A. K. & Pozzo-Miller, L. Experimental models of rett syndrome based on *Mecp2* dysfunction. *Experimental Biology and Medicine* vol. 236 3–19 (2011).
95. Wu, Y. *et al.* Characterization of Rett Syndrome-like phenotypes in *Mecp2*-knockout rats. *J. Neurodev. Disord.* **8**, (2016).
96. Cortelazzo, A. *et al.* Proteomic analysis of the Rett syndrome experimental model *mecp2*Q63X mutant zebrafish. *J. Proteomics* **154**, 128–133 (2017).

97. Hess-Homeier, D. L., Fan, C. Y., Gupta, T., Chiang, A. S. & Certel, S. J. Astrocyte-Specific regulation of hMeCP2 expression in *Drosophila*. *Biol. Open* **3**, 1011–1019 (2014).
98. Chen, Y. *et al.* Modeling Rett Syndrome Using TALEN-Edited MECP2 Mutant Cynomolgus Monkeys. *Cell* **169**, 945-955.e10 (2017).
99. Russo, F. B. Induced pluripotent stem cells for modeling neurological disorders. *World J. Transplant.* **5**, 209 (2015).
100. Hotta, A. *et al.* Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat. Methods* **6**, 370–376 (2009).
101. Marchetto, M. C. N. *et al.* A model for neural development and treatment of rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* **143**, 527–539 (2010).
102. Djuric, U. *et al.* MECP2e1 isoform mutation affects the form and function of neurons derived from Rett syndrome patient iPS cells. *Neurobiol. Dis.* **76**, 37–45 (2015).
103. Williams, E. C. *et al.* Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on wildtype neurons. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 2968–2980 (2014).
104. Kim, K. Y., Hysolli, E. & Park, I. H. Neuronal maturation defect in induced pluripotent stem cells from patients with Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14169–14174 (2011).
105. Tchieu, J. *et al.* Female human iPSCs retain an inactive X chromosome. *Cell Stem Cell* **7**, 329–342 (2010).
106. Huong Le, T. T. *et al.* Efficient and precise CRISPR/Cas9-mediated MECP2 modifications in human-induced pluripotent stem cells. *Front. Genet.* **10**, (2019).
107. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* **12**, 861–874 (2011).
108. Qureshi, I. A. & Mehler, M. F. Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 528–41 (2012).
109. Hombach, S. & Kretz, M. Non-coding RNAs: Classification, biology and functioning. *Adv. Exp. Med. Biol.* **937**, 3–17 (2016).
110. Kung, J. T. Y., Colognori, D. & Lee, J. T. Long noncoding RNAs: Past, present, and future. *Genetics* vol. 193 651–669 (2013).
111. Morris, K. V. & Mattick, J. S. The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews Genetics* vol. 15 423–437 (2014).
112. Wang, K. C. & Chang, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell* vol. 43 904–914 (2011).

113. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* vol. 136 215–233 (2009).
114. Vasudevan, S., Tong, Y. & Steitz, J. A. Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. *Science (80-.)*. **318**, 1931–1934 (2007).
115. Mortensen, R. D., Serra, M., Steitz, J. A. & Vasudevan, S. Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 8281–8286 (2011).
116. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 15 509–524 (2014).
117. De Rie, D. *et al.* An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat. Biotechnol.* **35**, 872–878 (2017).
118. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–4060 (2004).
119. Borchert, G. M., Lanier, W. & Davidson, B. L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 1097–1101 (2006).
120. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S. & Kim, V. N. MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* **21**, 4663–4670 (2002).
121. Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F. & Hannon, G. J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231–235 (2004).
122. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* **18**, 3016–3027 (2004).
123. Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E. & Filipowicz, W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* **118**, 57–68 (2004).
124. Liu, J. *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science (80-.)*. **305**, 1437–1441 (2004).
125. Davis, T. H. *et al.* Conditional loss of dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J. Neurosci.* **28**, 4322–4330 (2008).
126. Schratt, G. M. *et al.* A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* **439**, 283–289 (2006).
127. Shi, Y. *et al.* MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. in *Journal of Neuroscience* vol. 30 14931–14936 (2010).

128. Adlakha, Y. K. & Saini, N. Brain microRNAs and insights into biological functions and therapeutic potential of brain enriched miRNA-128. *Molecular Cancer* vol. 13 (2014).
129. Nowakowski, T. J. *et al.* MicroRNA-92b regulates the development of intermediate cortical progenitors in embryonic mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7056–7061 (2013).
130. Krichevsky, A. M., Sonntag, K.-C., Isacson, O. & Kosik, K. S. Specific MicroRNAs Modulate Embryonic Stem Cell-Derived Neurogenesis. *Stem Cells* **24**, 857–864 (2006).
131. Sosanya, N. M. *et al.* Degradation of high affinity HuD targets releases Kv1.1 mRNA from miR-129 repression by mTORC1. *J. Cell Biol.* **202**, 53–69 (2013).
132. Kocerh, J. *et al.* MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3507–3512 (2009).
133. Szulwach, K. E. *et al.* Cross talk between microRNA and epigenetic regulation in adult neurogenesis. *J. Cell Biol.* **189**, 127–141 (2010).
134. Urdinguio, R. G. *et al.* Disrupted microRNA expression caused by Mecp2 loss in a mouse model of Rett syndrome. *Epigenetics* (2010) doi:10.4161/epi.5.7.13055.
135. Wu, H. *et al.* Genome-wide analysis reveals methyl-CpG-binding protein 2-dependent regulation of microRNAs in a mouse model of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18161–18166 (2010).
136. Huang, E. J. & Reichardt, L. F. Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 677–736 (2001).
137. Chappelle, C. A., Larimore, J. L., Theibert, A. & Pozzo-Miller, L. Modulation of dendritic spine development and plasticity by BDNF and vesicular trafficking: Fundamental roles in neurodevelopmental disorders associated with mental retardation and autism. *J. Neurodev. Disord.* **1**, 185–196 (2009).
138. Li, W. & Pozzo-Miller, L. BDNF deregulation in Rett syndrome. *Neuropharmacology* vol. 76 737–746 (2014).
139. Gao, J. *et al.* A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. *Nature* **466**, 1105–1109 (2010).
140. Fiore, R. *et al.* Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *EMBO J.* **28**, 697–710 (2009).
141. Tsujimura, K. *et al.* MiR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. *Cell Rep.* **12**, 1887–1901 (2015).

142. Zhang, Y. *et al.* MiR-130a regulates neurite outgrowth and dendritic spine density by targeting MeCP2. *Protein Cell* **7**, 489–500 (2016).
143. Lyu, J. W., Yuan, B., Cheng, T. L., Qiu, Z. L. & Zhou, W. H. Reciprocal regulation of autism-related genes MeCP2 and PTEN via microRNAs. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
144. Rodrigues, D. C. *et al.* MECP2 Is Post-transcriptionally Regulated during Human Neurodevelopment by Combinatorial Action of RNA-Binding Proteins and miRNAs. *Cell Rep.* **17**, 720–734 (2016).
145. Han, K. *et al.* Human-specific regulation of MeCP2 levels in fetal brains by microRNA miR-483-5p. *Genes Dev.* **27**, 485–490 (2013).
146. Klein, M. E. *et al.* Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat. Neurosci.* **10**, 1513–1514 (2007).
147. Alvarez-Saavedra, M. *et al.* miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 731–751 (2011).
148. Guo, X. *et al.* Advances in long noncoding RNAs: Identification, structure prediction and function annotation. *Briefings in Functional Genomics* vol. 15 38–46 (2016).
149. Bazin, J. *et al.* Global analysis of ribosome-associated noncoding RNAs unveils new modes of translational regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E10018–E10027 (2017).
150. Gullerova, M. Long non-coding RNA. in *Genomic Elements in Health, Disease and Evolution: Junk DNA* 83–108 (Springer-Verlag London Ltd, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-3070-8_4.
151. Derrien, T. *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* **22**, 1775–1789 (2012).
152. Dykes, I. M. & Emanuelli, C. Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* vol. 15 177–186 (2017).
153. Gil, N. & Ulitsky, I. Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs. *Nature Reviews Genetics* vol. 21 102–117 (2020).
154. Bejerano, G. *et al.* Ultraconserved elements in the human genome. *Science (80-.)*. **304**, 1321–1325 (2004).
155. De Grassi, A. *et al.* Ultradeep sequencing of a human ultraconserved region reveals somatic and constitutional genomic instability. *PLoS Biol.* **8**, (2010).
156. Sandelin, A. *et al.* Arrays of ultraconserved non-coding regions span the loci of key developmental genes in vertebrate genomes. *BMC Genomics* **5**, (2004).

157. Ahituv, N. *et al.* Deletion of ultraconserved elements yields viable mice. *PLoS Biol.* **5**, 1906–1911 (2007).
158. Kitamura, K. *et al.* Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat. Genet.* **32**, 359–369 (2002).
159. Gécz, J., Cloosterman, D. & Partington, M. ARX: a gene for all seasons. *Current Opinion in Genetics and Development* vol. 16 308–316 (2006).
160. Dickel, D. E. *et al.* Ultraconserved Enhancers Are Required for Normal Development. *Cell* **172**, 491-499.e15 (2018).
161. Calin, G. A. *et al.* Ultraconserved Regions Encoding ncRNAs Are Altered in Human Leukemias and Carcinomas. *Cancer Cell* **12**, 215–229 (2007).
162. Mudgapalli, N., Shaw, B. P., Chava, S. & Challagundla, K. B. The Transcribed-Ultra Conserved Regions: Novel non-coding RNA players in neuroblastoma progression. *Non-coding RNA* vol. 5 (2019).
163. Zhou, J. *et al.* Conserved expression of ultra-conserved noncoding RNA in mammalian nervous system. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1860**, 1159–1168 (2017).
164. Wang, C. *et al.* TUC.338 promotes invasion and metastasis in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **140**, 1457–1464 (2017).
165. Zhou, J. *et al.* uc.454 Inhibited Growth by Targeting Heat Shock Protein Family A Member 12B in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **12**, 174–183 (2018).
166. Sun, Y. *et al.* Transcribed Ultraconserved Regions, Uc.323, Ameliorates Cardiac Hypertrophy by Regulating the Transcription of CPT1b (Carnitine Palmitoyl transferase 1b). *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **75**, 79–90 (2020).
167. Nan, A. *et al.* A transcribed ultraconserved noncoding RNA, Uc.173, is a key molecule for the inhibition of lead-induced neuronal apoptosis. *Oncotarget* **7**, 112–124 (2016).
168. Liz, J. *et al.* Regulation of pri-miRNA processing by a long noncoding RNA transcribed from an ultraconserved region. *Mol. Cell* **55**, 138–147 (2014).
169. Fabris, L. & Calin, G. A. Understanding the Genomic Ultraconservations: T-UCRs and Cancer. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 333 159–172 (Elsevier Inc., 2017).
170. Terracciano, D. *et al.* The role of a new class of long noncoding RNAs transcribed from ultraconserved regions in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* vol. 1868 449–455 (2017).

171. Mestdagh, P. *et al.* An integrative genomics screen uncovers ncRNA T-UCR functions in neuroblastoma tumours. *Oncogene* **29**, 3583–3592 (2010).
172. Hudson, R. S. *et al.* Transcription signatures encoded by ultraconserved genomic regions in human prostate cancer. *Mol. Cancer* **12**, (2013).
173. Wang, L. *et al.* Expression of uc.189 and its clinicopathologic significance in gynecological cancers. *Oncotarget* **9**, 7453–7463 (2018).
174. Olivieri, M. *et al.* Long non-coding RNA containing ultraconserved genomic region 8 promotes bladder cancer tumorigenesis. *Oncotarget* **7**, 20636–20654 (2016).
175. Zhang, L.-X. *et al.* uc.38 induces breast cancer cell apoptosis via PBX1. *Am. J. Cancer Res.* **7**, 2438–2451 (2017).
176. Qin, J. *et al.* LncRNA Uc.173 is a key molecule for the regulation of lead-induced renal tubular epithelial cell apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* **100**, 101–107 (2018).
177. Qian, X. X. *et al.* Noncoding transcribed ultraconserved region (T-UCR) uc.261 participates in intestinal mucosa barrier damage in Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **22**, 2840–2852 (2016).
178. Cui, X. *et al.* A transcribed ultraconserved noncoding RNA, uc.417, serves as a negative regulator of brown adipose tissue thermogenesis. *FASEB J.* **30**, 4301–4312 (2016).
179. Guo, J. *et al.* Ultraconserved element uc.372 drives hepatic lipid accumulation by suppressing miR-195/miR4668 maturation. *Nat. Commun.* **9**, 612 (2018).
180. Starke, S. *et al.* Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell Rep.* **10**, 103–111 (2015).
181. Liang, D. & Wilusz, J. E. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes Dev.* **28**, 2233–2247 (2014).
182. He, J., Xie, Q., Xu, H., Li, J. & Li, Y. Circular RNAs and cancer. *Cancer Letters* vol. 396 138–144 (2017).
183. Ashwal-Fluss, R. *et al.* CircRNA Biogenesis competes with Pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* **56**, 55–66 (2014).
184. Zhang, Y. *et al.* Circular Intronic Long Noncoding RNAs. *Mol. Cell* **51**, 792–806 (2013).
185. Ji, P. *et al.* Expanded Expression Landscape and Prioritization of Circular RNAs in Mammals. *Cell Rep.* **26**, 3444-3460.e5 (2019).
186. Wilusz, J. E. A 360° view of circular RNAs: From biogenesis to functions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* vol. 9 (2018).

187. Pamudurti, N. R. *et al.* Translation of CircRNAs. *Mol. Cell* **66**, 9-21.e7 (2017).
188. Hansen, T. B. *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* **495**, 384–388 (2013).
189. You, X. *et al.* Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. *Nat. Neurosci.* **18**, 603–610 (2015).
190. Patop, I. L., Wüst, S. & Kadener, S. Past, present, and future of circ <scp>RNA</scp> s. *EMBO J.* **38**, (2019).
191. Li, Z. *et al.* Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 256–264 (2015).
192. Dong, R. *et al.* CircRNA-derived pseudogenes. *Cell Research* vol. 26 747–750 (2016).
193. Bai, N. *et al.* CircFBLIM1 act as a ceRNA to promote hepatocellular cancer progression by sponging miR-346. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, (2018).
194. Yang, C. *et al.* Silencing circular RNA UVRAG inhibits bladder cancer growth and metastasis by targeting the microRNA-223/fibroblast growth factor receptor 2 axis. *Cancer Sci.* **110**, 99–106 (2019).
195. Li, G. *et al.* Circ-U2AF1 promotes human glioma via derepressing neuro-oncological ventral antigen 2 by sponging hsa-miR-7-5p. *J. Cell. Physiol.* **234**, 9144–9155 (2019).
196. Li, P. *et al.* CircRNA-Cdr1as Exerts Anti-Oncogenic Functions in Bladder Cancer by Sponging MicroRNA-135a. *Cell. Physiol. Biochem.* **46**, 1606–1616 (2018).
197. Zhong, L. *et al.* Circular RNA circC3P1 suppresses hepatocellular carcinoma growth and metastasis through miR-4641/PCK1 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **499**, 1044–1049 (2018).
198. Holdt, L. M. *et al.* Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
199. Bao, X. *et al.* A potential risk factor of essential hypertension in case-control study: Circular RNA hsa_circ_0037911. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **498**, 789–794 (2018).
200. Wang, Z. *et al.* Identifying circRNA-associated-ceRNA networks in the hippocampus of A β 1-42-induced Alzheimer's disease-like rats using microarray analysis. *Aging (Albany, NY)*. **10**, 775–788 (2018).
201. Mo, D. The role of A β circRNA in Alzheimer's disease. *bioRxiv* 260968 (2018) doi:10.1101/260968.

202. Kumar, L. *et al.* Functional Characterization of Novel Circular RNA Molecule, circzip-2 and Its Synthesizing Gene zip-2 in *C. elegans* Model of Parkinson's Disease. *Mol. Neurobiol.* **55**, 6914–6926 (2018).
203. Iparraguirre, L. *et al.* Circular RNA profiling reveals that circular RNAs from ANXA2 can be used as new biomarkers for multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 3564–3572 (2017).
204. Cardamone, G. *et al.* Not only cancer: the long non-coding RNA MALAT1 affects the repertoire of alternatively spliced transcripts and circular RNAs in multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **28**, 1414–1428 (2019).
205. Lin, N. *et al.* An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment. *Mol. Cell* **53**, 1005–1019 (2014).
206. Ng, S. Y., Bogu, G. K., Soh, B. S. & Stanton, L. W. The long noncoding RNA RMST interacts with SOX2 to regulate neurogenesis. *Mol. Cell* **51**, 349–359 (2013).
207. Mo, C. F. *et al.* Loss of non-coding RNA expression from the DLK1-DIO3 imprinted locus correlates with reduced neural differentiation potential in human embryonic stem cell lines. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, (2015).
208. Zhang, S. F., Gao, J. & Liu, C. M. The Role of Non-Coding RNAs in Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Genetics* vol. 10 (2019).
209. Petazzi, P. *et al.* Dysregulation of the long non-coding RNA transcriptome in a Rett syndrome mouse model. *RNA Biol.* **10**, 1197–1203 (2013).
210. Harvey, V. L., Duguid, I. C., Krasel, C. & Stephens, G. J. Evidence that GABA rho subunits contribute to functional ionotropic GABA receptors in mouse cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol.* **577**, 127–39 (2006).
211. Chang, Q., Khare, G., Dani, V., Nelson, S. & Jaenisch, R. The disease progression of *Mecp2* mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron* **49**, 341–348 (2006).
212. Modarresi, F. *et al.* Inhibition of natural antisense transcripts in vivo results in gene-specific transcriptional upregulation. *Nat. Biotechnol.* **30**, 453–459 (2012).
213. Wang, Y. *et al.* Genome-wide differential expression of synaptic long noncoding RNAs in autism spectrum disorder. *Transl. Psychiatry* **5**, (2015).
214. Jiang, B.-C., Yang, T., He, L.-N., Tao, Y.-X. & Gao, Y.-J. Altered T-UCRs expression profile in the spinal cord of mice with neuropathic pain. *Transl. Perioper. pain Med.* **1**, 1–10 (2016).

215. Wu, B. *et al.* LncRNA uc.48+ siRNA improved diabetic sympathetic neuropathy in type 2 diabetic rats mediated by P2X7 receptor in SCG. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* **197**, 14–18 (2016).
216. Mehta, S. L., Dharap, A. & Vemuganti, R. Expression of transcribed ultraconserved regions of genome in rat cerebral cortex. *Neurochem. Int.* **77**, 86–93 (2014).
217. Mehta, S. L. & Vemuganti, R. Ischemic stroke alters the expression of the transcribed ultraconserved regions of the genome in rat brain. *Stroke* **49**, 1024–1028 (2018).
218. Panganiban, G. & Rubenstein, J. L. R. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. *Development* **129**, 4371–4386 (2002).
219. Zerucha, T. *et al.* A highly conserved enhancer in the Dlx5/Dlx6 intergenic region is the site of cross-regulatory interactions between Dlx genes in the embryonic forebrain. *J. Neurosci.* **20**, 709–721 (2000).
220. Ghanem, N. *et al.* Regulatory roles of conserved intergenic domains in vertebrate Dlx bigene clusters. *Genome Res.* **13**, 533–543 (2003).
221. Feng, J. *et al.* The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes Dev.* **20**, 1470–1484 (2006).
222. Bond, A. M. *et al.* Balanced gene regulation by an embryonic brain non-coding RNA is critical for GABA circuitry in adult hippocampus. *Nat Neurosci* **12**, 1020–1027 (2011).
223. Horike, S. I., Cai, S., Miyano, M., Cheng, J. F. & Kohwi-Shigematsu, T. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat. Genet.* **37**, 31–40 (2005).
224. Gruner, H., Cortés-López, M., Cooper, D. A., Bauer, M. & Miura, P. CircRNA accumulation in the aging mouse brain. *Sci. Rep.* **6**, 1–14 (2016).
225. Dong, W. W., Li, H. M., Qing, X. R., Huang, D. H. & Li, H. G. Identification and characterization of human testis derived circular RNAs and their existence in seminal plasma. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
226. Alhasan, A. A. *et al.* Circular RNA enrichment in platelets is a signature of transcriptome degradation. *Blood* **127**, e1–e11 (2016).
227. Chen, B. J., Huang, S. & Janitz, M. Changes in circular RNA expression patterns during human foetal brain development. *Genomics* **111**, 753–758 (2019).
228. Memczak, S. *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* **495**, 333–338 (2013).

229. Zhao, Y., Alexandrov, P. N., Jaber, V. & Lukiw, W. J. Deficiency in the ubiquitin conjugating enzyme UBE2A in Alzheimer's Disease (AD) is linked to deficits in a natural circular miRNA-7 sponge (circRNA; ciRS-7). *Genes (Basel)*. **7**, (2016).
230. Shi, Z. *et al.* The circular RNA ciRS-7 promotes APP and BACE1 degradation in an NF- κ B-dependent manner. *FEBS J.* **284**, 1096–1109 (2017).
231. Abu, N. & Jamal, R. Circular RNAs as promising biomarkers: A mini-review. *Frontiers in Physiology* vol. 7 (2016).
232. Sebastian, M., Panagiotis, P., Oliver, P. & Nikolaus, R. Identification and Characterization of Circular RNAs As a New Class of Putative Biomarkers in Human Blood. *PLoS One* (2015).
233. Bahn, J. H. *et al.* The landscape of MicroRNA, piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva. *Clin. Chem.* **61**, 221–230 (2015).
234. Li, H. *et al.* Comprehensive circular RNA profiles in plasma reveals that circular RNAs can be used as novel biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Clin. Chim. Acta* **480**, 17–25 (2018).
235. Suzuki, H. *et al.* Homodimer of two F-box proteins β TrCP1 or β TrCP2 binds to I κ B α for signal-dependent ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **275**, 2877–2884 (2000).
236. Wang, B. & Li, Y. Evidence for the direct involvement of β TrCP in Gli3 protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 33–38 (2006).
237. Lyle, R. *et al.* Split-hand/split-foot malformation 3 (SHFM3) at 10q24, development of rapid diagnostic methods and gene expression from the region. *Am. J. Med. Genet. Part A* **140**, 1384–1395 (2006).
238. Gao, R. *et al.* The CNTNAP2-CASK complex modulates GluA1 subcellular distribution in interneurons. *Neurosci. Lett.* **701**, 92–99 (2019).
239. Cristofoli, F., Devriendt, K., Davis, E. E., Van Esch, H. & Vermeesch, J. R. Novel CASK mutations in cases with syndromic microcephaly. *Hum. Mutat.* **39**, 993–1001 (2018).
240. Åberg, K., Saetre, P., Jareborg, N. & Jazin, E. Human QKI, a potential regulator of mRNA expression of human oligodendrocyte-related genes involved in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7482–7487 (2006).
241. Lu, J., Shu, R. & Zhu, Y. Dysregulation and dislocation of SFPQ disturbed DNA organization in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *J. Alzheimer's Dis.* **61**, 1311–1321 (2018).
242. Wu, Y. *et al.* Mutations in ionotropic AMPA receptor 3 alter channel properties and are associated with moderate cognitive impairment in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18163–18168 (2007).

