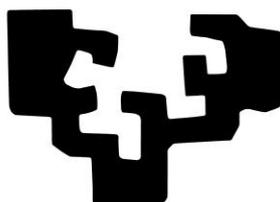


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Farmacología

Programa de Doctorado de Farmacología

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE microRNAs Y SU  
MODULACIÓN COMO POTENCIAL DIANA  
TERAPÉUTICA EN LA RETINOSIS PIGMENTARIA**

AUTOR:

Ander Anasagasti Viteri

Licenciado en Farmacia

DIRECTOR:

Dr. Javier Ruiz Ederra

Donostia, 2018



*Aita ta amari, Maialeni eta Garaziri.*

*Erretinosia daukaten guztiei.*



Quisiera agradecer a las siguientes instituciones la concesión de las ayudas/proyectos de investigación otorgadas, las cuales han permitido la realización de este trabajo de investigación:

Ayudas personales:

- Fundación Jesús de Gangoiti Barrera: Beca para estudios e investigación para titulados superiores (BIOD13/009). Búsqueda de mutaciones causantes de retinosis pigmentaria en los pacientes de Gipuzkoa.
- Gobierno Vasco, Dpto. de Educación: Ayudas a la Formación de Personal Investigador No Doctor (DEPLC13/002). Estudio de los microRNAs y su modulación como potencial diana terapéutica en la retinosis pigmentaria.

Proyectos de investigación:

- Gobierno Vasco, Dpto. Industria (SAIO12-PC12BN001): Proyecto. Expresión de Acuaporina-1 en el cristalino de pacientes con cataratas.
- Instituto de Salud Carlos III/Ministerio de Economía y competitividad (PI13/02621): Estudio de los microRNAs en pacientes y en modelos murinos de retinosis pigmentaria. Nuevas dianas terapéuticas.
- Fundación Mutua Madrileña: Caracterización genético-molecular de los pacientes de retinosis pigmentaria de la C.A. de Euskadi mediante un nuevo método basado en el secuenciado