243. Epifanova, E., Babaev, A., Newman, A. G. & Tarabykin, V. Role of Zeb2/Sip1 in neuronal development. *Brain Research* vol. 1705 24–31 (2019).
244. Baroti, T. *et al.* Transcription factors Sox5 and Sox6 exert direct and indirect influences on oligodendroglial migration in spinal cord and forebrain. *Glia* **64**, 122–138 (2016).
245. Cid-Samper, F. *et al.* An Integrative Study of Protein-RNA Condensates Identifies Scaffolding RNAs and Reveals Players in Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome. *Cell Rep.* **25**, 3422-3434.e7 (2018).
246. Cajigas, I. *et al.* The Evf2 Ultraconserved Enhancer lncRNA Functionally and Spatially Organizes Megabase Distant Genes in the Developing Forebrain. *Mol. Cell* **71**, 956-972.e9 (2018).
247. Motoyama, J. & Aoto, K. Important Role of Shh Controlling Gli3 Functions during the Dorsal-Ventral Patterning of the Telencephalon. in *Hedgehog-Gli Signaling in Human Disease* 177–186 (Springer US, 2007). doi:10.1007/0-387-33777-6_14.
248. Sokka, A.-L. *et al.* Bruce/apollon promotes hippocampal neuron survival and is downregulated by kainic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 729–35 (2005).
249. Fujita, Y. & Yamashita, T. Sirtuins in neuroendocrine regulation and neurological diseases. *Frontiers in Neuroscience* vol. 12 (2018).
250. Li, X. *et al.* An Autism-Related, Nonsense Foxp1 Mutant Induces Autophagy and Delays Radial Migration of the Cortical Neurons. *Cereb. Cortex* **29**, 3193–3208 (2019).
251. Büttner, N., Johnsen, S. A., Kügler, S. & Vogel, T. Af9/Mllt3 interferes with Tbr1 expression through epigenetic modification of histone H3K79 during development of the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 7042–7047 (2010).
252. Takei, Y., Kikkawa, Y. S., Atapour, N., Hensch, T. K. & Hirokawa, N. Defects in synaptic plasticity, reduced nmda-receptor transport, and instability of postsynaptic density proteins in mice lacking microtubule-associated protein 1a. *J. Neurosci.* **35**, 15539–15554 (2015).
253. Erburu, M. *et al.* SIRT2 inhibition modulate glutamate and serotonin systems in the prefrontal cortex and induces antidepressant-like action. *Neuropharmacology* **117**, 195–208 (2017).
254. Cen, Y., Y. Youn, D. & A. Sauve, A. Advances in Characterization of Human Sirtuin Isoforms: Chemistries, Targets and Therapeutic Applications. *Curr. Med. Chem.* **18**, 1919–1935 (2011).
255. Gold, W. A., Lacina, T. A., Cantrill, L. C. & Christodoulou, J. MeCP2 deficiency is associated with reduced levels of tubulin acetylation and can be restored using HDAC6 inhibitors. *J. Mol. Med.* **93**, 63–72 (2014).

256. Delépine, C. *et al.* Altered microtubule dynamics and vesicular transport in mouse and human MeCP2-deficient astrocytes. *Hum. Mol. Genet.* (2016) doi:10.1093/hmg/ddv464.
257. Rybak-Wolf, A. *et al.* Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Mol. Cell* **58**, 870–885 (2014).
258. Cheng, T. L. *et al.* Regulation of mRNA splicing by MeCP2 via epigenetic modifications in the brain. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
259. Li, X. *et al.* SOX19b regulates the premature neuronal differentiation of neural stem cells through EZH2-mediated histone methylation in neural tube development of zebrafish. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 389 (2019).
260. Wong, T. H., Seelaar, H., Melhem, S., Rozemuller, A. J. M. & van Swieten, J. C. Genetic screening in early-onset Alzheimer's disease identified three novel presenilin mutations. *Neurobiol. Aging* **86**, 201.e9–201.e14 (2020).
261. Li, H. *et al.* Disruption of TCF4 regulatory networks leads to abnormal cortical development and mental disabilities. *Mol. Psychiatry* **24**, 1235–1246 (2019).
262. Avagliano Trezza, R. *et al.* Loss of nuclear UBE3A causes electrophysiological and behavioral deficits in mice and is associated with Angelman syndrome. *Nat. Neurosci.* **22**, 1235–1247 (2019).
263. Christopher, M. A. *et al.* LSD1 protects against hippocampal and cortical neurodegeneration. *Nat. Commun.* **8**, 805 (2017).
264. Pereira Zambalde, E. *et al.* Highlighting transcribed ultraconserved regions in human diseases. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* vol. 11 e1567 (2020).
265. Cuberos, H. *et al.* Roles of LIM kinases in central nervous system function and dysfunction. *FEBS Letters* vol. 589 3795–3806 (2015).
266. Dong, H. *et al.* Pumilio2 regulates synaptic plasticity via translational repression of synaptic receptors in mice. *Oncotarget* **9**, 32134–32148 (2018).
267. von Scheidt, M. *et al.* Applications and Limitations of Mouse Models for Understanding Human Atherosclerosis. *Cell Metabolism* vol. 25 248–261 (2017).
268. Guo, W., Fumagalli, L., Prior, R. & van den Bosch, L. Current advances and limitations in modeling ALS/FTD in a dish using induced pluripotent stem cells. *Frontiers in Neuroscience* vol. 11 671 (2017).
269. Maxwell, M. M. *et al.* The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 3986–96 (2011).

270. Li, W. *et al.* Sirtuin 2, a mammalian homolog of yeast silent information regulator-2 longevity regulator, is an oligodendroglial protein that decelerates cell differentiation through deacetylating α -tubulin. *J. Neurosci.* **27**, 2606–2616 (2007).
271. Pandithage, R. *et al.* The regulation of SIRT2 function by cyclin-dependent kinases affects cell motility. *J. Cell Biol.* **180**, 915–929 (2008).
272. Pais, T. F. *et al.* The NAD-dependent deacetylase sirtuin 2 is a suppressor of microglial activation and brain inflammation. *EMBO J.* **32**, 2603–2616 (2013).
273. Delépine, C., Nectoux, J., Bahi-Buisson, N., Chelly, J. & Bienvenu, T. MeCP2 deficiency is associated with impaired microtubule stability. *FEBS Lett.* **587**, 245–253 (2013).
274. Nectoux, J. *et al.* Altered microtubule dynamics in Mecp2-deficient astrocytes. *J. Neurosci. Res.* **90**, 990–998 (2012).
275. Bedogni, F. *et al.* Rett syndrome and the urge of novel approaches to study MeCP2 functions and mechanisms of action. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* vol. 46 187–201 (2014).
276. Quinti, L. *et al.* SIRT2- and NRF2-Targeting Thiazole-Containing Compound with Therapeutic Activity in Huntington's Disease Models. *Cell Chem. Biol.* **23**, 849–861 (2016).
277. Liu, Y. *et al.* Emerging Role of Sirtuin 2 in Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* vol. 11 (2020).
278. Chen, G. *et al.* Altered levels of the splicing factor muscleblind modifies cerebral cortical function in mouse models of myotonic dystrophy. *Neurobiol. Dis.* **112**, 35–48 (2018).
279. Abdelmohsen, K. *et al.* Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. *RNA Biol.* **14**, 361–369 (2017).
280. Westholm, J. O. *et al.* Genome-wide Analysis of Drosophila Circular RNAs Reveals Their Structural and Sequence Properties and Age-Dependent Neural Accumulation. *Cell Rep.* **9**, 1966–1980 (2014).
281. Cortés-López, M. *et al.* Global accumulation of circRNAs during aging in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* **19**, (2018).
282. Rubenstein, J. L. R. & Merzenich, M. M. Model of autism: Increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes, Brain and Behavior* vol. 2 255–267 (2003).
283. Lu, H. *et al.* Loss and Gain of MeCP2 Cause Similar Hippocampal Circuit Dysfunction that Is Rescued by Deep Brain Stimulation in a Rett Syndrome Mouse Model. *Neuron* **91**, 739–747 (2016).

284. Jorge-Torres, O. C. *et al.* Inhibition of Gsk3b Reduces Nfkb1 Signaling and Rescues Synaptic Activity to Improve the Rett Syndrome Phenotype in Mecp2-Knockout Mice. *Cell Rep.* **23**, 1665–1677 (2018).
285. Dani, V. S. *et al.* Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12560–12565 (2005).
286. Wen, W., Lin, C. Y. & Niu, L. R/G editing in GluA2Rflop modulates the functional difference between GluA1 flip and flop variants in GluA1/2R heteromeric channels. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
287. Katz, D. M. *et al.* Rett Syndrome: Crossing the Threshold to Clinical Translation. *Trends in Neurosciences* vol. 39 100–113 (2016).
288. Guy, J., Gan, J., Selfridge, J., Cobb, S. & Bird, A. Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science (80-)*. **315**, 1143–1147 (2007).
289. Robinson, L. *et al.* Morphological and functional reversal of phenotypes in a mouse model of Rett syndrome. *Brain* (2012) doi:10.1093/brain/aws096.
290. Alvarez-Saavedra, M., Sáez, M. A., Kang, D., Zoghbi, H. Y. & Young, J. I. Cell-specific expression of wild-type MeCP2 in mouse models of Rett syndrome yields insight about pathogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2315–2325 (2007).
291. Jugloff, D. G. M. *et al.* Targeted delivery of an Mecp2 transgene to forebrain neurons improves the behavior of female Mecp2-deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1386–1396 (2008).
292. Bhatnagar, S. *et al.* Genetic and pharmacological reactivation of the mammalian inactive X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 12591–12598 (2014).
293. Gray, S. J. *et al.* Preclinical differences of intravascular aav9 delivery to neurons and glia: A comparative study of adult mice and nonhuman primates. *Mol. Ther.* **19**, 1058–1069 (2011).
294. Gadalla, K. K. *et al.* Improved survival and reduced phenotypic severity following AAV9/MECP2 gene transfer to neonatal and juvenile male Mecp2 knockout mice. *Mol. Ther.* **21**, 18–30 (2013).
295. Deogracias, R. *et al.* Fingolimod, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, increases BDNF levels and improves symptoms of a mouse model of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 14230–14235 (2012).
296. Gomathi, M., Padmapriya, S. & Balachandar, V. Drug Studies on Rett Syndrome: From Bench to Bedside. *J. Autism Dev. Disord.* (2020) doi:10.1007/s10803-020-04381-y.

297. Garg, S. K. *et al.* Systemic delivery of MeCP2 rescues behavioral and cellular deficits in female mouse models of Rett syndrome. *J. Neurosci.* **33**, 13612–13620 (2013).
298. Glaze, D. G. *et al.* A study of the treatment of rett syndrome with folate and betaine. *J. Child Neurol.* **24**, 551–556 (2009).
299. Pitcher, M. R. *et al.* Rett syndrome like phenotypes in the R255X Mecp2 mutant mouse are rescued by MECP2 transgene. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2662–2672 (2015).
300. O’Leary, H. M. *et al.* Placebo-controlled crossover assessment of mecamermin for the treatment of Rett syndrome. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **5**, 323–332 (2018).
301. Mierau, S. B., Patrizi, A., Hensch, T. K. & Fagiolini, M. Cell-Specific Regulation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Maturation by Mecp2 in Cortical Circuits. *Biol. Psychiatry* **79**, 746–754 (2016).
302. Smith-Hicks, C. L. *et al.* Randomized open-label trial of dextromethorphan in Rett syndrome. *Neurology* **89**, 1684–1690 (2017).
303. Toward, M. A., Abdala, A. P., Knopp, S. J., Paton, J. F. R. & Bissonnette, J. M. Increasing brain serotonin corrects CO₂ chemosensitivity in methyl-CpG-binding protein 2 (Mecp2)-deficient mice. *Exp. Physiol.* **98**, 842–849 (2013).
304. Szczesna, K. *et al.* Improvement of the rett syndrome phenotype in a mecp2 mouse model upon treatment with levodopa and a dopa-decarboxylase inhibitor. *Neuropsychopharmacology* **39**, 2846–2856 (2014).
305. Mellios, N. *et al.* β 2-Adrenergic receptor agonist ameliorates phenotypes and corrects microRNA-mediated IGF1 deficits in a mouse model of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9947–9952 (2014).
306. Ricceri, L., De Filippis, B., Fusco, A. & Laviola, G. Cholinergic hypofunction in MeCP2-308 mice: Beneficial neurobehavioural effects of neonatal choline supplementation. *Behav. Brain Res.* **221**, 623–629 (2011).
307. Zhong, W. *et al.* Effects of early-life exposure to THIP on phenotype development in a mouse model of Rett syndrome. *J. Neurodev. Disord.* **8**, (2016).
308. Gogliotti, R. G. *et al.* MGlu7 potentiation rescues cognitive, social, and respiratory phenotypes in a mouse model of Rett syndrome. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
309. Mattick, J. S. & Makunin, I. V. Non-coding RNA. *Human molecular genetics* vol. 15 Spec No 1 (2006).

310. Anastasiadou, E., Jacob, L. S. & Slack, F. J. Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews Cancer* vol. 18 5–18 (2017).
311. Tan, L., Yu, J. T., Hu, N. & Tan, L. Non-coding RNAs in Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology* vol. 47 382–393 (2013).
312. Uchida, S. & Dimmeler, S. Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Circulation Research* vol. 116 737–750 (2015).
313. Vicentini, C., Galuppini, F., Corbo, V. & Fassan, M. Current role of non-coding RNAs in the clinical setting. *Non-coding RNA Research* vol. 4 82–85 (2019).
314. Lin, R., Maeda, S., Liu, C., Karin, M. & Edgington, T. S. A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas. *Oncogene* **26**, 851–858 (2007).
315. Xie, H., Ma, H. & Zhou, D. Plasma HULC as a promising novel biomarker for the detection of hepatocellular carcinoma. *Biomed Res. Int.* (2013) doi:10.1155/2013/136106.
316. Meng, L. *et al.* Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. *Nature* **518**, 409–412 (2015).
317. Hsiao, J. *et al.* Upregulation of Haploinsufficient Gene Expression in the Brain by Targeting a Long Non-coding RNA Improves Seizure Phenotype in a Model of Dravet Syndrome. *EBioMedicine* **9**, 257–277 (2016).
318. Huang, Z. K. *et al.* Microarray Expression Profile of Circular RNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Active Tuberculosis Patients. *Cell. Physiol. Biochem.* **45**, 1230–1240 (2018).
319. Lin, X., Lo, H. C., Wong, D. T. W. & Xiao, X. Noncoding RNAs in human saliva as potential disease biomarkers. *Frontiers in Genetics* vol. 6 (2015).
320. Sweeney, M. D., Sagare, A. P. & Zlokovic, B. V. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nature Reviews Neurology* vol. 14 133–150 (2018).
321. Garbuzova-Davis, S. *et al.* Impaired blood-brain/spinal cord barrier in ALS patients. *Brain Res.* **1469**, 114–128 (2012).
322. Holdt, L. M., Kohlmaier, A. & Teupser, D. Circular RNAs as therapeutic agents and targets. *Frontiers in Physiology* vol. 9 (2018).

ANEXOS

Tabla S1. T-UCRs con expresión alterada en el modelo de ratón RTT.

T-UCRs con regulación negativa bajo condiciones de supresión de MeCP2

ID T-UCR	Edad camada	Región	Fold change (KO/WT)	p-valor	Host gene
<i>uc.78</i>	4 semanas	Córtex frontal	-16,59352012	0,0000925	<i>Zfx1b (Zeb2)</i>
<i>uc.404</i>	4 semanas	Córtex frontal	-14,31122471	0,0054785	Intergénico
<i>uc.392</i>	4 semanas	Córtex frontal	-6,71207822	0,01348259	Intergénico
<i>uc.162</i>	4 semanas	Córtex frontal	-4,96426171	0,00024169	Intergénico
<i>uc.288</i>	4 semanas	Córtex frontal	-4,78641168	0,0021748	<i>C10orf11</i>
<i>uc.333</i>	4 semanas	Córtex frontal	-4,744807004	0,0000723	<i>Flj23342</i>
<i>uc.389</i>	4 semanas	Córtex frontal	-4,706579628	0,02717143	<i>Flj12476</i>
<i>uc.342</i>	4 semanas	Córtex frontal	-4,362227395	0,00083289	<i>Hoxc4</i>
<i>uc.10</i>	4 semanas	Córtex frontal	-4,279630858	0,00286536	Intergénico
<i>uc.126</i>	4 semanas	Córtex frontal	-4,206016454	0,002271	Intergénico
<i>uc.264</i>	4 semanas	Córtex frontal	-4,150070776	0,01825341	<i>Hnrpk</i>
<i>uc.159</i>	4 semanas	Córtex frontal	-3,916401889	0,00837038	Intergénico
<i>uc.321</i>	4 semanas	Córtex frontal	-3,661494394	0,00847969	Intergénico
<i>uc.82</i>	4 semanas	Córtex frontal	-3,373470086	0,02557971	Intergénico
<i>uc.336</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,97521437	0,00040563	<i>Sox5</i>
<i>uc.183</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,87698495	0,0009819	<i>Fbxw1b</i>
<i>uc.291</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,861296928	0,00496594	<i>C10orf11</i>
<i>uc.269</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,648826567	0,00168572	<i>Kiaa1608</i>
<i>uc.402</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,620348909	0,00060709	<i>Ab023222</i>
<i>uc.67</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,580595788	0,00507958	Intergénico
<i>uc.333</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,535777242	0,04056432	<i>Flj23342</i>
<i>uc.3</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,511056079	0,0347543	<i>Flj20321</i>
<i>uc.377</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,495662889	0,00827115	<i>Prpf39</i>
<i>uc.374</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,417897903	0,0002667	<i>Mipol1</i>
<i>uc.385</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,369821948	0,00040759	<i>Meis2</i>

<i>uc.137</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,320002194	0,02896411	<i>Al122120</i>
<i>uc.299</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,309920203	0,00430897	<i>Pax2</i>
<i>uc.155</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,24267637	0,00060459	Intergénico
<i>uc.130</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,217463835	0,02121552	Intergénico
<i>uc.177</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,202826573	0,00025455	<i>Ranbp17</i>
<i>uc.77</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,184869895	0,00151857	<i>Zfhx1b</i>
<i>uc.291</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,053410183	0,0145055	<i>C10orf11</i>
<i>uc.340</i>	4 semanas	Córtex frontal	-2,024405028	0,00072574	Intergénico
<i>uc.343</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,998551386	0,0111491	<i>Hoxc4</i>
<i>uc.427</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,885411543	0,03307661	Intergénico
<i>uc.336</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,868402578	0,00949441	<i>Sox5</i>
<i>uc.27</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,858089286	0,00494824	Intergénico
<i>uc.319</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,83454285	0,02184271	Intergénico
<i>uc.1</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,740924376	0,0047116	<i>Pex14</i>
<i>uc.462</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,714953197	0,0041561	<i>Pola</i>
<i>uc.372</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,712043966	0,00197634	<i>Bc042045</i>
<i>uc.450</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,695167727	0,00099663	Intergénico
<i>uc.341</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,691346567	0,0210238	<i>Hoxc10</i>
<i>uc.285</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,686324504	0,00602014	<i>Ccar1</i>
<i>uc.161</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,672852669	0,03706973	<i>Ap3b1</i>
<i>uc.259</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,666172442	0,00248187	Intergénico
<i>uc.377</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,629868346	0,01431785	<i>Prpf39</i>
<i>uc.137</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,562189859	0,020799	<i>Al122120</i>
<i>uc.475</i>	4 semanas	Córtex frontal	-1,541547471	0,02288383	<i>Ogt</i>
<i>uc.77</i>	4 semanas	Hipocampo	-2,096009142	0,03332319	<i>Zfhx1b</i>
<i>uc.411</i>	4 semanas	Hipocampo	-1,767022493	0,0274584	<i>Aatf</i>
<i>uc.418</i>	4 semanas	Hipocampo	-1,59085915	0,0162718	<i>Sfrs1</i>
<i>uc.117</i>	4 semanas	Hipocampo	-1,532625481	0,04196895	Intergénico
<i>uc.70</i>	4 semanas	Hipocampo	-1,518775202	0,04678512	<i>Arhgap15</i>
<i>uc.418</i>	4 semanas	Hipocampo	-1,513376467	0,03885515	<i>Sfrs1</i>

<i>uc.126</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,560900982	0,01304357	Intergénico
<i>uc.185</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,47359215	0,00472364	<i>Clk4</i>
<i>uc.414</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,24440085	0,01340883	<i>Thra</i>
<i>uc.49</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,167305439	0,0110068	<i>Ak074867</i>
<i>uc.418</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,151097222	0,00818705	<i>Sfrs1</i>
<i>uc.185</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,150977476	0,00675211	<i>Clk4</i>
<i>uc.419</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,145766887	0,03245139	<i>Sfrs1</i>
<i>uc.102</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,129584878	0,03356725	<i>Ptd004</i>
<i>uc.174</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,125448083	0,0261548	<i>Matr3</i>
<i>uc.474</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,088919916	0,00266136	<i>Znf261</i>
<i>uc.209</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,085980535	0,00819363	<i>Tra2a</i>
<i>uc.419</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,059204947	0,01430914	<i>Sfrs1</i>
<i>uc.203</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,040334512	0,00207106	<i>Qki</i>
<i>uc.12</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,019044852	0,00563875	<i>Sfpq</i>
<i>uc.102</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,972236559	0,04055857	<i>Ptd004</i>
<i>uc.44</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,97168558	0,03320983	<i>Znf238</i>
<i>uc.443</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,965170134	0,03995709	<i>Hnrpm</i>
<i>uc.37</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,939566973	0,02721827	<i>D1s155e</i>
<i>uc.456</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,936433201	0,0041428	<i>Sfrs6</i>
<i>uc.183</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,926355025	0,01037175	<i>Fbxw1b</i>
<i>uc.419</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,918877779	0,04987149	<i>Sfrs1</i>
<i>uc.414</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,908147348	0,00768576	<i>Thra</i>
<i>uc.366</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,903058023	0,02233704	<i>Strn3</i>
<i>uc.50</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,888356824	0,01105641	<i>Sfrs7</i>
<i>uc.474</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,877281546	0,00190345	<i>Znf261</i>
<i>uc.420</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,852367378	0,01932727	<i>Ddx5</i>
<i>uc.333</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,845797555	0,00530975	<i>Flj23342</i>
<i>uc.185</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,838898704	0,00339994	<i>Clk4</i>
<i>uc.75</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,793658897	0,00588264	<i>Zfhx1b</i>
<i>uc.472</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,792572398	0,00270811	<i>Cask</i>

<i>uc.185</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,780618929	0,02391164	<i>Clk4</i>
<i>uc.203</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,753642334	0,01443836	<i>Qki</i>
<i>uc.186</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,753102766	0,0041162	<i>Hnrph1</i>
<i>uc.285</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,723868239	0,01905824	<i>Ccar1</i>
<i>uc.49</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,718111673	0,01876735	<i>Ak074867</i>
<i>uc.477</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,715971402	0,02705271	<i>Plp1</i>
<i>uc.189</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,713445032	0,00563503	<i>Sfrs3</i>
<i>uc.151</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,710564637	0,03121929	<i>Zfr</i>
<i>uc.420</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,708614151	0,01662601	<i>Ddx5</i>
<i>uc.44</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,690019551	0,0262307	<i>Znf238</i>
<i>uc.46</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,683235875	0,01842575	<i>Hnrpu</i>
<i>uc.413</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,679338187	0,02821728	<i>Pparbp</i>
<i>uc.217</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,667419539	0,01741006	Intergénico
<i>uc.144</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,640931318	0,03666656	<i>HnrpdI</i>
<i>uc.44</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,638939723	0,03501057	<i>Znf238</i>
<i>uc.376</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,630199261	0,0031955	<i>Prpf39</i>
<i>uc.419</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,613008381	0,04529655	<i>Sfrs1</i>
<i>uc.50</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,607680166	0,01563908	<i>Sfrs7</i>
<i>uc.101</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,600272207	0,00376667	<i>Sp3</i>
<i>uc.313</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,577774968	0,01107783	<i>Tial1</i>
<i>uc.407</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,575169109	0,04125726	<i>Nfat5</i>
<i>uc.48</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,57462173	0,01486909	<i>Pum2</i>
<i>uc.193</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,566225434	0,00582075	<i>Syncrip</i>
<i>uc.50</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,564948034	0,01361937	<i>Sfrs7</i>
<i>uc.169</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,561686443	0,01435145	<i>Nr2f1</i>
<i>uc.475</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,551071464	0,03756092	<i>Ogt</i>
<i>uc.75</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,52982545	0,02299861	<i>Zfx1b</i>
<i>uc.471</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,525611522	0,02501478	<i>Ddx3x</i>
<i>uc.263</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,510657245	0,01749804	<i>Hnrpk</i>
<i>uc.319</i>	8 semanas	Córtex frontal	-1,508912406	0,02959115	Intergénico

<i>uc.336</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,132944344	0,03160258	<i>Sox5</i>
<i>uc.385</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,739529766	0,01230439	<i>Meis2</i>
<i>uc.389</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,264776427	0,00174998	<i>Flj12476</i>
<i>uc.342</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,212125208	0,00151853	<i>Hoxc4</i>
<i>uc.456</i>	8 semanas	Hipocampo	-1,945091459	0,03593549	<i>Sfrs6</i>
<i>uc.49</i>	8 semanas	Hipocampo	-1,87422617	0,00244271	<i>Ak074867</i>
<i>uc.84</i>	8 semanas	Hipocampo	-1,832916098	0,0018178	Intergénico
<i>uc.377</i>	8 semanas	Hipocampo	-1,831445437	0,00972061	<i>Prpf39</i>
<i>uc.209</i>	8 semanas	Hipocampo	-1,740283355	0,04923426	<i>Tra2a</i>
<i>uc.336</i>	8 semanas	Hipocampo	-1,725020404	0,04419277	<i>Sox5</i>
<i>uc.186</i>	8 semanas	Hipocampo	-1,610589863	0,00870518	<i>Hnrph1</i>
<i>uc.334</i>	8 semanas	Hipocampo	-1,6102213	0,00997584	<i>Hnt</i>
<i>uc.420</i>	8 semanas	Hipocampo	-1,58834202	0,04235036	<i>Ddx5</i>
<i>uc.456</i>	8 semanas	Hipocampo	-1,583727343	0,0131559	<i>Sfrs6</i>

T-UCRs con regulación positiva bajo condiciones de supresión de MeCP2

ID T-UCR	Edad camada	Región	Fold change (KO/WT)	p-valor	Host gene
<i>uc.49</i>	4 semanas	Córtex frontal	3,18745079	0,00066543	<i>Ak074867</i>
<i>uc.173</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,4936189	0,03097128	<i>Ube2b</i>
<i>uc.481</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,39802062	0,01342991	<i>Stag2</i>
<i>uc.184</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,36229742	0,00679949	<i>Cpeb4</i>
<i>uc.420</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,30197283	0,01826638	<i>Ddx5</i>
<i>uc.481</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,29866226	0,00993697	<i>Stag2</i>
<i>uc.325</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,22015524	0,00076048	<i>Elp4</i>
<i>uc.154</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,20685511	0,01101704	Intergénico
<i>uc.45</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,18607159	0,02417923	<i>Hnrpu</i>
<i>uc.46</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,17053901	0,04572333	<i>Hnrpu</i>
<i>uc.75</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,10754846	0,02195548	<i>Zfx1b</i>
<i>uc.75</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,07490283	0,00727807	<i>Zfx1b</i>
<i>uc.45</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,05408069	0,03879256	<i>Hnrpu</i>
<i>uc.477</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,05214988	0,00140702	<i>Plp1</i>
<i>uc.188</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,00544688	0,03295593	<i>Sca1</i>
<i>uc.471</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,0020993	0,00614675	<i>Ddx3x</i>
<i>uc.120</i>	4 semanas	Córtex frontal	2,00209401	0,00152085	<i>Znf288</i>
<i>uc.268</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,99652125	0,02766155	Intergénico
<i>uc.184</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,91712881	0,00571459	<i>Cpeb4</i>
<i>uc.188</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,90767656	0,03105065	<i>Sca1</i>
<i>uc.184</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,89832241	0,01748245	<i>Cpeb4</i>
<i>uc.246</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,87119241	0,01735082	<i>Ext1</i>
<i>uc.313</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,86055489	0,01648131	<i>Tial1</i>
<i>uc.45</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,85562043	0,04853469	<i>Hnrpu</i>

<i>uc.184</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,83215685	0,01107565	<i>Cpeb4</i>
<i>uc.203</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,80786409	0,00982088	<i>Qki</i>
<i>uc.212</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,80505585	0,04986754	Intergénico
<i>uc.75</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,79734291	0,00527894	<i>Zfhx1b</i>
<i>uc.414</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,79591581	0,02239028	<i>Thra</i>
<i>uc.472</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,79405068	0,026013	<i>Cask</i>
<i>uc.9</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,75776388	0,02243018	Intergénico
<i>uc.420</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,7526674	0,00724907	<i>Ddx5</i>
<i>uc.50</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,74804995	0,02435505	<i>Sfrs7</i>
<i>uc.188</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,74476607	0,02183866	<i>Sca1</i>
<i>uc.477</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,70686241	0,00110195	<i>Plp1</i>
<i>uc.414</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,68655107	0,0266867	<i>Thra</i>
<i>uc.478</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,66406212	0,01550877	<i>Gria3</i>
<i>uc.360</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,63947003	0,02973974	<i>Nova1</i>
<i>uc.420</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,62277347	0,04690881	<i>Ddx5</i>
<i>uc.203</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,59786172	0,01148535	<i>Qki</i>
<i>uc.300</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,57895204	0,0224696	<i>Pax2</i>
<i>uc.331</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,5761781	0,00224027	<i>Dlg2</i>
<i>uc.144</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,5336263	0,00734568	<i>Hnrpd1</i>
<i>uc.253</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,51616546	0,00770918	<i>C9orf39</i>
<i>uc.376</i>	4 semanas	Córtex frontal	1,51014527	0,03661128	<i>Prpf39</i>
<i>uc.299</i>	4 semanas	Hipocampo	2,1229933	0,02628851	<i>Pax2</i>
<i>uc.196</i>	4 semanas	Hipocampo	2,01562657	0,02674779	Intergénico
<i>uc.78</i>	4 semanas	Hipocampo	1,96076069	0,03956117	<i>Zfhx1b</i>
<i>uc.47</i>	4 semanas	Hipocampo	1,94681348	0,03488228	Intergénico
<i>uc.185</i>	4 semanas	Hipocampo	1,83046617	0,04194855	<i>Clk4</i>
<i>uc.298</i>	4 semanas	Hipocampo	1,79497457	0,02120055	Intergénico
<i>uc.475</i>	4 semanas	Hipocampo	1,78449292	0,00470688	<i>Ogt</i>
<i>uc.155</i>	4 semanas	Hipocampo	1,75794047	0,03840378	Intergénico
<i>uc.414</i>	4 semanas	Hipocampo	1,74435102	0,01233943	<i>Thra</i>

<i>uc.88</i>	8 semanas	Córtex frontal	4,25311507	0,00264932	Intergénico
<i>uc.47</i>	8 semanas	Córtex frontal	3,41077298	0,00748443	Intergénico
<i>uc.120</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,63052803	0,00066535	<i>Znf288</i>
<i>uc.236</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,23302605	0,00061798	Intergénico
<i>uc.325</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,04646049	0,00159401	<i>Elp4</i>
<i>uc.175</i>	8 semanas	Córtex frontal	1,87078766	0,00227029	<i>Ebf</i>
<i>uc.269</i>	8 semanas	Córtex frontal	1,73541905	0,00805964	Kiaa1608
<i>uc.248</i>	8 semanas	Córtex frontal	1,6864388	0,00413447	Intergénico
<i>uc.91</i>	8 semanas	Córtex frontal	1,67538952	0,0322789	<i>Fap</i>
<i>uc.435</i>	8 semanas	Córtex frontal	1,64616561	0,00731848	<i>Tcf4</i>
<i>uc.82</i>	8 semanas	Córtex frontal	1,55886425	0,0416467	Intergénico
<i>uc.220</i>	8 semanas	Hipocampo	1,72638555	0,00701222	Intergénico
<i>uc.292</i>	8 semanas	Hipocampo	1,64593516	0,01456089	<i>Mlr2</i>
<i>uc.161</i>	8 semanas	Hipocampo	1,63516456	0,02438515	<i>Ap3b1</i>
<i>uc.221</i>	8 semanas	Hipocampo	1,60962907	0,04354181	Intergénico
<i>uc.120</i>	8 semanas	Hipocampo	1,57606951	0,00662134	<i>Znf288</i>

Tabla S2. ARNs circulares con expresión alterada en el modelo de ratón RTT. *Fold change* delimitado en -2/2. Se marcan en negrita los candidatos seleccionados.

***circRNAs* con regulación negativa bajo condiciones de supresión de MeCP2**

ID <i>circRNA</i>	Edad camada	Región	<i>Fold change</i> (KO/WT)	p-valor	Coordenadas	<i>Host gene</i>
<i>mmu_circRNA_41204</i>	8 semanas	Córtex frontal	-7,8997088	0,049802202	chr7:16917596-16917698	<i>Calm3</i>
<i>mmu_circRNA_34414</i>	8 semanas	Córtex frontal	-4,8400058	0,003039767	chr2:121298596-121299046	<i>Map1a</i>
<i>mmu_circRNA_28662</i>	8 semanas	Córtex frontal	-4,6657898	0,035529555	chr15:66244503-66261906	<i>Kcnq3</i>
<i>mmu_circRNA_28367</i>	8 semanas	Córtex frontal	-3,7219849	0,045917804	chr15:33048054-33066227	Intergénico
<i>mmu_circRNA_41725</i>	8 semanas	Córtex frontal	-3,3096274	0,047871589	chr7:78229486-78260414	<i>Ntrk3</i>
<i>mmu_circRNA_39430</i>	8 semanas	Córtex frontal	-3,2016176	0,046225342	chr5:127677204-127678140	<i>Git1d1</i>
<i>mmu_circRNA_38216</i>	8 semanas	Córtex frontal	-3,1879374	0,036346571	chr5:21683155-21683465	<i>Napepld</i>
<i>mmu_circRNA_25826</i>	8 semanas	Córtex frontal	-3,1635476	0,029844062	chr12:109544702-109545041	<i>Meg3</i>
<i>mmu_circRNA_18944</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,9421169	0,015771498	chr1:79717201-79729712	<i>Wdfy1</i>
<i>mmu_circRNA_41227</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,9254296	0,040917004	chr7:25641456-25641826	<i>Bckdha</i>
<i>mmu_circRNA_19217</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,8769367	0,001045127	chr19:4288591-4294928	<i>Adrbk1</i>
<i>mmu_circRNA_35121</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,6357962	0,039604806	chr3:16189477-16205424	<i>Ythdf3</i>
<i>mmu_circRNA_29553</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,5742145	0,001765323	chr16:32884123-32898470	<i>Fyttd1</i>
<i>mmu_circRNA_43571</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,5653234	0,008094709	chr8:121804946-121806598	<i>Klhdc4</i>
<i>mmu_circRNA_36624</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,5176999	0,024354168	chr4:33943551-33945405	<i>Cnr1</i>
<i>mmu_circRNA_45832</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,35095	0,040730193	chrX:151878717-151883309	<i>Huwe1</i>
<i>mmu_circRNA_32069</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,3404508	0,007807572	chr18:82618742-82624486	<i>Zfp236</i>
<i>mmu_circRNA_011334</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,2972891	0,040013619	chr15:91497392-91516494	<i>Slc2a13</i>
<i>mmu_circRNA_19397</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,2752553	0,029433957	chr5:140899658-140901133	<i>Card11</i>
<i>mmu_circRNA_013105</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,2168391	0,009529251	chr19:46384219-46385088	<i>Actr1a</i>
<i>mmu_circRNA_24711</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,213899	0,029000515	chr12:12358044-12364846	<i>Fam49a</i>
<i>mmu_circRNA_41253</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,2063919	0,021510244	chr7:28776857-28778990	<i>Sirt2</i>
<i>mmu_circRNA_19057</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,204738	0,013411022	chr12:8698087-8713939	<i>Pum2</i>
<i>mmu_circRNA_28074</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,2014316	0,031719201	chr14:121973608-121994470	<i>Ubac2</i>
<i>mmu_circRNA_39586</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,1816995	0,042748733	chr5:140669021-140680945	<i>lqce</i>

<i>mmu_circRNA_000661</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,1639235	0,032997874	chr1:66471975-66491131	<i>Unc80</i>
<i>mmu_circRNA_21011</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,142	0,041406887	chr1:151980425-152006767	<i>1700025G04Rik</i>
<i>mmu_circRNA_20201</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,0835111	0,001513206	chr1:60181462-60206416	<i>Nbeal1</i>
<i>mmu_circRNA_006254</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,0766354	0,044002542	chr2:33064003-33105023	<i>Garnl3</i>
<i>mmu_circRNA_012853</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,076346	0,034761088	chr11:65074436-65075210	<i>Arhgap44</i>
<i>mmu_circRNA_24466</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,0310278	0,009793892	chr11:118811277-118859872	<i>Rbfox3</i>
<i>mmu_circRNA_34966</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,021365	0,045674253	chr2:166116871-166132854	<i>Sulf2</i>
<i>mmu_circRNA_29770</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,0029068	0,042015548	chr16:45711495-45711709	<i>Tagln3</i>
<i>mmu_circRNA_018331</i>	8 semanas	Córtex frontal	-2,0008974	0,029963131	chr13:42055399-42055542	<i>Hivep1</i>
<i>mmu_circRNA_23592</i>	8 semanas	Hipocampo	-24,6814264	4,68668E-05	chr11:69486958-69495264	<i>Dnah2</i>
<i>mmu_circRNA_44599</i>	8 semanas	Hipocampo	-20,018546	0,000680258	chr9:72194945-72233329	<i>RP23-292F17.7</i>
<i>mmu_circRNA_43210</i>	8 semanas	Hipocampo	-18,3175873	0,000874177	chr8:84949881-84950676	<i>Rtbdn</i>
<i>mmu_circRNA_44963</i>	8 semanas	Hipocampo	-16,4025091	8,67787E-05	chr9:100994567-100999273	<i>Pccb</i>
<i>mmu_circRNA_27257</i>	8 semanas	Hipocampo	-11,9967008	0,005362127	chr14:26608089-26612061	<i>Dennd6a</i>
<i>mmu_circRNA_42971</i>	8 semanas	Hipocampo	-11,6325535	0,005383463	chr8:65694850-65699162	<i>March1</i>
<i>mmu_circRNA_37101</i>	8 semanas	Hipocampo	-9,6419851	0,024732259	chr4:87782286-87791982	<i>Mlit3</i>
<i>mmu_circRNA_27840</i>	8 semanas	Hipocampo	-8,7826514	8,08334E-05	chr14:77840167-77861242	<i>Dnajc15</i>
<i>mmu_circRNA_013298</i>	8 semanas	Hipocampo	-8,3202146	0,006999075	chr17:74668758-74670382	<i>Birc6</i>
<i>mmu_circRNA_30183</i>	8 semanas	Hipocampo	-8,0236569	0,002171916	chr17:5264031-5291283	<i>Arid1b</i>
<i>mmu_circRNA_35781</i>	8 semanas	Hipocampo	-7,8534595	0,004854954	chr3:89564858-89609736	<i>Kcnn3</i>
<i>mmu_circRNA_40286</i>	8 semanas	Hipocampo	-7,348709	0,002126684	chr6:52812102-52894071	<i>Jazf1</i>
<i>mmu_circRNA_23670</i>	8 semanas	Hipocampo	-7,2288818	0,000171299	chr11:72863874-72868070	<i>Zzef1</i>
<i>mmu_circRNA_45188</i>	8 semanas	Hipocampo	-7,1190544	0,000832161	chr9:113188224-113214256	Intergénico
<i>mmu_circRNA_24439</i>	8 semanas	Hipocampo	-6,9739166	0,041257862	chr11:116545833-116546968	<i>Ube2o</i>
<i>mmu_circRNA_27548</i>	8 semanas	Hipocampo	-6,9714911	0,00035825	chr14:52120472-52126384	<i>Rpgrip1</i>
<i>mmu_circRNA_30780</i>	8 semanas	Hipocampo	-6,9511931	0,000652253	chr17:65852119-65859134	<i>Ralbp1</i>
<i>mmu_circRNA_28233</i>	8 semanas	Hipocampo	-6,4874362	7,41712E-05	chr15:10447695-10463980	<i>Dnajc21</i>
<i>mmu_circRNA_37699</i>	8 semanas	Hipocampo	-6,4606388	0,000200818	chr4:129712103-129730325	<i>Khdrbs1</i>
<i>mmu_circRNA_36335</i>	8 semanas	Hipocampo	-6,3711268	0,000688707	chr3:153187037-153189340	Intergénico
<i>mmu_circRNA_29066</i>	8 semanas	Hipocampo	-6,3377952	0,007572674	chr15:99510581-99514450	<i>Faim2</i>

<i>mmu_circRNA_22648</i>	8 semanas	Hipocampo	-5,7127995	0,001897426	chr10:115294870-115302791	<i>Rab21</i>
<i>mmu_circRNA_28640</i>	8 semanas	Hipocampo	-5,5897495	8,57805E-05	chr15:62175466-62244857	<i>Pvt1</i>
<i>mmu_circRNA_28874</i>	8 semanas	Hipocampo	-5,3645533	0,040674886	chr15:83983443-83988958	<i>Efcab6</i>
<i>mmu_circRNA_21715</i>	8 semanas	Hipocampo	-5,2895689	0,032331741	chr10:18677824-18699410	<i>Arfgef3</i>
<i>mmu_circRNA_41543</i>	8 semanas	Hipocampo	-5,1841513	0,000932678	chr7:61945130-61981768	<i>A330076H08Rik</i>
<i>mmu_circRNA_43574</i>	8 semanas	Hipocampo	-5,1747012	0,000377998	chr8:122305357-122307641	<i>Zfpm1</i>
<i>mmu_circRNA_42046</i>	8 semanas	Hipocampo	-5,1268521	0,003780223	chr7:105651071-105652306	<i>Timm10b</i>
<i>mmu_circRNA_40341</i>	8 semanas	Hipocampo	-5,0488183	0,047460339	chr6:60815616-60818365	<i>Snca</i>
<i>mmu_circRNA_27126</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,9779693	0,009220137	chr14:16818689-16819151	<i>Rarb</i>
<i>mmu_circRNA_37880</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,9006144	0,010949474	chr4:143162055-143180991	<i>Prdm2</i>
<i>mmu_circRNA_20422</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,8869352	0,003015746	chr1:83275617-83280585	<i>Sphkap</i>
<i>mmu_circRNA_37444</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,8806478	0,002581714	chr4:110478464-110507282	<i>Agbl4</i>
<i>mmu_circRNA_34416</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,8493806	0,029746476	chr2:121321654-121334836	<i>Ppip5k1</i>
<i>mmu_circRNA_35065</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,7720367	0,01592657	chr2:180683808-180692048	<i>Dido1</i>
<i>mmu_circRNA_32425</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,7160893	0,00172491	chr19:30143359-30158649	<i>Gldc</i>
<i>mmu_circRNA_42371</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,6870792	0,005674922	chr7:130418447-130481715	<i>Ate1</i>
<i>mmu_circRNA_28349</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,5402067	0,004668663	chr15:31478294-31480422	<i>March6</i>
<i>mmu_circRNA_44470</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,5339643	0,00430214	chr9:65053768-65078105	<i>Dpp8</i>
<i>mmu_circRNA_19397</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,5122118	0,027255693	chr5:140899658-140901133	<i>Card11</i>
<i>mmu_circRNA_24172</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,3498941	0,035247722	chr11:98756107-98764405	<i>Thra</i>
<i>mmu_circRNA_28238</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,2576408	0,00373584	chr15:11071498-11122027	<i>Adamts12</i>
<i>mmu_circRNA_40834</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,2400882	0,003300768	chr6:119002576-119005081	<i>Cacna1c</i>
<i>mmu_circRNA_22794</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,1877358	0,006866209	chr10:128349752-128353211	<i>Cs</i>
<i>mmu_circRNA_28662</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,1619627	0,027548721	chr15:66244503-66261906	<i>Kcnq3</i>
<i>mmu_circRNA_38978</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,076814	0,004216762	chr5:92187234-92189344	<i>Uso1</i>
<i>mmu_circRNA_34423</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,0556515	0,008206957	chr2:121394346-121413480	<i>Catsper2</i>
<i>mmu_circRNA_39272</i>	8 semanas	Hipocampo	-4,0429797	0,023914309	chr5:121408196-121409204	<i>Naa25</i>
<i>mmu_circRNA_28915</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,9422732	0,000629365	chr15:88919530-88939038	<i>Tll8</i>
<i>mmu_circRNA_42047</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,887587	0,002426175	chr7:105651071-105657284	<i>Timm10b</i>
<i>mmu_circRNA_43431</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,8840982	0,030060258	chr8:107361425-107361545	<i>Mir5098</i>

<i>mmu_circRNA_38270</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,8399742	8,31695E-05	chr5:24689379-24706584	<i>Nub1</i>
<i>mmu_circRNA_35871</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,7967199	0,001035823	chr3:99187480-99214774	<i>Wars2</i>
<i>mmu_circRNA_40689</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,7495885	0,008467469	chr6:103641893-103717631	<i>Chl1</i>
<i>mmu_circRNA_24171</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,6990835	0,025984408	chr11:98753289-98764405	<i>Thra</i>
<i>mmu_circRNA_42101</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,5938395	0,000768257	chr7:110788609-110791347	<i>Ampd3</i>
<i>mmu_circRNA_36527</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,5255259	0,006690446	chr4:21781735-21825077	<i>Usp45</i>
<i>mmu_circRNA_32154</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,3531454	0,010057938	chr19:3612197-3622726	<i>Lrp5</i>
<i>mmu_circRNA_19784</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,35018	0,015021256	chr1:24451761-24461529	<i>Col19a1</i>
<i>mmu_circRNA_009788</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,3442126	0,018274707	chr2:90690066-90696724	<i>Nup160</i>
<i>mmu_circRNA_34336</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,3294246	0,02097586	chr2:119946824-119958363	<i>Mga</i>
<i>mmu_circRNA_29220</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,3156712	0,001365033	chr16:11150594-11159124	<i>Zc3h7a</i>
<i>mmu_circRNA_013166</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,2349403	0,004473105	chr6:56875676-56875744	<i>Fkbp9</i>
<i>mmu_circRNA_30338</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,1951781	0,001264193	chr17:25585542-25612444	<i>Lmf1</i>
<i>mmu_circRNA_20282</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,1890205	0,001402872	chr1:66521454-66530853	<i>Unc80</i>
<i>mmu_circRNA_34447</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,1500523	0,002786754	chr2:122095589-122098256	<i>Spg11</i>
<i>mmu_circRNA_39954</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,1484458	8,81729E-05	chr6:29551851-29568993	<i>Tnpo3</i>
<i>mmu_circRNA_29434</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,1431348	0,029095372	chr16:20688538-20689332	<i>Eif4g1</i>
<i>mmu_circRNA_43769</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,0917884	0,00038666	chr9:10167117-10172122	<i>Cntn5</i>
<i>mmu_circRNA_41926</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,0631088	0,001993206	chr7:97509590-97519205	<i>Ints4</i>
<i>mmu_circRNA_21271</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,0549064	0,008016115	chr1:171135992-171138755	<i>Sdhc</i>
<i>mmu_circRNA_27862</i>	8 semanas	Hipocampo	-3,0514256	0,011031461	chr14:78982235-79038201	<i>Vwa8</i>
<i>mmu_circRNA_34071</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,9920968	0,002872339	chr2:91810029-91875826	<i>Ambra1</i>
<i>mmu_circRNA_36583</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,9608423	6,77385E-05	chr4:32561777-32563367	<i>Bach2</i>
<i>mmu_circRNA_39615</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,9572348	0,000183419	chr5:143068316-143087621	<i>Rnf216</i>
<i>mmu_circRNA_35639</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,8887761	0,039129619	chr3:80702457-80710844	<i>Gria2</i>
<i>mmu_circRNA_004911</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,8850403	0,010133772	chr17:56588797-56588866	<i>Safb</i>
<i>mmu_circRNA_23283</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,8423878	0,021522632	chr11:50071170-50087461	<i>Rnf130</i>
<i>mmu_circRNA_22730</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,8395142	0,038796601	chr10:121371143-121381291	<i>Gns</i>
<i>mmu_circRNA_23144</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,8317686	0,023810787	chr11:30426016-30446380	4930505A04Rik
<i>mmu_circRNA_23184</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,8174998	0,024148217	chr11:32738361-32740265	<i>Fbxw11</i>

<i>mmu_circRNA_37985</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,8077289	0,009721459	chr4:152356080-152361042	<i>Chd5</i>
<i>mmu_circRNA_27545</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,7746056	0,00862077	chr14:50816196-50817470	<i>Parp2</i>
<i>mmu_circRNA_29120</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,7253009	0,005701967	chr15:103519948-103528344	<i>Pde1b</i>
<i>mmu_circRNA_003170</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,7132109	0,025526518	chr2:18101457-18126229	<i>Mllt10</i>
<i>mmu_circRNA_004325</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,6895643	0,03865778	chrX:10579314-10585652	<i>Tspan7</i>
<i>mmu_circRNA_35734</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,6518203	0,016351686	chr3:88350015-88351581	<i>Smg5</i>
<i>mmu_circRNA_41269</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,628898	0,004355731	chr7:29788048-29789436	<i>Zfp30</i>
<i>mmu_circRNA_21915</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,6138174	0,000659606	chr10:43921386-43936091	<i>Rtn4ip1</i>
<i>mmu_circRNA_19499</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,6028059	0,007363528	chr8:107063674-107064202	<i>Tmed6</i>
<i>mmu_circRNA_40398</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,6007104	0,028897454	chr6:71851771-71868803	<i>Immt</i>
<i>mmu_circRNA_38243</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,5945463	0,013553504	chr5:23450151-23486400	<i>Kmt2e</i>
<i>mmu_circRNA_37775</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,5792617	0,002046104	chr4:134828011-134837034	<i>Tmem57</i>
<i>mmu_circRNA_33117</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,5692002	0,045699205	chr2:22957017-22971259	<i>Abi1</i>
<i>mmu_circRNA_42626</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,5667718	0,000445809	chr8:18861476-18870927	<i>Agpat5</i>
<i>mmu_circRNA_20008</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,5586914	0,029397159	chr1:43954576-43960967	<i>Tpp2</i>
<i>mmu_circRNA_37299</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,5050562	0,027970888	chr4:103951833-104161950	<i>Dab1</i>
<i>mmu_circRNA_29569</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,4799102	0,005732283	chr16:33083018-33091362	<i>Lmln</i>
<i>mmu_circRNA_013105</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,3977441	0,006175462	chr19:46384219-46385088	<i>Actr1a</i>
<i>mmu_circRNA_27520</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,360498	0,02243142	chr14:47064219-47096174	<i>Samd4</i>
<i>mmu_circRNA_35077</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,3575719	0,021835981	chr2:181411695-181424388	<i>Zbtb46</i>
<i>mmu_circRNA_27989</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,356297	0,017091164	chr14:103656932-103688403	<i>Slain1</i>
<i>mmu_circRNA_41253</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,3437634	0,023827469	chr7:28776857-28778990	<i>Sirt2</i>
<i>mmu_circRNA_017967</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,3135384	0,00319623	chr1:45344955-45345054	<i>Col3a1</i>
<i>mmu_circRNA_26330</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,3034637	0,010198319	chr13:52896176-52898736	<i>Auh</i>
<i>mmu_circRNA_45942</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,2945953	0,031076109	chrX:162471794-162526396	<i>Reps2</i>
<i>mmu_circRNA_36264</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,2909208	4,71982E-05	chr3:144780081-144780723	<i>Clca1</i>
<i>mmu_circRNA_34713</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,2837278	0,012340683	chr2:144635757-144636572	<i>Dtd1</i>
<i>mmu_circRNA_19357</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,2706628	0,003693805	chr5:8329978-8367361	<i>Adam22</i>
<i>mmu_circRNA_30037</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,261102	0,002783416	chr16:91664197-91671465	<i>Son</i>
<i>mmu_circRNA_39558</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,2468073	0,002799236	chr5:138150606-138152969	<i>Zfp113</i>

<i>mmu_circRNA_30959</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,2359676	0,027948437	chr17:78667121-78677417	<i>Strn</i>
<i>mmu_circRNA_43695</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,2323661	0,003535008	chr9:4502373-4519539	<i>Gria4</i>
<i>mmu_circRNA_33289</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,2067025	0,02956692	chr2:32809100-32812105	<i>Stxbp1</i>
<i>mmu_circRNA_26309</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,2023676	0,002729842	chr13:49545966-49560287	<i>Cenpp</i>
<i>mmu_circRNA_21743</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,1825433	0,005773914	chr10:21000505-21058250	<i>Ahi1</i>
<i>mmu_circRNA_35086</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,1804508	0,002510584	chr2:181631434-181632087	<i>Prpf6</i>
<i>mmu_circRNA_24089</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,1749116	0,006051429	chr11:94013622-94071686	<i>Spag9</i>
<i>mmu_circRNA_29330</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,1671782	0,038181634	chr16:16336852-16346145	<i>Dnm1l</i>
<i>mmu_circRNA_001643</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,150082	0,04685234	chr11:72712156-72714483	<i>Ankfy1</i>
<i>mmu_circRNA_43007</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,1304751	0,018541217	chr8:70321503-70323470	<i>Cers1</i>
<i>mmu_circRNA_43589</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,1207324	0,001656926	chr8:123124147-123124476	<i>Cpne7</i>
<i>mmu_circRNA_42295</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,1190328	0,042455361	chr7:125728308-125761849	<i>D430042O09Rik</i>
<i>mmu_circRNA_45232</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,1164498	0,002685822	chr9:117911879-117929181	<i>Zcwpw2</i>
<i>mmu_circRNA_21914</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,1100093	0,025437483	chr10:43530597-43533157	<i>1700021F05Rik</i>
<i>mmu_circRNA_39246</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,0894643	0,015103946	chr5:120654805-120655129	<i>Rasal1</i>
<i>mmu_circRNA_28138</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,082637	0,002128547	chr15:3333346-3347601	<i>Ghr</i>
<i>mmu_circRNA_37690</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,0748471	0,021049112	chr4:129465229-129466990	<i>Bsdcl</i>
<i>mmu_circRNA_28225</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,0693071	0,042360473	chr15:8688287-8688425	<i>Slc1a3</i>
<i>mmu_circRNA_45525</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,0628283	0,019819313	chrX:74228320-74230753	<i>Flna</i>
<i>mmu_circRNA_42955</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,0560808	0,042579028	chr8:61372507-61374367	<i>Sh3rf1</i>
<i>mmu_circRNA_25734</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,0500403	0,000152189	chr12:101981913-101985350	<i>Cpsf2</i>
<i>mmu_circRNA_25780</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,047451	0,004834933	chr12:104705052-104707032	<i>Dicer1</i>
<i>mmu_circRNA_44131</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,0474031	0,020703642	chr9:50619754-50621190	<i>Pih1d2</i>
<i>mmu_circRNA_41475</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,0349883	0,015008658	chr7:59243349-59288780	<i>Ube3a</i>
<i>mmu_circRNA_24450</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,0144385	0,018155166	chr11:117735971-117740009	<i>Tnrc6c</i>
<i>mmu_circRNA_28158</i>	8 semanas	Hipocampo	-2,0095229	0,00523889	chr15:4516618-4517327	<i>Plcx3</i>

circRNAs con regulación positiva bajo condiciones de supresión de MeCP2

ID circRNA	Edad camada	Región	Fold change (KO/WT)	p-valor	Coordenadas	Host gene
<i>mmu_circRNA_36847</i>	8 semanas	Córtex frontal	3,6183311	0,048985075	chr4:58815258-58841605	<i>Al314180</i>
<i>mmu_circRNA_44267</i>	8 semanas	Córtex frontal	3,5145983	0,049904204	chr9:56653599-56674509	<i>Lingo1</i>
<i>mmu_circRNA_34803</i>	8 semanas	Córtex frontal	3,0987232	0,02477574	chr2:154859677-154867033	<i>a</i>
<i>mmu_circRNA_44468</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,8451112	0,044224027	chr9:65036968-65075888	<i>Dpp8</i>
<i>mmu_circRNA_005985</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,8208894	0,045457127	chr11:50296198-50296265	<i>Canx</i>
<i>mmu_circRNA_25585</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,5970815	0,042015384	chr12:88850278-88853112	<i>Nrxn3</i>
<i>mmu_circRNA_31398</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,4771506	0,032727342	chr18:22409920-22517823	<i>Asx13</i>
<i>mmu_circRNA_21284</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,3359488	0,043925225	chr1:172484280-172484970	<i>Igsf9</i>
<i>mmu_circRNA_21703</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,2999289	0,03588679	chr10:17908033-17916032	<i>Heca</i>
<i>mmu_circRNA_42808</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,2315057	0,028308034	chr8:40454497-40456695	<i>Zdhhc2</i>
<i>mmu_circRNA_24162</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,2307144	0,04475945	chr11:98163799-98169452	<i>Med1</i>
<i>mmu_circRNA_43623</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,1852258	0,045970685	chr8:125837936-125839693	<i>Pcnx12</i>
<i>mmu_circRNA_22765</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,1247337	0,030578612	chr10:125294594-125302081	<i>Slc16a7</i>
<i>mmu_circRNA_003795</i>	8 semanas	Córtex frontal	2,123049	0,029285342	chr1:155847109-155848727	<i>Cep350</i>
<i>mmu_circRNA_45982</i>	8 semanas	Hipocampo	6,3645488	0,022888887	chrX:169976921-169987766	<i>Mid1</i>
<i>mmu_circRNA_40615</i>	8 semanas	Hipocampo	3,3163131	0,044238514	chr6:99260344-99308438	<i>Foxp1</i>
<i>mmu_circRNA_37907</i>	8 semanas	Hipocampo	2,9402897	0,045285409	chr4:147756119-147807183	<i>Gm13157</i>
<i>mmu_circRNA_19440</i>	8 semanas	Hipocampo	2,4706235	0,022856927	chr6:128931669-128944342	<i>Mir7649</i>
<i>mmu_circRNA_36873</i>	8 semanas	Hipocampo	2,4247805	0,002086505	chr4:59493185-59524476	<i>Ptbp3</i>
<i>mmu_circRNA_20658</i>	8 semanas	Hipocampo	2,4128951	0,046894658	chr1:110924995-110954872	<i>Cdh19</i>
<i>mmu_circRNA_27013</i>	8 semanas	Hipocampo	2,3594196	0,020458933	chr13:119492633-119493015	<i>Gm7120</i>
<i>mmu_circRNA_24245</i>	8 semanas	Hipocampo	2,3227644	0,044090369	chr11:104512900-104522822	<i>Cdc27</i>
<i>mmu_circRNA_004229</i>	8 semanas	Hipocampo	2,2314344	0,039810615	chr2:113363835-113365829	<i>Fmn1</i>
<i>mmu_circRNA_20118</i>	8 semanas	Hipocampo	2,2216643	0,044213764	chr1:55701929-55717475	<i>Plcl1</i>
<i>mmu_circRNA_29548</i>	8 semanas	Hipocampo	2,2091525	0,043821861	chr16:32618217-32621297	<i>Tfrc</i>

<i>mmu_circRNA_37908</i>	8 semanas	Hipocampo	2,2065575	0,009068923	chr4:147807089-147828796	<i>Zfp933</i>
<i>mmu_circRNA_21585</i>	8 semanas	Hipocampo	2,1890645	0,005916376	chr1:192930477-193027017	<i>Syt14</i>
<i>mmu_circRNA_007853</i>	8 semanas	Hipocampo	2,1844277	0,035603296	chr10:14004200-14086082	<i>Hivep2</i>
<i>mmu_circRNA_27199</i>	8 semanas	Hipocampo	2,1717584	0,034201411	chr14:21783678-21793674	<i>Samd8</i>
<i>mmu_circRNA_35627</i>	8 semanas	Hipocampo	2,1317118	0,045303158	chr3:79479486-79481879	<i>Fnip2</i>
<i>mmu_circRNA_43373</i>	8 semanas	Hipocampo	2,1010687	0,010447092	chr8:99190204-99230522	<i>Cdh8</i>
<i>mmu_circRNA_40622</i>	8 semanas	Hipocampo	2,0998459	0,034905688	chr6:99308343-99651791	<i>Gm20696</i>
<i>mmu_circRNA_36144</i>	8 semanas	Hipocampo	2,094444	0,016418716	chr3:129996680-130005096	<i>Sec24b</i>
<i>mmu_circRNA_007835</i>	8 semanas	Hipocampo	2,0307971	0,014975017	chr13:64243633-64248466	<i>Cdc14b</i>

Tabla S3. T-UCRs con expresión alterada en el modelo celular neural con supresión de MeCP2. Fold change delimitado en -3/3

T-UCRs con regulación negativa bajo condiciones de supresión de MeCP2

ID T-UCR	Estado de diferenciación	Fold change (KO/WT)	p-valor	Coordenadas	Host gene
<i>uc.326</i>	Progenitores neurales	-9,8582309	7,41799E-05	chr11:31785679-31785994	<i>ELP4</i>
<i>uc.335</i>	Progenitores neurales	-9,1505255	0,000388323	chr12:16715413-16715627	<i>LMO3</i>
<i>uc.327</i>	Progenitores neurales	-3,9403019	0,00171028	chr11:31786283-31786551	<i>ELP4</i>
<i>uc.7</i>	Progenitores neurales	-3,7858901	0,000120431	chr1:10836132-10836388	<i>CASZ1</i>
<i>uc.98</i>	Progenitores neurales	-3,4519681	0,022420074	chr2:172956517-172956755	Intergénico
<i>uc.277</i>	Progenitores neurales	-3,2573942	0,003483212	chr9:128607709-128607985	<i>PBX3</i>
<i>uc.3</i>	Progenitores neurales	-2,7386679	0,000114407	chr1:10751164-10751389	<i>CASZ1</i>
<i>uc.475</i>	Progenitores neurales	-2,7145394	0,040285739	chrX:70766054-70766451	<i>OGT</i>
<i>uc.263</i>	Progenitores neurales	-2,6473729	0,012842059	chr9:86590283-86590490	<i>HNRNPK</i>
<i>uc.4</i>	Progenitores neurales	-2,6039643	0,00428919	chr1:10758248-10758607	<i>CASZ1</i>
<i>uc.280</i>	Progenitores neurales	-2,3023546	0,006035004	chr9:128678005-128678225	<i>PBX3</i>
<i>uc.125</i>	Progenitores neurales	-2,2841665	0,034051932	chr3:137068316-137068581	Intergénico
<i>uc.61</i>	Progenitores neurales	-2,2477042	0,042977887	chr2:60687572-60687898	<i>BCL11A</i>
<i>uc.346</i>	Progenitores neurales	-2,2406799	0,025113305	chr12:106976509-106976711	<i>RP11-144F15.1</i>
<i>uc.205</i>	Progenitores neurales	-2,213889	0,019175419	chr7:20829788-20830040	Intergénico
<i>uc.416</i>	Progenitores neurales	-2,1860808	0,003403195	chr17:46670886-46671172	<i>HOXB5</i>
<i>uc.408</i>	Progenitores neurales	-2,1146775	0,000106657	chr16:72821044-72821296	<i>ZFHX3</i>
<i>uc.98</i>	30 días de diferenciación	-8,198274	0,008197768	chr2:172956517-172956755	Intergénico
<i>uc.280</i>	30 días de diferenciación	-4,2286698	0,001269111	chr9:128678005-128678225	<i>PBX3</i>
<i>uc.255</i>	30 días de diferenciación	-3,870307	0,002541368	chr9:23691767-23691999	<i>ELAVL2</i>
<i>uc.326</i>	30 días de diferenciación	-3,8306215	0,012339893	chr11:31785679-31785994	<i>ELP4</i>
<i>uc.110</i>	30 días de diferenciación	-3,6374397	0,010865771	chr2:237071381-237071624	Intergénico
<i>uc.276</i>	30 días de diferenciación	-3,3781824	0,0061762	chr9:128605811-128606243	<i>PBX3</i>
<i>uc.256</i>	30 días de diferenciación	-3,0738178	0,000702526	chr9:23692233-23692439	<i>ELAVL2</i>
<i>uc.61</i>	30 días de diferenciación	-2,718492	0,008987382	chr2:60687572-60687898	<i>BCL11A</i>

<i>uc.331</i>	30 días de diferenciación	-2,6854462	0,003632176	chr11:83195158-83195376	<i>DLG2</i>
<i>uc.254</i>	30 días de diferenciación	-2,1605418	0,014877647	chr9:23496724-23497003	Intergénico
<i>uc.328</i>	30 días de diferenciación	-2,1198216	0,035270855	chr11:31825662-31825893	<i>PAX6</i>
<i>uc.49</i>	30 días de diferenciación	-2,1075798	0,043706599	chr2:33813408-33813615	<i>FAM98A</i>
<i>uc.247</i>	30 días de diferenciación	-2,0992029	0,036707197	chr9:969153-969514	Intergénico

T-UCRs con regulación positiva bajo condiciones de supresión de MeCP2

ID T-UCR	Estado de diferenciación	Fold change (KO/WT)	p-valor	Coordenadas	Host gene
<i>uc.176</i>	Progenitores neurales	11,9844608	0,026594255	chr5:167332694-167332940	<i>TENM2</i>
<i>uc.223</i>	Progenitores neurales	5,902368	0,016999473	chr7:114058184-114058452	<i>FOXP2</i>
<i>uc.224</i>	Progenitores neurales	3,7179252	0,025697938	chr7:114063018-114063313	<i>FOXP2</i>
<i>uc.477</i>	Progenitores neurales	2,9148382	0,042319715	chrX:103041490-103041699	<i>PLP1</i>
<i>uc.458</i>	Progenitores neurales	2,0399402	0,038583344	chr22:36148491-36148695	<i>RBFOX2</i>
<i>uc.479</i>	30 días de diferenciación	6,8845069	0,000244237	chrX:122613750-122614052	<i>GRIA3</i>
<i>uc.176</i>	30 días de diferenciación	5,0355956	0,016043688	chr5:167332694-167332940	<i>TENM2</i>
<i>uc.224</i>	30 días de diferenciación	4,1532121	0,003634512	chr7:114063018-114063313	<i>FOXP2</i>
<i>uc.185</i>	30 días de diferenciación	3,1289569	0,02119709	chr5:178044306-178044717	<i>CLK4</i>
<i>uc.226</i>	30 días de diferenciación	3,0448108	0,014566962	chr7:114209317-114209522	<i>FOXP2</i>
<i>uc.452</i>	30 días de diferenciación	3,0057502	0,020470481	chr19:31827946-31828150	<i>TSHZ3</i>
<i>uc.223</i>	30 días de diferenciación	2,7879245	0,001759048	chr7:114058184-114058452	<i>FOXP2</i>
<i>uc.20</i>	30 días de diferenciación	2,2045638	0,044924898	chr1:45002371-45002640	<i>RNF220</i>
<i>uc.265</i>	30 días de diferenciación	2,0270021	0,010561005	chr9:108118470-108118687	<i>SLC44A1</i>

T-UCRs con regulación negativa durante el proceso de diferenciación

ID T-UCR	Genotipo	Fold change (30 días/progenitores neurales)	p-valor	Coordenadas	Host gene
<i>uc.361</i>	WT	-5,9723535	0,007510861	chr14:29233134-29233401	Intergénico
<i>uc.37</i>	WT	-5,0487968	0,003375262	chr1:115280052-115280254	<i>CSDE1</i>
<i>uc.475</i>	WT	-4,7918601	0,000292202	chrX:70766054-70766451	<i>OGT</i>
<i>uc.174</i>	WT	-4,5009821	0,011936911	chr5:138643653-138643913	<i>MATR3</i>
<i>uc.128</i>	WT	-4,481064	0,002272687	chr3:147049637-147049936	Intergénico
<i>uc.193</i>	WT	-4,2981174	0,005916853	chr6:86321685-86322004	<i>SYNCRIP</i>
<i>uc.291</i>	WT	-4,1924678	0,031806195	chr10:78283623-78283854	<i>C10orf11</i>
<i>uc.153</i>	WT	-4,1471292	0,037290787	chr5:72195685-72195925	<i>TNPO1</i>
<i>uc.7</i>	WT	-4,0528237	0,000120933	chr1:10836132-10836388	<i>CASZ1</i>
<i>uc.418</i>	WT	-3,9193052	0,007632992	chr17:56082227-56082444	<i>RP11-159D12.5</i>
<i>uc.264</i>	WT	-3,8817514	0,038538975	chr9:86590491-86590758	<i>HNRNPK</i>
<i>uc.97</i>	WT	-3,5146599	0,009378345	chr2:172822630-172823072	<i>HAT1</i>
<i>uc.352</i>	WT	-3,4361388	0,012054302	chr13:72694164-72694364	Intergénico
<i>uc.447</i>	WT	-3,172676	0,033352309	chr19:30767780-30768053	<i>ZNF536</i>
<i>uc.61</i>	WT	-3,0017167	0,00664705	chr2:60687572-60687898	<i>BCL11A</i>
<i>uc.160</i>	KO	-7,3518753	0,030827314	chr5:77268843-77269165	Intergénico
<i>uc.247</i>	KO	-7,2784032	0,010265131	chr9:969153-969514	Intergénico
<i>uc.128</i>	KO	-5,7677779	3,97643E-05	chr3:147049637-147049936	Intergénico
<i>uc.352</i>	KO	-5,5552626	0,039184474	chr13:72694164-72694364	Intergénico
<i>uc.61</i>	KO	-5,3173592	3,50449E-05	chr2:60687572-60687898	<i>BCL11A</i>
<i>uc.37</i>	KO	-4,9070139	0,000309669	chr1:115280052-115280254	<i>CSDE1</i>
<i>uc.447</i>	KO	-4,786825	0,043735036	chr19:30767780-30768053	<i>ZNF536</i>
<i>uc.97</i>	KO	-4,707197	0,005273044	chr2:172822630-172823072	<i>HAT1</i>
<i>uc.2</i>	KO	-4,3551047	0,012884111	chr1:10732542-10732749	<i>CASZ1</i>
<i>uc.49</i>	KO	-4,1280191	0,002558529	chr2:33813408-33813615	<i>FAM98A</i>

<i>uc.153</i>	<i>KO</i>	-4,1202804	0,010756794	chr5:72195685-72195925	<i>TNPO1</i>
<i>uc.330</i>	<i>KO</i>	-4,1060129	0,005148195	chr11:66393895-66394102	<i>RBM4</i>
<i>uc.202</i>	<i>KO</i>	-3,7432534	0,027803215	chr6:100973982-100974212	<i>ASCC3</i>
<i>uc.154</i>	<i>KO</i>	-3,7243576	0,003420787	chr5:72210014-72210217	<i>TNPO1</i>
<i>uc.314</i>	<i>KO</i>	-3,6488661	0,041809094	chr10:124852202-124852404	Intergénico
<i>uc.189</i>	<i>KO</i>	-3,5478219	0,002438391	chr6:36567516-36568089	<i>SRSF3</i>
<i>uc.84</i>	<i>KO</i>	-3,4112559	0,007498907	chr2:157194705-157194914	<i>NR4A2</i>
<i>uc.291</i>	<i>KO</i>	-3,1925188	0,007447235	chr10:78283623-78283854	<i>C10orf11</i>
<i>uc.344</i>	<i>KO</i>	-3,1865081	0,002187042	chr12:54426885-54427139	<i>HOXC5</i>
<i>uc.110</i>	<i>KO</i>	-3,1420827	0,001504845	chr2:237071381-237071624	Intergénico
<i>uc.174</i>	<i>KO</i>	-3,1208023	0,001419501	chr5:138643653-138643913	<i>MATR3</i>

T-UCRs con regulación positiva durante el proceso de diferenciación

ID T-UCR	Genotipo	Fold change (30 días/progenitores neurales)	p-valor	Coordenadas	Host gene
<i>uc.184</i>	WT	9,0794856	0,000763225	chr5:173385291-173385521	<i>CPEB4</i>
<i>uc.350</i>	WT	5,438456	0,000912403	chr13:72256099-72256339	<i>DACH1</i>
<i>uc.422</i>	WT	5,1344224	0,006646504	chr18:22748187-22748413	<i>ZNF521</i>
<i>uc.479</i>	WT	4,9297537	0,000123499	chrX:122613750-122614052	<i>GRIA3</i>
<i>uc.373</i>	WT	4,9057348	0,018513503	chr14:36581806-36582200	Intergénico
<i>uc.308</i>	WT	4,3903369	0,000322209	chr10:103245811-103246088	<i>BTRC</i>
<i>uc.359</i>	WT	4,302964	0,00112616	chr14:26914967-26915291	<i>NOVA1</i>
<i>uc.266</i>	WT	4,2405656	0,046428096	chr9:109378291-109378534	Intergénico
<i>uc.423</i>	WT	4,0267381	0,036623915	chr18:22756354-22756577	<i>ZNF521</i>
<i>uc.230</i>	WT	3,8697657	1,57818E-05	chr7:115319460-115319698	Intergénico
<i>uc.15</i>	WT	3,6854783	0,046473622	chr1:38561075-38561308	Intergénico
<i>uc.176</i>	WT	3,6826595	0,023491639	chr5:167332694-167332940	<i>TENM2</i>
<i>uc.477</i>	WT	3,441789	0,010511161	chrX:103041490-103041699	<i>PLP1</i>
<i>uc.223</i>	WT	3,3293231	0,000691795	chr7:114058184-114058452	<i>FOXP2</i>
<i>uc.198</i>	WT	3,3107701	0,029869753	chr6:98719888-98720195	Intergénico
<i>uc.256</i>	WT	3,3030476	0,000120999	chr9:23692233-23692439	<i>ELAVL2</i>
<i>uc.456</i>	WT	3,3017125	0,002767767	chr20:42087755-42088075	<i>SRSF6</i>
<i>uc.467</i>	WT	3,1598668	0,048713621	chrX:25008353-25009084	<i>POLA1</i>
<i>uc.104</i>	WT	3,0566574	0,000678815	chr2:174986933-174987149	<i>OLA1</i>
<i>uc.255</i>	WT	3,0508469	0,016418305	chr9:23691767-23691999	<i>ELAVL2</i>
<i>uc.131</i>	WT	3,0506885	0,025735727	chr3:157990039-157990246	<i>RSRC1</i>
<i>uc.74</i>	WT	3,022101	0,011618846	chr2:144825962-144826500	<i>GTDC1</i>
<i>uc.458</i>	WT	3,0180209	0,005654401	chr22:36148491-36148695	<i>RBFOX2</i>
<i>uc.479</i>	KO	21,0750128	1,45502E-05	chrX:122613750-122614052	<i>GRIA3</i>
<i>uc.236</i>	KO	16,2214547	0,000592384	chr8:37250468-37250735	Intergénico

<i>uc.185</i>	KO	13,5419172	0,000935416	chr5:178044306-178044717	<i>CLK4</i>
<i>uc.77</i>	KO	11,109609	0,033567899	chr2:145185764-145186060	<i>ZEB2</i>
<i>uc.335</i>	KO	10,1622604	0,000205005	chr12:16715413-16715627	<i>LMO3</i>
<i>uc.416</i>	KO	8,7840809	0,00014595	chr17:46670886-46671172	<i>HOXB5</i>
<i>uc.184</i>	KO	8,2859197	0,001732163	chr5:173385291-173385521	<i>CPEB4</i>
<i>uc.15</i>	KO	6,8249971	0,002391983	chr1:38561075-38561308	Intergénico
<i>uc.354</i>	KO	6,428113	0,021652736	chr13:78976828-78977063	Intergénico
<i>uc.456</i>	KO	6,1641628	0,000465264	chr20:42087755-42088075	<i>SRSF6</i>
<i>uc.19</i>	KO	5,8075768	0,001338984	chr1:44990311-44990567	<i>RNF220</i>
<i>uc.480</i>	KO	5,7996677	0,010777634	chrX:123235271-123235473	<i>STAG2</i>
<i>uc.376</i>	KO	5,7382237	0,024485038	chr14:45565749-45566039	<i>PRPF39</i>
<i>uc.226</i>	KO	5,259023	0,000153854	chr7:114209317-114209522	<i>FOXP2</i>
<i>uc.216</i>	KO	5,2535658	1,75907E-05	chr7:50358154-50358466	<i>IKZF1</i>
<i>uc.282</i>	KO	5,1595482	0,008288575	chr9:140042489-140042696	<i>GRIN1</i>
<i>uc.265</i>	KO	4,8928851	0,00507937	chr9:108118470-108118687	<i>SLC44A1</i>
<i>uc.182</i>	KO	4,6940501	0,038377607	chr5:170703078-170703317	<i>RANBP17</i>
<i>uc.333</i>	KO	4,5095535	0,010154807	chr11:124644646-124644916	<i>MSANTD2</i>
<i>uc.63</i>	KO	4,4674709	0,008932458	chr2:61752500-61752778	<i>XPO1</i>
<i>uc.482</i>	KO	4,4216502	0,033132352	chrX:139170487-139170782	Intergénico
<i>uc.12</i>	KO	4,345015	0,012369375	chr1:35650226-35650427	<i>SFPQ</i>
<i>uc.406</i>	KO	4,3132256	0,015531955	chr16:69680363-69680574	<i>NFAT5</i>
<i>uc.123</i>	KO	4,2916948	0,023783861	chr3:136983543-136984035	Intergénico
<i>uc.117</i>	KO	4,2635861	0,000774714	chr3:70871839-70872090	Intergénico
<i>uc.307</i>	KO	4,1723022	0,027244471	chr10:103243982-103244214	<i>BTRC</i>
<i>uc.473</i>	KO	4,1473171	0,000131943	chrX:70373223-70373445	<i>NLGN3</i>
<i>uc.266</i>	KO	4,1369385	0,005687824	chr9:109378291-109378534	Intergénico
<i>uc.476</i>	KO	4,1332942	0,00107353	chrX:81789598-81789836	Intergénico
<i>uc.470</i>	KO	4,1283961	0,009187134	chrX:25401215-25401556	Intergénico
<i>uc.229</i>	KO	4,0829464	2,52443E-05	chr7:115134644-115134940	Intergénico
<i>uc.92</i>	KO	4,0595465	0,003465647	chr2:164450678-164450987	<i>FIGN</i>

<i>uc.198</i>	KO	4,058212	0,003109562	chr6:98719888-98720195	Intergénico
<i>uc.172</i>	KO	4,0175976	0,036440155	chr5:93650718-93650936	<i>KIAA0825</i>
<i>uc.74</i>	KO	4,0026036	5,11856E-05	chr2:144825962-144826500	<i>GTDC1</i>
<i>uc.73</i>	KO	3,9742378	1,64528E-05	chr2:144762312-144762513	<i>GTDC1</i>
<i>uc.208</i>	KO	3,9126471	0,01185132	chr7:23561669-23561887	<i>TRA2A</i>
<i>uc.422</i>	KO	3,7405894	0,000448676	chr18:22748187-22748413	<i>ZNF521</i>
<i>uc.350</i>	KO	3,7049103	0,042555595	chr13:72256099-72256339	<i>DACH1</i>
<i>uc.151</i>	KO	3,6998359	0,000789992	chr5:32380136-32380350	<i>ZFR</i>
<i>uc.71</i>	KO	3,6881501	0,02728107	chr2:144712855-144713103	<i>GTDC1</i>
<i>uc.394</i>	KO	3,6057376	6,81368E-07	chr15:97236099-97236301	Intergénico
<i>uc.206</i>	KO	3,5038344	1,17384E-06	chr7:21003764-21004263	Intergénico
<i>uc.203</i>	KO	3,4602689	0,020975413	chr6:163991703-163991905	<i>QKI</i>
<i>uc.359</i>	KO	3,4006255	0,003286895	chr14:26914967-26915291	<i>NOVA1</i>
<i>uc.275</i>	KO	3,3946281	0,004312111	chr9:128584115-128584370	<i>PBX3</i>
<i>uc.102</i>	KO	3,3647418	0,006503996	chr2:174946408-174946746	<i>OLA1</i>
<i>uc.312</i>	KO	3,363903	0,000993358	chr10:120076536-120076858	<i>FAM204A</i>
<i>uc.225</i>	KO	3,3361499	2,69324E-05	chr7:114072854-114073055	<i>FOXP2</i>
<i>uc.212</i>	KO	3,315565	0,00011172	chr7:27141937-27142142	<i>HOXA2</i>
<i>uc.209</i>	KO	3,3003311	0,000231346	chr7:23561887-23562137	<i>TRA2A</i>
<i>uc.308</i>	KO	3,2716052	0,004472542	chr10:103245811-103246088	<i>BTRC</i>
<i>uc.326</i>	KO	3,2533488	0,007175226	chr11:31785679-31785994	<i>ELP4</i>
<i>uc.415</i>	KO	3,2241394	0,004724063	chr17:46663905-46664112	<i>HOXB3</i>
<i>uc.121</i>	KO	3,2228609	0,011396049	chr3:114575473-114575766	<i>ZBTB20</i>
<i>uc.443</i>	KO	3,1693799	0,018309226	chr19:8527268-8527507	<i>HNRNPM</i>
<i>uc.285</i>	KO	3,1539435	0,001032515	chr10:70515990-70516222	<i>CCAR1</i>
<i>uc.467</i>	KO	3,1479046	0,046569846	chrX:25008353-25009084	<i>POLA1</i>
<i>uc.438</i>	KO	3,1310632	0,007960211	chr18:72357873-72358114	<i>ZNF407</i>
<i>uc.353</i>	KO	3,0534543	0,046909565	chr13:72771552-72771875	Intergénico
<i>uc.104</i>	KO	3,0493104	0,005976697	chr2:174986933-174987149	<i>OLA1</i>
<i>uc.36</i>	KO	3,0440095	0,006594378	chr1:109240427-109240691	<i>PRPF38B</i>

<i>uc.407</i>	<i>KO</i>	3,0328203	0,001326594	chr16:69681154-69681480	<i>NFAT5</i>
<i>uc.129</i>	<i>KO</i>	3,0327746	0,003646694	chr3:152164386-152164598	<i>MBNL1</i>
<i>uc.463</i>	<i>KO</i>	3,0127287	0,004490041	chrX:24915881-24916156	<i>POLA1</i>

Tabla S4. ARNs circulares con expresión alterada en el modelo celular neural con supresión de MeCP2. *Fold change* delimitado en -3/3.

***circRNAs* con regulación negativa bajo condiciones de supresión de MeCP2**

ID <i>circRNA</i>	Estado de diferenciación	<i>Fold change</i> (KO/WT)	p-valor	Coordenadas	<i>Host gene</i>
<i>hsa_circRNA_000324</i>	Progenitores neurales	-3,864529	0,002216465	chr11:65211304-65211570	<i>NEAT1</i>
<i>hsa_circRNA_000482</i>	Progenitores neurales	-3,5699032	0,042035476	chr8:142264087-142264728	<i>SLC45A4</i>
<i>hsa_circRNA_001681</i>	Progenitores neurales	-3,4518601	0,019436176	chr7:22330793-22357656	<i>RAPGEF5</i>
<i>hsa_circRNA_015962</i>	Progenitores neurales	-3,274361	0,033833744	chr1:201966446-201969143	<i>RNPEP</i>
<i>hsa_circRNA_004926</i>	Progenitores neurales	-3,239797	0,026146788	chr20:61485367-61491660	<i>TCFL5</i>
<i>hsa_circRNA_001311</i>	Progenitores neurales	-3,1608342	0,028488728	chr3:53262071-53262344	<i>TKT</i>
<i>hsa_circRNA_000644</i>	Progenitores neurales	-3,1138553	0,044519746	chr18:77592249-77592394	<i>XLOC_012735</i>
<i>hsa_circRNA_103392</i>	Progenitores neurales	-3,0421645	0,04336106	chr3:53267171-53269190	<i>TKT</i>
<i>hsa_circRNA_001589</i>	30 días de diferenciación	-12,5495384	0,000158433	chr6:26234499-26234709	<i>HIST1H1D</i>
<i>hsa_circRNA_007352</i>	30 días de diferenciación	-10,1395611	0,010036061	chrX:1712336-1714425	<i>AKAP17A</i>
<i>hsa_circRNA_405665</i>	30 días de diferenciación	-9,8757263	0,003184849	chr18:18945987-18975522	<i>GREB1L</i>
<i>hsa_circRNA_100632</i>	30 días de diferenciación	-9,4310076	0,01109436	chr10:76910271-76928416	<i>SAMD8</i>
<i>hsa_circRNA_102293</i>	30 días de diferenciación	-8,4570484	0,003935653	chr18:8718421-8720494	<i>MTCL1</i>
<i>hsa_circRNA_405330</i>	30 días de diferenciación	-7,8772784	0,011052183	chr15:44060686-44061844	<i>PDIA3</i>
<i>hsa_circRNA_104052</i>	30 días de diferenciación	-7,2825302	0,035406856	chr6:4891946-4892613	<i>CDYL</i>
<i>hsa_circRNA_000324</i>	30 días de diferenciación	-6,6460082	0,000185301	chr11:65211304-65211570	<i>NEAT1</i>
<i>hsa_circRNA_001691</i>	30 días de diferenciación	-6,2079976	0,010391233	chr7:26233194-26236101	<i>HNRNPA2B1</i>
<i>hsa_circRNA_103657</i>	30 días de diferenciación	-6,0891042	0,000957205	chr4:75040222-75041120	<i>MTHFD2L</i>
<i>hsa_circRNA_403876</i>	30 días de diferenciación	-5,9323484	0,017182601	chr7:99001020-99002576	<i>PDAP1</i>
<i>hsa_circRNA_003653</i>	30 días de diferenciación	-5,8771322	0,012445266	chr18:18945987-18983955	<i>GREB1L</i>
<i>hsa_circRNA_061346</i>	30 días de diferenciación	-5,5222603	0,00995638	chr21:27372329-27425664	<i>APP</i>
<i>hsa_circRNA_092556</i>	30 días de diferenciación	-5,407058	0,018155012	chr6:26056122-26056299	<i>HIST1H1C</i>
<i>hsa_circRNA_037563</i>	30 días de diferenciación	-5,3640636	0,020718368	chr16:2807472-2810500	<i>SRRM2</i>
<i>hsa_circRNA_405746</i>	30 días de diferenciación	-5,2410139	0,020560586	chr19:16611602-16612362	<i>C19orf44</i>
<i>hsa_circRNA_100313</i>	30 días de diferenciación	-5,23419	0,022792083	chr1:117957334-117963271	<i>MAN1A2</i>

<i>hsa_circRNA_074595</i>	30 días de diferenciación	-5,0537293	0,011445677	chr5:150496687-150502572	ANXA6
<i>hsa_circRNA_007148</i>	30 días de diferenciación	-4,934698	0,030531061	chr3:171851260-171969331	FNDC3B
<i>hsa_circRNA_101504</i>	30 días de diferenciación	-4,8652908	0,013421833	chr15:44046021-44048964	PDIA3
<i>hsa_circRNA_073329</i>	30 días de diferenciación	-4,8460408	0,001398889	chr5:90059121-90074914	GPR98
<i>hsa_circRNA_089762</i>	30 días de diferenciación	-4,8294604	0,004960903	chrM:7586-7982	JA760602
<i>hsa_circRNA_074598</i>	30 días de diferenciación	-4,7949451	0,008813048	chr5:150496687-150512748	ANXA6
<i>hsa_circRNA_000120</i>	30 días de diferenciación	-4,7858395	0,014172912	chr1:117944807-118009049	MAN1A2
<i>hsa_circRNA_007593</i>	30 días de diferenciación	-4,7837363	0,015222602	chr19:19118155-19119237	SUGP2
<i>hsa_circRNA_103514</i>	30 días de diferenciación	-4,6306835	0,039096018	chr3:171965322-171969331	FNDC3B
<i>hsa_circRNA_401782</i>	30 días de diferenciación	-4,6049131	0,022143058	chr17:34144719-34149837	TAF15
<i>hsa_circRNA_000348</i>	30 días de diferenciación	-4,5645091	0,035080501	chr11:92085261-92088570	FAT3
<i>hsa_circRNA_101382</i>	30 días de diferenciación	-4,5055918	0,023383449	chr14:71428942-71445365	PCNX
<i>hsa_circRNA_005855</i>	30 días de diferenciación	-4,46791	0,004771586	chr19:16198836-16199930	TPM4
<i>hsa_circRNA_102039</i>	30 días de diferenciación	-4,4122157	0,021311721	chr17:34147027-34149837	TAF15
<i>hsa_circRNA_101654</i>	30 días de diferenciación	-4,3861	0,037908149	chr15:93557925-93558139	CHD2
<i>hsa_circRNA_405650</i>	30 días de diferenciación	-4,3712094	0,002408383	chr18:8714136-8720494	MTCL1
<i>hsa_circRNA_101002</i>	30 días de diferenciación	-4,3270328	0,01272338	chr12:6646474-6646556	GAPDH
<i>hsa_circRNA_013729</i>	30 días de diferenciación	-4,2939719	0,012360595	chr1:117910084-117957453	MAN1A2
<i>hsa_circRNA_402294</i>	30 días de diferenciación	-4,2376649	0,036036102	chr2:65466985-65482828	ACTR2
<i>hsa_circRNA_000457</i>	30 días de diferenciación	-4,2296378	0,007443543	chr12:123465675-123467085	ARL6IP4
<i>hsa_circRNA_007878</i>	30 días de diferenciación	-4,2172975	0,041851267	chr3:47956306-47960331	MAP4
<i>hsa_circRNA_103512</i>	30 días de diferenciación	-4,2113505	0,007426752	chr3:171830241-171851336	FNDC3B
<i>hsa_circRNA_104624</i>	30 días de diferenciación	-4,209548	0,014175013	chr8:52773404-52773806	PCMTD1
<i>hsa_circRNA_000897</i>	30 días de diferenciación	-4,1755562	0,00866282	chr19:13054580-13054850	CALR
<i>hsa_circRNA_102885</i>	30 días de diferenciación	-4,1326642	0,001612954	chr2:200173482-200298237	SATB2
<i>hsa_circRNA_067967</i>	30 días de diferenciación	-4,1025149	0,00922797	chr3:171758343-171851336	FNDC3B
<i>hsa_circRNA_006859</i>	30 días de diferenciación	-4,0996085	0,030819	chr5:73930508-73932323	ENC1
<i>hsa_circRNA_102468</i>	30 días de diferenciación	-4,0971965	0,00879623	chr19:16192722-16192856	TPM4
<i>hsa_circRNA_103668</i>	30 días de diferenciación	-4,082485	0,030303352	chr4:77065301-77065626	NUP54
<i>hsa_circRNA_102469</i>	30 días de diferenciación	-4,074681	0,004979463	chr19:16192722-16197350	TPM4

<i>hsa_circRNA_405718</i>	30 días de diferenciación	-4,0642321	0,010732023	chr19:4947116-4951008	<i>UHRF1</i>
<i>hsa_circRNA_103667</i>	30 días de diferenciación	-4,0346229	0,020629207	chr4:77055327-77065626	<i>NUP54</i>
<i>hsa_circRNA_401174</i>	30 días de diferenciación	-3,997288	0,002281905	chr13:94482406-94482798	<i>GPC6</i>
<i>hsa_circRNA_071106</i>	30 días de diferenciación	-3,9878319	0,003351937	chr4:148778703-148803083	<i>ARHGAP10</i>
<i>hsa_circRNA_000782</i>	30 días de diferenciación	-3,9675574	0,01984222	chr10:31661946-31750166	<i>ZEB1</i>
<i>hsa_circRNA_005087</i>	30 días de diferenciación	-3,9440946	0,031424729	chr1:27269150-27269556	<i>NUDC</i>
<i>hsa_circRNA_009618</i>	30 días de diferenciación	-3,9153546	0,020114319	chr1:8923293-8928116	<i>ENO1</i>
<i>hsa_circRNA_103515</i>	30 días de diferenciación	-3,8885255	0,020027069	chr3:171969049-172025291	<i>FNDC3B</i>
<i>hsa_circRNA_092377</i>	30 días de diferenciación	-3,8843024	0,008288817	chr1:245018859-245019265	<i>HNRNPU</i>
<i>hsa_circRNA_008636</i>	30 días de diferenciación	-3,8782605	0,019086716	chr15:67523567-67529158	<i>AAGAB</i>
<i>hsa_circRNA_077007</i>	30 días de diferenciación	-3,8780971	0,014051677	chr6:74229605-74230755	<i>EEF1A1</i>
<i>hsa_circRNA_062161</i>	30 días de diferenciación	-3,8226741	0,003883386	chr22:17978441-17979767	<i>CECR2</i>
<i>hsa_circRNA_003265</i>	30 días de diferenciación	-3,8046613	0,000849653	chr14:101403739-101415933	<i>SNORD113-5</i>
<i>hsa_circRNA_102888</i>	30 días de diferenciación	-3,7727931	0,001777852	chr2:200233327-200298237	<i>SATB2</i>
<i>hsa_circRNA_101874</i>	30 días de diferenciación	-3,7704693	0,039992592	chr16:74493579-74497377	<i>GLG1</i>
<i>hsa_circRNA_089763</i>	30 días de diferenciación	-3,7532572	0,008842201	chrM:8366-14149	<i>JA760600</i>
<i>hsa_circRNA_102638</i>	30 días de diferenciación	-3,7410021	0,027672674	chr2:20507738-20527139	<i>PUM2</i>
<i>hsa_circRNA_404013</i>	30 días de diferenciación	-3,7364969	0,040554308	chr8:37704371-37704693	<i>BRF2</i>
<i>hsa_circRNA_100505</i>	30 días de diferenciación	-3,7125144	0,011150828	chr1:243776972-244006584	<i>AKT3</i>
<i>hsa_circRNA_001387</i>	30 días de diferenciación	-3,7071595	0,013888155	chr4:1902352-1936989	<i>WHSC1</i>
<i>hsa_circRNA_103536</i>	30 días de diferenciación	-3,6898626	0,020415473	chr3:183896644-183896910	<i>AP2M1</i>
<i>hsa_circRNA_007250</i>	30 días de diferenciación	-3,6622163	0,005651105	chr2:10931920-10933328	<i>PDIA6</i>
<i>hsa_circRNA_100634</i>	30 días de diferenciación	-3,6309616	0,024722524	chr10:79613111-79614128	<i>DLG5</i>
<i>hsa_circRNA_101324</i>	30 días de diferenciación	-3,6254112	0,025010276	chr14:23791389-23792692	<i>PABPN1</i>
<i>hsa_circRNA_103584</i>	30 días de diferenciación	-3,6171796	0,024023808	chr4:1902352-1932497	<i>WHSC1</i>
<i>hsa_circRNA_000328</i>	30 días de diferenciación	-3,601775	0,03333632	chr11:65622881-65623563	<i>CFL1</i>
<i>hsa_circRNA_103382</i>	30 días de diferenciación	-3,5960343	0,027559522	chr3:50289531-50290616	<i>GNAI2</i>
<i>hsa_circRNA_103517</i>	30 días de diferenciación	-3,5917525	0,032528575	chr3:172013152-172028671	<i>FNDC3B</i>
<i>hsa_circRNA_017215</i>	30 días de diferenciación	-3,5788541	0,040497938	chr1:243242289-243265046	<i>LINC01347</i>
<i>hsa_circRNA_100015</i>	30 días de diferenciación	-3,5740342	0,020349636	chr1:1737913-1749314	<i>GNB1</i>

<i>hsa_circRNA_004649</i>	30 días de diferenciación	-3,5640249	0,028265188	chr1:243858892-244006584	<i>AKT3</i>
<i>hsa_circRNA_100014</i>	30 días de diferenciación	-3,5561443	0,043848029	chr1:1735857-1770677	<i>GNB1</i>
<i>hsa_circRNA_100467</i>	30 días de diferenciación	-3,5444363	0,01903619	chr1:225742607-225755116	<i>ENAH</i>
<i>hsa_circRNA_102942</i>	30 días de diferenciación	-3,5364448	0,03190002	chr2:232099936-232100094	<i>ARMC9</i>
<i>hsa_circRNA_401327</i>	30 días de diferenciación	-3,5327561	0,007702413	chr14:105905008-105920647	<i>MTA1</i>
<i>hsa_circRNA_000461</i>	30 días de diferenciación	-3,5272863	0,032827241	chr12:124911167-124934413	<i>NCOR2</i>
<i>hsa_circRNA_100311</i>	30 días de diferenciación	-3,5118917	0,016151427	chr1:117944807-117948267	<i>MAN1A2</i>
<i>hsa_circRNA_008771</i>	30 días de diferenciación	-3,4858943	0,037013532	chr19:1218415-1219412	<i>STK11</i>
<i>hsa_circRNA_102224</i>	30 días de diferenciación	-3,4850949	0,027867367	chr17:79555969-79564342	<i>NPLOC4</i>
<i>hsa_circRNA_100922</i>	30 días de diferenciación	-3,4787247	0,04078666	chr11:85707868-85742653	<i>PICALM</i>
<i>hsa_circRNA_038539</i>	30 días de diferenciación	-3,4774248	0,017174222	chr16:22477517-22496137	<i>SMG1P1</i>
<i>hsa_circRNA_007919</i>	30 días de diferenciación	-3,4563111	0,025858675	chr17:953289-1003975	<i>ABR</i>
<i>hsa_circRNA_103619</i>	30 días de diferenciación	-3,4452401	0,011504549	chr4:37633006-37640126	<i>RELL1</i>
<i>hsa_circRNA_092547</i>	30 días de diferenciación	-3,4343486	0,023176031	chr4:144464661-144465125	<i>SMARCA5</i>
<i>hsa_circRNA_005008</i>	30 días de diferenciación	-3,4316942	0,0133085	chr16:51680350-51680428	<i>HNRNPA1P48</i>
<i>hsa_circRNA_001937</i>	30 días de diferenciación	-3,4157994	0,032592317	chr16:53155459-53155541	<i>CHD9</i>
<i>hsa_circRNA_001802</i>	30 días de diferenciación	-3,4153566	0,028157053	chr8:52773420-52773806	<i>PCMTD1</i>
<i>hsa_circRNA_404771</i>	30 días de diferenciación	-3,4085446	0,015919857	chr10:71142242-71146174	<i>HK1</i>
<i>hsa_circRNA_023339</i>	30 días de diferenciación	-3,4058609	0,005180282	chr11:70263118-70265962	<i>CTTN</i>
<i>hsa_circRNA_100924</i>	30 días de diferenciación	-3,3936991	0,047723199	chr11:85722072-85742653	<i>PICALM</i>
<i>hsa_circRNA_006008</i>	30 días de diferenciación	-3,3732862	0,003818065	chr16:24762046-24788679	<i>TNRC6A</i>
<i>hsa_circRNA_100925</i>	30 días de diferenciación	-3,3724814	0,032107176	chr11:85723323-85742653	<i>PICALM</i>
<i>hsa_circRNA_063089</i>	30 días de diferenciación	-3,3409188	0,004057938	chr22:36680448-36702653	<i>MYH9</i>
<i>hsa_circRNA_104721</i>	30 días de diferenciación	-3,3383587	0,01886608	chr8:144922100-144922202	<i>NRBP2</i>
<i>hsa_circRNA_000615</i>	30 días de diferenciación	-3,3380246	0,023667278	chr15:64791491-64792365	<i>ZNF609</i>
<i>hsa_circRNA_005328</i>	30 días de diferenciación	-3,3296711	0,029160628	chr6:163876310-163899928	<i>QKI</i>
<i>hsa_circRNA_100926</i>	30 días de diferenciación	-3,3071775	0,031499762	chr11:85733409-85742653	<i>PICALM</i>
<i>hsa_circRNA_102452</i>	30 días de diferenciación	-3,3058022	0,008872985	chr19:11548696-11548945	<i>PRKCSH</i>
<i>hsa_circRNA_103112</i>	30 días de diferenciación	-3,3028453	0,008366687	chr21:17135209-17138460	<i>USP25</i>
<i>hsa_circRNA_055855</i>	30 días de diferenciación	-3,3012278	0,036096435	chr2:100623093-100628033	<i>AFF3</i>

<i>hsa_circRNA_104294</i>	30 días de diferenciación	-3,2833283	0,001306234	chr7:5643126-5643661	<i>FSCN1</i>
<i>hsa_circRNA_032393</i>	30 días de diferenciación	-3,2815765	0,031804693	chr14:71434914-71445365	<i>PCNX</i>
<i>hsa_circRNA_069821</i>	30 días de diferenciación	-3,2553432	0,022324579	chr4:57138486-57138658	<i>KIAA1211</i>
<i>hsa_circRNA_102231</i>	30 días de diferenciación	-3,252788	0,016965226	chr17:79813017-79813462	<i>P4HB</i>
<i>hsa_circRNA_102225</i>	30 días de diferenciación	-3,2521294	0,035490119	chr17:79555969-79575848	<i>NPLOC4</i>
<i>hsa_circRNA_007624</i>	30 días de diferenciación	-3,2449794	0,047216255	chr1:94047857-94057950	<i>BCAR3</i>
<i>hsa_circRNA_001735</i>	30 días de diferenciación	-3,2441774	0,015182202	chr7:102038066-102045130	<i>PRKRIP1</i>
<i>hsa_circRNA_100136</i>	30 días de diferenciación	-3,2425815	0,014082061	chr1:31532050-31532424	<i>PUM1</i>
<i>hsa_circRNA_087856</i>	30 días de diferenciación	-3,2373609	0,042658654	chr9:110062421-110084399	<i>RAD23B</i>
<i>hsa_circRNA_000760</i>	30 días de diferenciación	-3,2367891	0,027652958	chr17:36865777-36868169	<i>MLLT6</i>
<i>hsa_circRNA_100923</i>	30 días de diferenciación	-3,2298853	0,048585732	chr11:85718584-85742653	<i>PICALM</i>
<i>hsa_circRNA_103565</i>	30 días de diferenciación	-3,2203447	0,032710281	chr3:196842797-196846401	<i>DLG1</i>
<i>hsa_circRNA_102813</i>	30 días de diferenciación	-3,2045553	0,009237661	chr2:122363276-122363756	<i>CLASP1</i>
<i>hsa_circRNA_402113</i>	30 días de diferenciación	-3,20214	0,024742142	chr19:46324641-46327133	<i>SYMPK</i>
<i>hsa_circRNA_000286</i>	30 días de diferenciación	-3,199756	0,032296159	chr11:34101174-34111003	<i>CAPRIN1</i>
<i>hsa_circRNA_100352</i>	30 días de diferenciación	-3,199094	0,035859939	chr1:155408117-155408859	<i>ASH1L</i>
<i>hsa_circRNA_003949</i>	30 días de diferenciación	-3,188284	0,022144125	chr7:136935976-136939721	<i>PTN</i>
<i>hsa_circRNA_104706</i>	30 días de diferenciación	-3,1857728	0,039080294	chr8:141828375-141900868	<i>PTK2</i>
<i>hsa_circRNA_050900</i>	30 días de diferenciación	-3,1795801	0,03163174	chr19:39191239-39200116	<i>ACTN4</i>
<i>hsa_circRNA_000416</i>	30 días de diferenciación	-3,1728746	0,001027117	chr12:69214104-69222711	<i>MDM2</i>
<i>hsa_circRNA_103267</i>	30 días de diferenciación	-3,1675085	0,00946809	chr22:50810448-50832564	<i>PPP6R2</i>
<i>hsa_circRNA_101728</i>	30 días de diferenciación	-3,1635026	0,009852063	chr16:16345819-16346379	<i>NOMO3</i>
<i>hsa_circRNA_100927</i>	30 días de diferenciación	-3,1625042	0,033798275	chr11:85737333-85742653	<i>PICALM</i>
<i>hsa_circRNA_100919</i>	30 días de diferenciación	-3,1618794	0,040459115	chr11:85707868-85712201	<i>PICALM</i>
<i>hsa_circRNA_101790</i>	30 días de diferenciación	-3,1616246	0,015893734	chr16:29458122-29458347	<i>BOLA2</i>
<i>hsa_circRNA_104708</i>	30 días de diferenciación	-3,1524243	0,040478762	chr8:141874410-141900868	<i>PTK2</i>
<i>hsa_circRNA_103572</i>	30 días de diferenciación	-3,1385559	0,00512876	chr3:197592293-197602646	<i>LRCH3</i>
<i>hsa_circRNA_100928</i>	30 días de diferenciación	-3,1379891	0,038997329	chr11:85742510-85742653	<i>PICALM</i>
<i>hsa_circRNA_001124</i>	30 días de diferenciación	-3,1341225	0,01346537	chr2:242644067-242651486	<i>ING5</i>
<i>hsa_circRNA_103587</i>	30 días de diferenciación	-3,1334502	0,017598066	chr4:1918597-1920350	<i>WHSC1</i>

<i>hsa_circRNA_102090</i>	30 días de diferenciación	-3,1306384	0,005780974	chr17:42936447-42937911	<i>EFTUD2</i>
<i>hsa_circRNA_104566</i>	30 días de diferenciación	-3,12365	0,029063672	chr8:18656804-18662408	<i>PSD3</i>
<i>hsa_circRNA_104288</i>	30 días de diferenciación	-3,1133692	0,031298269	chr7:2402279-2402762	<i>EIF3B</i>
<i>hsa_circRNA_008702</i>	30 días de diferenciación	-3,1060672	0,046299409	chr1:1747194-1770677	<i>GNB1</i>
<i>hsa_circRNA_405582</i>	30 días de diferenciación	-3,1017082	0,025736752	chr17:40986531-40991029	<i>PSME3</i>
<i>hsa_circRNA_400780</i>	30 días de diferenciación	-3,0995436	0,049934887	chr11:68125117-68157520	<i>LRP5</i>
<i>hsa_circRNA_000758</i>	30 días de diferenciación	-3,0981854	0,032424005	chr17:34151081-34165557	<i>TAF15</i>
<i>hsa_circRNA_104730</i>	30 días de diferenciación	-3,0951984	0,030049714	chr9:4286037-4286523	<i>GLIS3</i>
<i>hsa_circRNA_102787</i>	30 días de diferenciación	-3,0850827	0,019586243	chr2:100623093-100625394	<i>AFF3</i>
<i>hsa_circRNA_040698</i>	30 días de diferenciación	-3,0827661	0,045432505	chr16:84767040-84779279	<i>USP10</i>
<i>hsa_circRNA_100016</i>	30 días de diferenciación	-3,0792396	0,046079819	chr1:1747194-1749314	<i>GNB1</i>
<i>hsa_circRNA_005255</i>	30 días de diferenciación	-3,0607799	0,045521303	chr3:48019354-48040369	<i>MAP4</i>
<i>hsa_circRNA_400275</i>	30 días de diferenciación	-3,0602539	0,002219485	chr1:82302569-82302742	<i>LPHN2</i>
<i>hsa_circRNA_401701</i>	30 días de diferenciación	-3,0567932	0,042922013	chr17:5365638-5367009	<i>DHX33</i>
<i>hsa_circRNA_101231</i>	30 días de diferenciación	-3,0562248	0,009089464	chr13:21742126-21742538	<i>SKA3</i>
<i>hsa_circRNA_104820</i>	30 días de diferenciación	-3,0545455	0,047889935	chr9:96233422-96259881	<i>FAM120A</i>
<i>hsa_circRNA_101121</i>	30 días de diferenciación	-3,0532269	0,044787086	chr12:98921663-98931350	<i>TMPO</i>
<i>hsa_circRNA_101934</i>	30 días de diferenciación	-3,0367238	0,026538855	chr17:1268152-1273035	<i>YWHAE</i>
<i>hsa_circRNA_006491</i>	30 días de diferenciación	-3,0345779	0,005571767	chr18:42281139-42281797	<i>SETBP1</i>
<i>hsa_circRNA_407262</i>	30 días de diferenciación	-3,029921	0,027194168	chrX:3735585-3747433	<i>LOC389906</i>
<i>hsa_circRNA_045775</i>	30 días de diferenciación	-3,0289211	0,038964068	chr17:74093876-74097944	<i>EXOC7</i>
<i>hsa_circRNA_104923</i>	30 días de diferenciación	-3,0239525	0,024776333	chr9:128246721-128268696	<i>MAPKAP1</i>
<i>hsa_circRNA_101505</i>	30 días de diferenciación	-3,022082	0,031938829	chr15:44048846-44055404	<i>PDIA3</i>
<i>hsa_circRNA_102747</i>	30 días de diferenciación	-3,0156321	0,030228492	chr2:65473657-65492309	<i>ACTR2</i>
<i>hsa_circRNA_092472</i>	30 días de diferenciación	-3,0155293	0,013966003	chr19:48248829-48248993	<i>GLTSCR2</i>
<i>hsa_circRNA_104821</i>	30 días de diferenciación	-3,0146002	0,041405804	chr9:96233422-96261168	<i>FAM120A</i>
<i>hsa_circRNA_102683</i>	30 días de diferenciación	-3,0139865	0,019439191	chr2:36668400-36669878	<i>CRIM1</i>
<i>hsa_circRNA_052621</i>	30 días de diferenciación	-3,0092924	0,006446546	chr2:10928822-10930959	<i>PDIA6</i>
<i>hsa_circRNA_004727</i>	30 días de diferenciación	-3,0036483	0,020286481	chr9:131882791-131885417	<i>PPP2R4</i>
<i>hsa_circRNA_040466</i>	30 días de diferenciación	-3,0034703	0,048303112	chr16:74493579-74503971	<i>GLG1</i>

<i>hsa_circRNA_101538</i>	30 días de diferenciación	-3,0034522	0,000214384	chr15:60648117-60656722	<i>ANXA2</i>
<i>hsa_circRNA_103516</i>	30 días de diferenciación	-3,0025643	0,023316272	chr3:171969049-172028671	<i>FNDC3B</i>

circRNAs con regulación positiva bajo condiciones de supresión de MeCP2

ID circRNA	Estado de diferenciación	Fold change (KO/WT)	p-valor	Coordenadas	Host gene
<i>hsa_circRNA_100900</i>	Progenitores neurales	3,4948991	0,003114595	chr11:77649696-77652297	<i>INTS4</i>
<i>hsa_circRNA_011286</i>	30 días de diferenciación	4,0337347	0,015218263	chr1:31899500-31907527	<i>SERINC2</i>
<i>hsa_circRNA_406457</i>	30 días de diferenciación	4,0013476	0,015902743	chr4:25193245-25198922	<i>SEPSECS-AS1</i>
<i>hsa_circRNA_104503</i>	30 días de diferenciación	3,908918	0,013817197	chr7:138203933-138255748	<i>TRIM24</i>
<i>hsa_circRNA_006862</i>	30 días de diferenciación	3,7494726	0,009464691	chr1:212216334-212220759	<i>DTL</i>
<i>hsa_circRNA_077877</i>	30 días de diferenciación	3,7181148	0,013028027	chr6:133135707-133138703	<i>RPS12</i>
<i>hsa_circRNA_100260</i>	30 días de diferenciación	3,6741484	0,017407614	chr1:70736538-70781249	<i>ANKRD13C</i>
<i>hsa_circRNA_100770</i>	30 días de diferenciación	3,6396469	0,010764022	chr11:22225349-22249132	<i>ANO5</i>
<i>hsa_circRNA_092366</i>	30 días de diferenciación	3,6303861	0,011891004	chr1:31994030-32006486	Intergénico
<i>hsa_circRNA_062032</i>	30 días de diferenciación	3,6290986	0,023263723	chr21:47407412-47424963	<i>COL6A1</i>
<i>hsa_circRNA_016950</i>	30 días de diferenciación	3,6275292	0,006419682	chr1:233231500-233363117	<i>PCNXL2</i>
<i>hsa_circRNA_028935</i>	30 días de diferenciación	3,6214906	0,012742753	chr12:121220457-121221555	<i>SPPL3</i>
<i>hsa_circRNA_000573</i>	30 días de diferenciación	3,6157212	0,017916335	chr14:104847269-104847527	Intergénico
<i>hsa_circRNA_102639</i>	30 días de diferenciación	3,5882793	0,011615578	chr2:20939730-20939965	<i>C2orf43</i>
<i>hsa_circRNA_039172</i>	30 días de diferenciación	3,5717486	0,015781236	chr16:31488182-31489281	<i>TGFB11</i>
<i>hsa_circRNA_101155</i>	30 días de diferenciación	3,4664988	0,005937231	chr12:112371689-112381173	<i>TMEM116</i>
<i>hsa_circRNA_001046</i>	30 días de diferenciación	3,4503114	0,013669955	chr12:46622935-46624417	<i>SLC38A1</i>
<i>hsa_circRNA_091722</i>	30 días de diferenciación	3,4188213	0,017585768	chrX:151934651-151936377	<i>MAGEA3</i>
<i>hsa_circRNA_026462</i>	30 días de diferenciación	3,4187081	0,014543779	chr12:53068519-53069224	<i>KRT1</i>
<i>hsa_circRNA_406993</i>	30 días de diferenciación	3,4101741	0,011149098	chr7:107126327-107126712	<i>COG5</i>
<i>hsa_circRNA_406295</i>	30 días de diferenciación	3,4047326	0,018073844	chr3:67718636-67721428	<i>SUCLG2-AS1</i>
<i>hsa_circRNA_075379</i>	30 días de diferenciación	3,3920201	0,012216193	chr5:180663927-180670906	<i>GNB2L1</i>
<i>hsa_circRNA_404524</i>	30 días de diferenciación	3,3847497	0,00678272	chr1:67402200-67402350	<i>MIER1</i>
<i>hsa_circRNA_405776</i>	30 días de diferenciación	3,3809945	0,015222217	chr19:37579940-37587017	<i>ZNF420</i>
<i>hsa_circRNA_400982</i>	30 días de diferenciación	3,3762074	0,016155443	chr12:63083478-63114069	<i>PPM1H</i>

<i>hsa_circRNA_406686</i>	30 días de diferenciación	3,3415855	0,014641253	chr5:141008234-141008739	<i>HDAC3</i>
<i>hsa_circRNA_101739</i>	30 días de diferenciación	3,3357488	0,012054219	chr16:19063007-19068019	<i>TMC7</i>
<i>hsa_circRNA_402437</i>	30 días de diferenciación	3,3253	0,014375892	chr2:201790558-201796171	<i>ORC2</i>
<i>hsa_circRNA_059711</i>	30 días de diferenciación	3,3116023	0,014397383	chr20:30330343-30389603	<i>TPX2</i>
<i>hsa_circRNA_101779</i>	30 días de diferenciación	3,3096317	0,013691323	chr16:27712909-27720241	<i>KIAA0556</i>
<i>hsa_circRNA_404938</i>	30 días de diferenciación	3,2942027	0,013127182	chr11:116627861-116631668	<i>BUD13</i>
<i>hsa_circRNA_003145</i>	30 días de diferenciación	3,2885951	0,010115472	chr13:108175911-108179689	<i>FAM155A</i>
<i>hsa_circRNA_103160</i>	30 días de diferenciación	3,287055	0,01371999	chr22:19462590-19463125	<i>UFD1L</i>
<i>hsa_circRNA_017969</i>	30 días de diferenciación	3,2836771	0,01867892	chr10:22856779-22862386	<i>PIP4K2A</i>
<i>hsa_circRNA_062996</i>	30 días de diferenciación	3,2727928	0,009020159	chr22:33260901-33265112	<i>SYN3</i>
<i>hsa_circRNA_405942</i>	30 días de diferenciación	3,2722448	0,018775533	chr2:109489906-109492898	<i>CCDC138</i>
<i>hsa_circRNA_000276</i>	30 días de diferenciación	3,2662955	0,014411812	chr11:5711031-5717503	<i>TRIM5</i>
<i>hsa_circRNA_406073</i>	30 días de diferenciación	3,2637535	0,01429905	chr2:242396161-242415402	<i>FARP2</i>
<i>hsa_circRNA_049851</i>	30 días de diferenciación	3,2592271	0,02288906	chr19:15939756-15946230	<i>XLOC_012981</i>
<i>hsa_circRNA_075215</i>	30 días de diferenciación	3,2507265	0,010958046	chr5:176938577-176940848	<i>DDX41</i>
<i>hsa_circRNA_084735</i>	30 días de diferenciación	3,2377315	0,015221776	chr8:71039047-71057083	<i>NCOA2</i>
<i>hsa_circRNA_000750</i>	30 días de diferenciación	3,2329602	0,013685911	chr7:132990021-133002144	<i>EXOC4</i>
<i>hsa_circRNA_407246</i>	30 días de diferenciación	3,2322391	0,019675714	chr9:131707278-131707502	<i>NUP188</i>
<i>hsa_circRNA_407311</i>	30 días de diferenciación	3,2291493	0,011378447	chrX:100169614-100170072	<i>XKRX</i>
<i>hsa_circRNA_074216</i>	30 días de diferenciación	3,2200294	0,018565041	chr5:138784244-138842320	<i>ECSCR</i>
<i>hsa_circRNA_003454</i>	30 días de diferenciación	3,2171791	0,015698175	chr15:72208710-72231268	<i>MYO9A</i>
<i>hsa_circRNA_010015</i>	30 días de diferenciación	3,2037221	0,022451078	chr1:12627938-12632881	<i>DHRS3</i>
<i>hsa_circRNA_402801</i>	30 días de diferenciación	3,1979296	0,028954982	chr3:20212215-20212724	<i>SGOL1</i>
<i>hsa_circRNA_004121</i>	30 días de diferenciación	3,1741361	0,017248253	chr2:102027080-102038934	<i>RFX8</i>
<i>hsa_circRNA_101257</i>	30 días de diferenciación	3,1736527	0,016142218	chr13:41826780-41837620	<i>MTRF1</i>
<i>hsa_circRNA_011588</i>	30 días de diferenciación	3,1653472	0,02047379	chr1:36211051-36212593	<i>CLSPN</i>
<i>hsa_circRNA_025984</i>	30 días de diferenciación	3,1552026	0,014508048	chr12:46751970-46754992	<i>SLC38A2</i>
<i>hsa_circRNA_092589</i>	30 días de diferenciación	3,1405411	0,018802767	chrX:40988349-40990765	<i>USP9X</i>
<i>hsa_circRNA_102766</i>	30 días de diferenciación	3,1371138	0,027679084	chr2:74056531-74087278	<i>STAMBP</i>
<i>hsa_circRNA_003806</i>	30 días de diferenciación	3,1343358	0,019311899	chr3:87017739-87018273	<i>VGLL3</i>

<i>hsa_circRNA_011084</i>	30 días de diferenciación	3,1274339	0,016176007	chr1:27992571-27998724	<i>IFI6</i>
<i>hsa_circRNA_405043</i>	30 días de diferenciación	3,1190551	0,018955552	chr12:95498782-95535315	<i>FGD6</i>
<i>hsa_circRNA_406780</i>	30 días de diferenciación	3,1093633	0,01529872	chr6:43193384-43194133	<i>DNP1</i>
<i>hsa_circRNA_000410</i>	30 días de diferenciación	3,1087521	0,016006527	chr5:77299605-77299759	<i>AP3B1</i>
<i>hsa_circRNA_020967</i>	30 días de diferenciación	3,1084948	0,018608802	chr11:5289579-5290906	<i>HBE1</i>
<i>hsa_circRNA_025500</i>	30 días de diferenciación	3,1055054	0,020401081	chr12:12672795-12715448	<i>DUSP16</i>
<i>hsa_circRNA_001169</i>	30 días de diferenciación	3,1042979	0,020963785	chr20:48804894-48805015	<i>CEBPB-AS1</i>
<i>hsa_circRNA_006970</i>	30 días de diferenciación	3,1008333	0,015728597	chr5:34918468-34923339	<i>BRIX1</i>
<i>hsa_circRNA_102873</i>	30 días de diferenciación	3,1006842	0,022120624	chr2:188348850-188368497	<i>TFPI</i>
<i>hsa_circRNA_405561</i>	30 días de diferenciación	3,0988606	0,029793884	chr17:29183972-29192818	<i>ATAD5</i>
<i>hsa_circRNA_000190</i>	30 días de diferenciación	3,0971643	0,013141806	chr1:224553580-224559125	<i>CNIH4</i>
<i>hsa_circRNA_102011</i>	30 días de diferenciación	3,0945951	0,019691245	chr17:26512204-26512291	<i>NLK</i>
<i>hsa_circRNA_009723</i>	30 días de diferenciación	3,0930038	0,010687104	chr1:10459084-10480201	<i>PGD</i>
<i>hsa_circRNA_000432</i>	30 días de diferenciación	3,0828267	0,01472331	chr12:102542007-102559661	<i>PARPBP</i>
<i>hsa_circRNA_024081</i>	30 días de diferenciación	3,0799753	0,01548511	chr11:95620775-95621425	<i>MTMR2</i>
<i>hsa_circRNA_407088</i>	30 días de diferenciación	3,0796834	0,000786016	chr8:72181974-72229924	<i>EYA1</i>
<i>hsa_circRNA_405140</i>	30 días de diferenciación	3,075888	0,018206833	chr13:44346195-44346638	<i>ENOX1</i>
<i>hsa_circRNA_067718</i>	30 días de diferenciación	3,0738426	0,021925003	chr3:149563797-149677923	<i>RNF13</i>
<i>hsa_circRNA_087962</i>	30 días de diferenciación	3,0690941	0,014844596	chr9:113734352-113800365	<i>LPAR1</i>
<i>hsa_circRNA_000480</i>	30 días de diferenciación	3,0666276	0,019495058	chr13:46559797-46563115	<i>ZC3H13</i>
<i>hsa_circRNA_405536</i>	30 días de diferenciación	3,0624492	0,017868428	chr17:7806826-7807115	<i>CHD3</i>
<i>hsa_circRNA_036088</i>	30 días de diferenciación	3,059269	0,009774637	chr15:69745158-69747884	<i>RPLP1</i>
<i>hsa_circRNA_400037</i>	30 días de diferenciación	3,0588685	0,01720517	chr17:74080841-74081041	<i>EXOC7</i>
<i>hsa_circRNA_102914</i>	30 días de diferenciación	3,0504058	0,026470565	chr2:217329319-217340174	<i>SMARCAL1</i>
<i>hsa_circRNA_101251</i>	30 días de diferenciación	3,0486955	0,013555092	chr13:40293372-40301685	<i>COG6</i>
<i>hsa_circRNA_058188</i>	30 días de diferenciación	3,0458124	0,016319002	chr2:217329319-217332769	<i>SMARCAL1</i>
<i>hsa_circRNA_406376</i>	30 días de diferenciación	3,0426426	0,016627514	chr3:145701394-145708714	Intergénico
<i>hsa_circRNA_406313</i>	30 días de diferenciación	3,0269211	0,014899529	chr3:100348441-100438902	<i>TFG</i>
<i>hsa_circRNA_000361</i>	30 días de diferenciación	3,0248866	0,011246243	chr3:17059499-17059748	<i>PLCL2</i>
<i>hsa_circRNA_091412</i>	30 días de diferenciación	3,023458	0,01552344	chrX:118750908-118754014	<i>SEPT6</i>

<i>hsa_circRNA_041939</i>	30 días de diferenciación	3,0227721	0,027200675	chr17:7491497-7491864	<i>SOX15</i>
<i>hsa_circRNA_100412</i>	30 días de diferenciación	3,0211761	0,015366976	chr1:179316734-179319566	<i>SOAT1</i>
<i>hsa_circRNA_405046</i>	30 días de diferenciación	3,0163714	0,013281985	chr12:97178494-97222866	<i>C12orf55</i>
<i>hsa_circRNA_038632</i>	30 días de diferenciación	3,009682	0,009262547	chr16:23691404-23701688	<i>PLK1</i>
<i>hsa_circRNA_008323</i>	30 días de diferenciación	3,0034358	0,023573372	chr22:31947382-31971378	<i>SFI1</i>

circRNAs con regulación negativa durante el proceso de diferenciación

ID circRNA	Genotipo	Fold change (30 días/progenitores neurales)	p-valor	Coordenadas	Host gene
<i>hsa_circRNA_101460</i>	WT	-7,6768939	0,022904962	chr15:22925975-22926065	<i>CYFIP1</i>
<i>hsa_circRNA_015962</i>	WT	-7,0043062	0,006603383	chr1:201966446-201969143	<i>RNPEP</i>
<i>hsa_circRNA_007940</i>	WT	-6,7954947	0,005145598	chr7:98988515-98988876	<i>ARPC1B</i>
<i>hsa_circRNA_004926</i>	WT	-4,3516109	0,012462592	chr20:61485367-61491660	<i>TCFL5</i>
<i>hsa_circRNA_404823</i>	WT	-3,2756601	0,002886009	chr10:128973475-128975403	<i>FAM196A</i>
<i>hsa_circRNA_004299</i>	WT	-3,2732926	0,00552436	chr7:98985661-98987635	<i>ARPC1B</i>
<i>hsa_circRNA_000482</i>	WT	-3,2613697	0,046143418	chr8:142264087-142264728	<i>SLC45A4</i>
<i>hsa_circRNA_001584</i>	WT	-3,2172199	0,009157024	chr6:26056274-26056412	<i>HIST1H1C</i>
<i>hsa_circRNA_001311</i>	WT	-3,2076768	0,036455259	chr3:53262071-53262344	<i>TKT</i>
<i>hsa_circRNA_006458</i>	WT	-3,0566792	0,023316677	chr20:61488746-61490878	<i>TCFL5</i>
<i>hsa_circRNA_068482</i>	WT	-3,0274068	0,024562692	chr3:186756529-186769134	<i>ST6GAL1</i>
<i>hsa_circRNA_103135</i>	WT	-3,0143832	0,017915726	chr21:42598192-42629253	<i>BACE2</i>
<i>hsa_circRNA_001589</i>	KO	-4,8293604	0,0029616	chr6:26234499-26234709	Intergénico
<i>hsa_circRNA_007940</i>	KO	-4,0885908	0,000296026	chr7:98988515-98988876	<i>ARPC1B</i>
<i>hsa_circRNA_092556</i>	KO	-3,468843	0,027771415	chr6:26056122-26056299	<i>HIST1H1C</i>
<i>hsa_circRNA_103421</i>	KO	-3,32753	0,010870075	chr3:98600383-98600611	<i>DCBLD2</i>
<i>hsa_circRNA_000496</i>	KO	-3,2028978	0,008294234	chr13:78272063-78272153	<i>SLAIN1</i>
<i>hsa_circRNA_103110</i>	KO	-3,0285102	0,022148117	chr21:16386664-16415895	<i>NRIP1</i>

circRNAs con regulación positiva durante el proceso de diferenciación

ID circRNA	Genotipo	Fold change (30 días/progenitores neurales)	p-valor	Coordenadas	Host gene
<i>hsa_circRNA_100632</i>	WT	37,793719	0,00073009	chr10:76910271-76928416	<i>SAMD8</i>
<i>hsa_circRNA_101120</i>	WT	26,6589495	0,004935423	chr12:97886238-97924637	<i>RMST</i>
<i>hsa_circRNA_104811</i>	WT	26,6362213	4,4929E-07	chr9:87356806-87367000	<i>NTRK2</i>
<i>hsa_circRNA_104721</i>	WT	23,5100648	0,003765374	chr8:144922100-144922202	<i>NRBP2</i>
<i>hsa_circRNA_102787</i>	WT	17,5819626	0,000188867	chr2:100623093-100625394	<i>AFF3</i>
<i>hsa_circRNA_405665</i>	WT	15,3136717	0,002787185	chr18:18945987-18975522	<i>GREB1L</i>
<i>hsa_circRNA_007352</i>	WT	13,6065995	0,004005373	chrX:1712336-1714425	<i>AKAP17A</i>
<i>hsa_circRNA_055855</i>	WT	13,1405516	0,000453169	chr2:100623093-100628033	<i>AFF3</i>
<i>hsa_circRNA_405746</i>	WT	12,336197	0,003503154	chr19:16611602-16612362	<i>C19orf44</i>
<i>hsa_circRNA_007148</i>	WT	12,1525833	0,003066046	chr3:171851260-171969331	<i>FNDC3B</i>
<i>hsa_circRNA_103514</i>	WT	12,0230632	0,002423691	chr3:171965322-171969331	<i>FNDC3B</i>
<i>hsa_circRNA_002082</i>	WT	11,7114288	0,025846733	chr11:65271199-65272066	<i>MALAT1</i>
<i>hsa_circRNA_000178</i>	WT	11,6572217	0,025260114	chr14:70236227-70236759	<i>SRSF5</i>
<i>hsa_circRNA_104052</i>	WT	11,4879878	0,019838984	chr6:4891946-4892613	<i>CDYL</i>
<i>hsa_circRNA_073593</i>	WT	10,4578458	9,81541E-05	chr5:112111325-112151290	<i>APC</i>
<i>hsa_circRNA_000543</i>	WT	10,1468997	0,031654007	chr11:65272490-65272586	<i>XL0C_I2_002352</i>
<i>hsa_circRNA_103517</i>	WT	9,8679429	0,005220628	chr3:172013152-172028671	<i>FNDC3B</i>
<i>hsa_circRNA_103515</i>	WT	9,7850862	0,002363823	chr3:171969049-172025291	<i>FNDC3B</i>
<i>hsa_circRNA_406550</i>	WT	9,1921479	0,006235268	chr4:151023634-151023964	<i>DCLK2</i>
<i>hsa_circRNA_103749</i>	WT	8,7530869	0,0057398	chr4:151023629-151023964	<i>DCLK2</i>
<i>hsa_circRNA_101379</i>	WT	8,7082564	0,017333119	chr14:70459133-70480208	<i>SMOC1</i>
<i>hsa_circRNA_406654</i>	WT	8,5973037	0,000582995	chr5:121726783-121739560	<i>SNCAIP</i>
<i>hsa_circRNA_005328</i>	WT	8,193781	0,013717056	chr6:163876310-163899928	<i>QKI</i>
<i>hsa_circRNA_104474</i>	WT	7,9744645	0,025607599	chr7:128282270-128289036	<i>LINC01000</i>
<i>hsa_circRNA_082178</i>	WT	7,9058058	0,028317866	chr7:128281294-128289036	<i>LINC01000</i>

<i>hsa_circRNA_007211</i>	WT	7,2267116	0,030056845	chr1:674213-678730	<i>AK310751</i>
<i>hsa_circRNA_018224</i>	WT	7,2168397	0,030509561	chr10:38724057-38734535	<i>LINC00999</i>
<i>hsa_circRNA_101654</i>	WT	7,2035447	0,016557065	chr15:93557925-93558139	<i>CHD2</i>
<i>hsa_circRNA_100504</i>	WT	7,1989425	0,006761922	chr1:243736227-244006584	<i>AKT3</i>
<i>hsa_circRNA_079926</i>	WT	7,1555566	0,030161166	chr7:39821342-39829143	<i>LINC00265</i>
<i>hsa_circRNA_100259</i>	WT	6,9667969	0,001622459	chr1:67356836-67371058	<i>WDR78</i>
<i>hsa_circRNA_005921</i>	WT	6,9000811	0,030746944	chr7:128281256-128289036	<i>LINC01000</i>
<i>hsa_circRNA_009181</i>	WT	6,8910324	0,032062809	chr1:667396-678730	<i>LOC100133331</i>
<i>hsa_circRNA_017202</i>	WT	6,8888259	0,031324524	chr1:243222779-243242354	<i>LINC01347</i>
<i>hsa_circRNA_017215</i>	WT	6,7756904	0,0306031	chr1:243242289-243265046	<i>LINC01347</i>
<i>hsa_circRNA_103657</i>	WT	6,7546427	0,010024829	chr4:75040222-75041120	<i>MTHFD2L</i>
<i>hsa_circRNA_003653</i>	WT	6,7346394	0,010671111	chr18:18945987-18983955	<i>GREB1L</i>
<i>hsa_circRNA_101380</i>	WT	6,5504807	0,006487303	chr14:70477470-70490164	<i>SMOC1</i>
<i>hsa_circRNA_100799</i>	WT	6,4966229	0,002920037	chr11:36248634-36248980	<i>LDLRAD3</i>
<i>hsa_circRNA_000348</i>	WT	6,4494776	0,018828147	chr11:92085261-92088570	<i>FAT3</i>
<i>hsa_circRNA_406400</i>	WT	6,4327571	0,002680005	chr3:178624189-178627494	Intergénico
<i>hsa_circRNA_004077</i>	WT	6,1405982	0,042816332	chr16:77850817-77859358	<i>VAT1L</i>
<i>hsa_circRNA_101550</i>	WT	6,1154927	0,024068016	chr15:63988322-64008672	<i>HERC1</i>
<i>hsa_circRNA_000541</i>	WT	6,0829255	0,000328327	chr14:56746393-56757174	<i>PELI2</i>
<i>hsa_circRNA_400294</i>	WT	5,9926022	0,011374341	chr1:103540173-103548528	<i>COL11A1</i>
<i>hsa_circRNA_005433</i>	WT	5,9856844	0,025215751	chr4:119529812-119549381	<i>LOC729218</i>
<i>hsa_circRNA_100886</i>	WT	5,652103	0,009629985	chr11:73418464-73431944	<i>RAB6A</i>
<i>hsa_circRNA_005093</i>	WT	5,6379377	0,003483334	chr3:178626309-178627494	Intergénico
<i>hsa_circRNA_004649</i>	WT	5,6193385	0,009586939	chr1:243858892-244006584	<i>AKT3</i>
<i>hsa_circRNA_007878</i>	WT	5,5048866	0,041453889	chr3:47956306-47960331	<i>MAP4</i>
<i>hsa_circRNA_029994</i>	WT	5,4651268	0,000668453	chr13:36379835-36382457	<i>DCLK1</i>
<i>hsa_circRNA_103516</i>	WT	5,4636395	0,001376768	chr3:171969049-172028671	<i>FNDC3B</i>
<i>hsa_circRNA_102460</i>	WT	5,3718258	0,048642802	chr19:13183860-13186485	<i>NFIX</i>
<i>hsa_circRNA_100505</i>	WT	5,2876942	0,02021611	chr1:243776972-244006584	<i>AKT3</i>
<i>hsa_circRNA_102762</i>	WT	5,2544152	0,011512037	chr2:72958135-72960247	<i>EXOC6B</i>

<i>hsa_circRNA_003949</i>	WT	5,171381	0,000352659	chr7:136935976-136939721	<i>PTN</i>
<i>hsa_circRNA_101382</i>	WT	5,1222039	0,017861219	chr14:71428942-71445365	<i>PCNX</i>
<i>hsa_circRNA_004079</i>	WT	5,0837768	0,018881541	chr2:230705537-230725247	<i>TRIP12</i>
<i>hsa_circRNA_104690</i>	WT	5,0427466	0,005079111	chr8:131164981-131193126	<i>ASAP1</i>
<i>hsa_circRNA_061346</i>	WT	5,0346973	0,020616301	chr21:27372329-27425664	<i>APP</i>
<i>hsa_circRNA_065768</i>	WT	4,9677409	0,016061221	chr3:50000008-50114685	<i>RBM6</i>
<i>hsa_circRNA_104729</i>	WT	4,8055424	0,00627344	chr9:4117767-4118881	<i>GLIS3</i>
<i>hsa_circRNA_403236</i>	WT	4,8049382	0,014798763	chr4:146767107-146824367	<i>ZNF827</i>
<i>hsa_circRNA_103820</i>	WT	4,7815271	0,024768838	chr5:38523520-38530768	<i>LIFR</i>
<i>hsa_circRNA_092547</i>	WT	4,7536801	0,02953866	chr4:144464661-144465125	<i>SMARCA5</i>
<i>hsa_circRNA_037563</i>	WT	4,7487053	0,047366213	chr16:2807472-2810500	<i>SRRM2</i>
<i>hsa_circRNA_006542</i>	WT	4,7318486	0,002740578	chr12:107208473-107219598	<i>RIC8B</i>
<i>hsa_circRNA_000120</i>	WT	4,7245229	0,03393907	chr1:117944807-118009049	<i>MAN1A2</i>
<i>hsa_circRNA_104596</i>	WT	4,6703084	0,002911018	chr8:38314873-38315052	<i>FGFR1</i>
<i>hsa_circRNA_100467</i>	WT	4,6417861	0,039297008	chr1:225742607-225755116	<i>ENAH</i>
<i>hsa_circRNA_401016</i>	WT	4,5763193	0,000431506	chr12:99166819-99194903	<i>ANKS1B</i>
<i>hsa_circRNA_104689</i>	WT	4,5514491	0,004675275	chr8:131164981-131181313	<i>ASAP1</i>
<i>hsa_circRNA_084010</i>	WT	4,5244485	0,00402724	chr8:38297823-38315052	<i>FGFR1</i>
<i>hsa_circRNA_005660</i>	WT	4,469925	0,018687374	chr19:13135834-13136366	<i>NFIX</i>
<i>hsa_circRNA_032393</i>	WT	4,4331286	0,015820172	chr14:71434914-71445365	<i>PCNX</i>
<i>hsa_circRNA_406216</i>	WT	4,4133315	0,017591704	chr3:4344838-4346286	<i>SUMF1</i>
<i>hsa_circRNA_076859</i>	WT	4,4101568	0,004265867	chr6:56468634-56506899	<i>DST</i>
<i>hsa_circRNA_004607</i>	WT	4,3590235	0,009556841	chr1:85816097-85824530	<i>DDAH1</i>
<i>hsa_circRNA_102761</i>	WT	4,3402431	0,001765374	chr2:72945231-72960247	<i>EXOC6B</i>
<i>hsa_circRNA_103340</i>	WT	4,3062962	0,011634293	chr3:47079155-47108608	<i>SETD2</i>
<i>hsa_circRNA_100039</i>	WT	4,2606396	0,025295526	chr1:8616533-8674745	<i>RERE</i>
<i>hsa_circRNA_101790</i>	WT	4,2463451	0,044395204	chr16:29458122-29458347	<i>BOLA2</i>
<i>hsa_circRNA_400029</i>	WT	4,2382143	0,001653743	chr16:89628179-89628539	<i>RPL13</i>
<i>hsa_circRNA_003781</i>	WT	4,2175411	0,009975613	chr21:48063446-48064400	<i>PRMT2</i>
<i>hsa_circRNA_406544</i>	WT	4,2169405	0,035093205	chr4:144464665-144465125	<i>SMARCA5</i>

<i>hsa_circRNA_103255</i>	WT	4,2108283	0,001531139	chr22:46493805-46494438	<i>MIRLET7BHG</i>
<i>hsa_circRNA_403839</i>	WT	4,1736376	0,037596938	chr7:74148264-74149874	<i>GTF2I</i>
<i>hsa_circRNA_405788</i>	WT	4,1113831	0,008626275	chr19:44128265-44131942	<i>CADM4</i>
<i>hsa_circRNA_018225</i>	WT	4,1028385	0,033052203	chr10:38726471-38734535	<i>LINC00999</i>
<i>hsa_circRNA_103512</i>	WT	4,1021648	0,010859633	chr3:171830241-171851336	<i>FNDC3B</i>
<i>hsa_circRNA_072654</i>	WT	4,0788588	0,009163272	chr5:64084777-64100213	<i>CWC27</i>
<i>hsa_circRNA_003910</i>	WT	4,0729512	0,003907112	chr3:3819408-3830758	<i>SUMF1</i>
<i>hsa_circRNA_103267</i>	WT	4,0528817	0,00460867	chr22:50810448-50832564	<i>PPP6R2</i>
<i>hsa_circRNA_067967</i>	WT	4,0155507	0,010880365	chr3:171758343-171851336	<i>FNDC3B</i>
<i>hsa_circRNA_102888</i>	WT	4,0121757	0,022125304	chr2:200233327-200298237	<i>SATB2</i>
<i>hsa_circRNA_102942</i>	WT	3,9796066	0,022122753	chr2:232099936-232100094	<i>ARMC9</i>
<i>hsa_circRNA_001772</i>	WT	3,9777531	0,001068512	chr4:2258718-2258811	<i>MXD4</i>
<i>hsa_circRNA_102885</i>	WT	3,9749345	0,017410977	chr2:200173482-200298237	<i>SATB2</i>
<i>hsa_circRNA_002387</i>	WT	3,9509296	0,002456835	chr3:170906490-170912424	<i>TNIK</i>
<i>hsa_circRNA_007019</i>	WT	3,9408282	0,001430669	chr1:240421244-240555862	<i>FMN2</i>
<i>hsa_circRNA_405815</i>	WT	3,9202789	0,000118875	chr19:57967026-57967550	<i>VN1R1</i>
<i>hsa_circRNA_104403</i>	WT	3,8953632	0,00237029	chr7:74239461-74251505	<i>GTF2IRD2</i>
<i>hsa_circRNA_406327</i>	WT	3,8878975	0,049949602	chr3:114069116-114070725	<i>ZBTB20</i>
<i>hsa_circRNA_086376</i>	WT	3,8775661	0,002860381	chr9:14146687-14179779	<i>NFIB</i>
<i>hsa_circRNA_013162</i>	WT	3,8569534	0,01555316	chr1:93029198-93073284	<i>EVI5</i>
<i>hsa_circRNA_401418</i>	WT	3,8367034	0,001040792	chr15:52876941-52885933	<i>FAM214A</i>
<i>hsa_circRNA_003265</i>	WT	3,8278694	0,000920003	chr14:101403739-101415933	<i>SNORD113-5</i>
<i>hsa_circRNA_005067</i>	WT	3,8166025	0,049240322	chr1:32381491-32385259	<i>RP11-84A19.4</i>
<i>hsa_circRNA_100884</i>	WT	3,8116683	0,027324081	chr11:73418464-73429763	<i>RAB6A</i>
<i>hsa_circRNA_007927</i>	WT	3,7949679	0,027071166	chr7:72604105-72607065	<i>GTF2IP1</i>
<i>hsa_circRNA_103758</i>	WT	3,7894632	0,036686773	chr4:151727422-151729550	<i>LRBA</i>
<i>hsa_circRNA_406590</i>	WT	3,7705013	0,000286943	chr5:15616097-15616181	<i>FBXL7</i>
<i>hsa_circRNA_007326</i>	WT	3,7511173	0,005501275	chr14:24679553-24679974	<i>CHMP4A</i>
<i>hsa_circRNA_103717</i>	WT	3,7423505	0,004722169	chr4:108614926-108622441	<i>PAPSS1</i>
<i>hsa_circRNA_101697</i>	WT	3,7233792	0,01067259	chr16:8839857-8851663	<i>ABAT</i>

<i>hsa_circRNA_102293</i>	WT	3,714074	0,048999941	chr18:8718421-8720494	<i>MTCL1</i>
<i>hsa_circRNA_405929</i>	WT	3,7111824	0,011149343	chr2:96517441-96525822	<i>ANKRD36C</i>
<i>hsa_circRNA_066845</i>	WT	3,6891075	0,04036796	chr3:114069120-114619189	<i>ZBTB20</i>
<i>hsa_circRNA_073329</i>	WT	3,6734653	0,010427369	chr5:90059121-90074914	<i>GPR98</i>
<i>hsa_circRNA_028021</i>	WT	3,6464467	0,003781694	chr12:107236366-107254190	<i>RIC8B</i>
<i>hsa_circRNA_000827</i>	WT	3,6456983	0,03446313	chr18:9204473-9211782	<i>ANKRD12</i>
<i>hsa_circRNA_040466</i>	WT	3,6436045	0,048497068	chr16:74493579-74503971	<i>GLG1</i>
<i>hsa_circRNA_002861</i>	WT	3,6381939	0,00332167	chr1:56977647-56990226	<i>PPAP2B</i>
<i>hsa_circRNA_005882</i>	WT	3,6313194	0,001869981	chr2:168920009-168986268	<i>STK39</i>
<i>hsa_circRNA_001143</i>	WT	3,6276833	0,016808049	chr3:47079055-47079155	<i>SETD2</i>
<i>hsa_circRNA_103750</i>	WT	3,6047187	0,029671056	chr4:151153488-151161628	<i>DCLK2</i>
<i>hsa_circRNA_006893</i>	WT	3,5902009	0,007188323	chr3:169831147-169840532	<i>PHC3</i>
<i>hsa_circRNA_103427</i>	WT	3,5895835	0,032266076	chr3:107429298-107435696	<i>BBX</i>
<i>hsa_circRNA_100311</i>	WT	3,5733702	0,025376054	chr1:117944807-117948267	<i>MAN1A2</i>
<i>hsa_circRNA_104222</i>	WT	3,5719919	0,023619694	chr6:151116991-151122005	<i>PLEKHG1</i>
<i>hsa_circRNA_102352</i>	WT	3,5440704	0,00404832	chr18:39595439-39609405	<i>PIK3C3</i>
<i>hsa_circRNA_092476</i>	WT	3,533038	0,000515892	chr19:57967020-57967550	<i>AC004076.9</i>
<i>hsa_circRNA_008336</i>	WT	3,5156981	0,006752407	chr7:33397466-33427756	<i>BBS9</i>
<i>hsa_circRNA_104064</i>	WT	3,5117542	0,006129032	chr6:16326624-16328701	<i>ATXN1</i>
<i>hsa_circRNA_050146</i>	WT	3,5018957	0,03179164	chr19:18860590-18864395	<i>CRTC1</i>
<i>hsa_circRNA_001123</i>	WT	3,4991593	0,000789834	chr2:61340904-61345251	<i>KIAA1841</i>
<i>hsa_circRNA_012133</i>	WT	3,4919474	0,00085234	chr1:44467984-44468657	<i>SLC6A9</i>
<i>hsa_circRNA_405992</i>	WT	3,482709	0,001777554	chr2:171879381-171902872	<i>TLK1</i>
<i>hsa_circRNA_102985</i>	WT	3,4716988	0,018588876	chr20:2967410-2969120	<i>PTPRA</i>
<i>hsa_circRNA_104401</i>	WT	3,4542553	0,031816411	chr7:74119495-74133260	<i>GTF2I</i>
<i>hsa_circRNA_090986</i>	WT	3,4500834	0,006719625	chrX:70368695-70387650	<i>NLGN3</i>
<i>hsa_circRNA_000615</i>	WT	3,4052782	0,048589092	chr15:64791491-64792365	<i>ZNF609</i>
<i>hsa_circRNA_104804</i>	WT	3,4009673	0,047215511	chr9:86292641-86293514	<i>UBQLN1</i>
<i>hsa_circRNA_004052</i>	WT	3,3968362	0,001216145	chr20:43545396-43547918	<i>PABPC1L</i>
<i>hsa_circRNA_103618</i>	WT	3,3942075	0,039968374	chr4:36230203-36231267	<i>ARAP2</i>

<i>hsa_circRNA_104565</i>	WT	3,3863746	0,03250643	chr8:18622958-18662408	<i>PSD3</i>
<i>hsa_circRNA_100016</i>	WT	3,3779461	0,041329145	chr1:1747194-1749314	<i>GNB1</i>
<i>hsa_circRNA_002487</i>	WT	3,3770153	0,014891692	chr10:34620044-34649187	<i>PARD3</i>
<i>hsa_circRNA_400322</i>	WT	3,3671309	0,010379933	chr1:151849476-151860859	<i>THEM4</i>
<i>hsa_circRNA_104424</i>	WT	3,3477597	0,006501713	chr7:90585011-90613556	<i>CDK14</i>
<i>hsa_circRNA_401988</i>	WT	3,3384962	0,017126342	chr18:60497267-60497464	<i>PHLPP1</i>
<i>hsa_circRNA_101319</i>	WT	3,3271629	0,04784364	chr14:23378691-23380612	<i>RBM23</i>
<i>hsa_circRNA_103069</i>	WT	3,3214004	0,000854079	chr20:43547546-43547918	<i>PABPC1L</i>
<i>hsa_circRNA_002576</i>	WT	3,307123	0,000316905	chr8:90736856-90737869	<i>LOC101929709</i>
<i>hsa_circRNA_403893</i>	WT	3,2960121	0,017807161	chr7:104702610-104722244	<i>KMT2E</i>
<i>hsa_circRNA_104402</i>	WT	3,2902389	0,002391046	chr7:74239461-74248066	<i>GTF2IRD2</i>
<i>hsa_circRNA_103477</i>	WT	3,2775775	0,000597282	chr3:134670212-134670894	<i>EPHB1</i>
<i>hsa_circRNA_100669</i>	WT	3,2654759	0,043638011	chr10:103558598-103567658	<i>MGEA5</i>
<i>hsa_circRNA_404974</i>	WT	3,2589784	0,008160856	chr12:23998916-24048958	<i>SOX5</i>
<i>hsa_circRNA_102158</i>	WT	3,2582047	0,007560015	chr17:60629662-60631116	<i>TLK2</i>
<i>hsa_circRNA_100631</i>	WT	3,2070415	0,026745729	chr10:76910271-76910864	<i>SAMD8</i>
<i>hsa_circRNA_100501</i>	WT	3,2039506	0,000601992	chr1:240341220-240351562	<i>FMN2</i>
<i>hsa_circRNA_103799</i>	WT	3,2036018	0,048653	chr5:14330886-14336836	<i>TRIO</i>
<i>hsa_circRNA_005280</i>	WT	3,1976291	0,000286097	chr2:168869143-168931741	<i>STK39</i>
<i>hsa_circRNA_092573</i>	WT	3,1908408	0,020562808	chr7:131071878-131073731	<i>MKLN1</i>
<i>hsa_circRNA_104400</i>	WT	3,1861976	0,023838245	chr7:74119495-74131270	<i>GTF2I</i>
<i>hsa_circRNA_101427</i>	WT	3,1832178	0,006472015	chr14:91947919-91952074	<i>SMEK1</i>
<i>hsa_circRNA_101083</i>	WT	3,1777481	0,022995403	chr12:56962758-56965639	<i>RBMS2</i>
<i>hsa_circRNA_100913</i>	WT	3,1768141	0,03683808	chr11:85692171-85707972	<i>PICALM</i>
<i>hsa_circRNA_401351</i>	WT	3,1652888	0,008311046	chr15:25328542-25339121	<i>SNURF-SNRPN</i>
<i>hsa_circRNA_102706</i>	WT	3,1640838	0,003434959	chr2:42946127-42950175	<i>MTA3</i>
<i>hsa_circRNA_066568</i>	WT	3,1626131	0,047232508	chr3:78763546-78767033	<i>ROBO1</i>
<i>hsa_circRNA_404687</i>	WT	3,158913	0,011956344	chr1:236332005-236347206	<i>GPR137B</i>
<i>hsa_circRNA_100295</i>	WT	3,1525679	0,039768169	chr1:109910029-109912211	<i>SORT1</i>
<i>hsa_circRNA_402002</i>	WT	3,1516021	0,007790768	chr19:1270926-1274439	<i>CIRBP</i>

<i>hsa_circRNA_079265</i>	WT	3,1450037	0,023756579	chr7:5566778-5569031	<i>ACTB</i>
<i>hsa_circRNA_008882</i>	WT	3,1284419	0,011387517	chrM:13418-13499	<i>MTND5</i>
<i>hsa_circRNA_102295</i>	WT	3,1268711	0,016865167	chr18:9204473-9221997	<i>ANKRD12</i>
<i>hsa_circRNA_103168</i>	WT	3,0903919	0,027438816	chr22:22024201-22029404	<i>PPIL2</i>
<i>hsa_circRNA_100485</i>	WT	3,0894582	0,028924662	chr1:233296028-233344435	<i>PCNXL2</i>
<i>hsa_circRNA_100097</i>	WT	3,0890934	0,047108732	chr1:23356961-23377013	<i>KDM1A</i>
<i>hsa_circRNA_104442</i>	WT	3,0883634	0,001231849	chr7:101870646-101870949	<i>CUX1</i>
<i>hsa_circRNA_103795</i>	WT	3,0795557	0,039619814	chr5:14293120-14336836	<i>TRIO</i>
<i>hsa_circRNA_100038</i>	WT	3,071673	0,030209118	chr1:8601272-8674745	<i>RERE</i>
<i>hsa_circRNA_102773</i>	WT	3,0671915	0,003419383	chr2:85595808-85598685	<i>ELMOD3</i>
<i>hsa_circRNA_070616</i>	WT	3,0650535	0,004185994	chr4:108608194-108622441	<i>PAPSS1</i>
<i>hsa_circRNA_007290</i>	WT	3,0630199	0,039303367	chrX:44383247-44386611	<i>FUNDC1</i>
<i>hsa_circRNA_102184</i>	WT	3,0557754	0,035165741	chr17:65924470-65928135	<i>BPTF</i>
<i>hsa_circRNA_001722</i>	WT	3,0498282	0,005761624	chr7:90376995-90419967	<i>CDK14</i>
<i>hsa_circRNA_401174</i>	WT	3,0451777	0,004483359	chr13:94482406-94482798	<i>GPC6</i>
<i>hsa_circRNA_404686</i>	WT	3,0411165	0,010640652	chr1:236332005-236343328	<i>GPR137B</i>
<i>hsa_circRNA_102987</i>	WT	3,0391087	0,02452275	chr20:3274784-3275275	<i>C20orf194</i>
<i>hsa_circRNA_051799</i>	WT	3,0361954	0,007559365	chr19:49458943-49464519	<i>BAX</i>
<i>hsa_circRNA_101245</i>	WT	3,0333421	0,018799045	chr13:33091993-33101669	<i>N4BP2L2</i>
<i>hsa_circRNA_104406</i>	WT	3,0198879	0,000966088	chr7:74524751-74528329	<i>GTF2IRD2</i>
<i>hsa_circRNA_092377</i>	WT	3,0170542	0,004901614	chr1:245018859-245019265	<i>HNRNPU</i>
<i>hsa_circRNA_405301</i>	WT	3,0116473	0,024494796	chr15:30058468-30064369	<i>TJP1</i>
<i>hsa_circRNA_104032</i>	WT	3,0089302	0,044351668	chr5:179146668-179146782	<i>CANX</i>
<i>hsa_circRNA_078353</i>	WT	3,007441	0,032357077	chr6:155054511-155116273	<i>SCAF8</i>
<i>hsa_circRNA_002164</i>	WT	3,0060919	0,032962025	chr18:23632587-23658124	<i>SS18</i>
<i>hsa_circRNA_401539</i>	WT	3,0004957	0,021650172	chr16:15029016-15029254	<i>NP1P</i>
<i>hsa_circRNA_104811</i>	KO	17,95191	0,001083538	chr9:87356806-87367000	<i>NTRK2</i>
<i>hsa_circRNA_101120</i>	KO	17,4300048	0,000973148	chr12:97886238-97924637	<i>RMST</i>
<i>hsa_circRNA_000543</i>	KO	12,8882922	0,006210701	chr11:65272490-65272586	<i>XLOC_I2_002352</i>
<i>hsa_circRNA_002082</i>	KO	12,7912414	0,012368807	chr11:65271199-65272066	<i>MALAT1</i>

<i>hsa_circRNA_101379</i>	KO	8,8652769	0,015885402	chr14:70459133-70480208	<i>SMOC1</i>
<i>hsa_circRNA_000178</i>	KO	8,0666607	0,000337965	chr14:70236227-70236759	<i>SRSF5</i>
<i>hsa_circRNA_104721</i>	KO	7,8337511	0,002034984	chr8:144922100-144922202	<i>NRBP2</i>
<i>hsa_circRNA_073593</i>	KO	6,8171846	0,003684905	chr5:112111325-112151290	<i>APC</i>
<i>hsa_circRNA_102787</i>	KO	5,9601665	0,002866211	chr2:100623093-100625394	<i>AFF3</i>
<i>hsa_circRNA_101380</i>	KO	5,5731195	0,016565213	chr14:70477470-70490164	<i>SMOC1</i>
<i>hsa_circRNA_100259</i>	KO	5,4892151	0,019038177	chr1:67356836-67371058	<i>WDR78</i>
<i>hsa_circRNA_406654</i>	KO	5,0473904	0,001455034	chr5:121726783-121739560	<i>SNCAIP</i>
<i>hsa_circRNA_103829</i>	KO	4,6868586	0,041251927	chr5:43294157-43297268	<i>HMGCS1</i>
<i>hsa_circRNA_104474</i>	KO	4,5339709	0,015998099	chr7:128282270-128289036	<i>LINC01000</i>
<i>hsa_circRNA_082178</i>	KO	4,4737291	0,016328926	chr7:128281294-128289036	<i>LINC01000</i>
<i>hsa_circRNA_101550</i>	KO	4,4681449	0,02031781	chr15:63988322-64008672	<i>HERC1</i>
<i>hsa_circRNA_007211</i>	KO	4,4677807	0,018495765	chr1:674213-678730	<i>AK310751</i>
<i>hsa_circRNA_079926</i>	KO	4,3787159	0,020463341	chr7:39821342-39829143	<i>LINC00265</i>
<i>hsa_circRNA_018224</i>	KO	4,2582094	0,016243457	chr10:38724057-38734535	<i>LINC00999</i>
<i>hsa_circRNA_006542</i>	KO	4,2282817	0,005080792	chr12:107208473-107219598	<i>RIC8B</i>
<i>hsa_circRNA_005921</i>	KO	4,132822	0,018869405	chr7:128281256-128289036	<i>LINC01000</i>
<i>hsa_circRNA_009181</i>	KO	4,1249265	0,017269288	chr1:667396-678730	<i>LOC100133331</i>
<i>hsa_circRNA_017202</i>	KO	4,1153156	0,019705658	chr1:243222779-243242354	<i>LINC01347</i>
<i>hsa_circRNA_103758</i>	KO	4,0127649	0,026696268	chr4:151727422-151729550	<i>LRBA</i>
<i>hsa_circRNA_103749</i>	KO	3,9669494	0,010719896	chr4:151023629-151023964	<i>DCLK2</i>
<i>hsa_circRNA_406550</i>	KO	3,948897	0,01230785	chr4:151023634-151023964	<i>DCLK2</i>
<i>hsa_circRNA_100504</i>	KO	3,9269403	0,00638748	chr1:243736227-244006584	<i>AKT3</i>
<i>hsa_circRNA_055855</i>	KO	3,7360134	0,015254701	chr2:100623093-100628033	<i>AFF3</i>
<i>hsa_circRNA_103831</i>	KO	3,7197112	0,043770504	chr5:43295853-43297268	<i>HMGCS1</i>
<i>hsa_circRNA_017215</i>	KO	3,7179804	0,01946135	chr1:243242289-243265046	<i>LINC01347</i>
<i>hsa_circRNA_103820</i>	KO	3,6643879	0,008168808	chr5:38523520-38530768	<i>LIFR</i>
<i>hsa_circRNA_103517</i>	KO	3,6338291	0,016554922	chr3:172013152-172028671	<i>FNDC3B</i>
<i>hsa_circRNA_086376</i>	KO	3,6187304	0,018773098	chr9:14146687-14179779	<i>NFIB</i>
<i>hsa_circRNA_103757</i>	KO	3,5660015	0,010014982	chr4:151719232-151738409	<i>LRBA</i>

<i>hsa_circRNA_400633</i>	KO	3,4962066	0,029667966	chr10:102114183-102114389	<i>SCD</i>
<i>hsa_circRNA_103756</i>	KO	3,4789839	0,007340311	chr4:151719232-151729550	<i>LRBA</i>
<i>hsa_circRNA_012133</i>	KO	3,4487251	0,004627391	chr1:44467984-44468657	<i>SLC6A9</i>
<i>hsa_circRNA_000541</i>	KO	3,4236708	0,003221522	chr14:56746393-56757174	<i>PELI2</i>
<i>hsa_circRNA_100141</i>	KO	3,3958208	0,031757548	chr1:32381495-32385259	<i>PTP4A2</i>
<i>hsa_circRNA_005328</i>	KO	3,3607623	0,022914109	chr6:163876310-163899928	<i>QKI</i>
<i>hsa_circRNA_102762</i>	KO	3,3591266	0,020293689	chr2:72958135-72960247	<i>EXOC6B</i>
<i>hsa_circRNA_104131</i>	KO	3,2922826	0,000291638	chr6:69703659-69785930	<i>BAI3</i>
<i>hsa_circRNA_005067</i>	KO	3,2853179	0,036802089	chr1:32381491-32385259	<i>RP11-84A19.4</i>
<i>hsa_circRNA_101996</i>	KO	3,2522162	0,033523691	chr17:20107645-20109225	<i>SPECC1</i>
<i>hsa_circRNA_103750</i>	KO	3,2192116	0,000131399	chr4:151153488-151161628	<i>DCLK2</i>
<i>hsa_circRNA_104980</i>	KO	3,1953304	0,029579396	chrX:10031484-10066619	<i>WWC3</i>
<i>hsa_circRNA_007019</i>	KO	3,1942123	0,015768233	chr1:240421244-240555862	<i>FMN2</i>
<i>hsa_circRNA_028021</i>	KO	3,19119	0,024585836	chr12:107236366-107254190	<i>RIC8B</i>
<i>hsa_circRNA_065768</i>	KO	3,1641177	0,001479529	chr3:50000008-50114685	<i>RBM6</i>
<i>hsa_circRNA_005433</i>	KO	3,0950669	0,035638368	chr4:119529812-119549381	<i>LOC729218</i>
<i>hsa_circRNA_103515</i>	KO	3,0818709	0,006800124	chr3:171969049-172025291	<i>FNDC3B</i>
<i>hsa_circRNA_100258</i>	KO	3,0758885	0,021883148	chr1:66378927-66384518	<i>PDE4B</i>
<i>hsa_circRNA_038288</i>	KO	3,052721	0,014697585	chr16:18877942-18882804	<i>SMG1</i>
<i>hsa_circRNA_103168</i>	KO	3,0380122	0,019659838	chr22:22024201-22029404	<i>PPIL2</i>
<i>hsa_circRNA_103754</i>	KO	3,0296775	0,011107372	chr4:151656409-151729550	<i>LRBA</i>
<i>hsa_circRNA_103755</i>	KO	3,019471	0,026847067	chr4:151682934-151729550	<i>LRBA</i>
<i>hsa_circRNA_103477</i>	KO	3,0004196	0,005728706	chr3:134670212-134670894	<i>EPHB1</i>

Tabla S5. circRNAs candidatos seleccionados para el estudio en el modelo celular neural humano

ID circRNA	Comparación	Tipo de regulación	Fold change	p-valor	Coordenadas	Host gene
<i>hsa_circRNA_104517</i>	Proceso de diferenciación <i>WT</i>	negativa	-2,1223943	0,026020849	chr7:148543561-148544397	<i>EZH2</i>
	Proceso de diferenciación <i>KO</i>	negativa	-2,3616353	0,017805765		
<i>hsa_circRNA_101396</i>	Células diferenciadas <i>KO vs WT</i>	positiva	2,2586726	0,019234452	chr14:73614502-73664837	<i>PSEN1</i>
	Proceso de diferenciación <i>WT</i>	negativa	-2,0498239	0,032518767		
<i>hsa_circRNA_047733</i>	Células diferenciadas <i>KO vs WT</i>	positiva	2,6455408	0,014270022	chr18:53017589-53018231	<i>TCF4</i>
<i>hsa_circRNA_005147</i>	Células diferenciadas <i>KO vs WT</i>	negativa	-2,202334	0,021995784	chr15:25650607-25660989	<i>UBE3A</i>
<i>hsa_circRNA_100098</i>	Células diferenciadas <i>KO vs WT</i>	negativa	-2,3215737	0,024132189	chr1:23356961-23385660	<i>KDM1A</i>
<i>hsa_circRNA_016598</i>	Células diferenciadas <i>KO vs WT</i>	positiva	2,3899167	0,019271864	chr1:224918163-224918276	<i>CNIH3</i>
	Proceso de diferenciación <i>WT</i>	negativa	-2,7463217	0,007367609		

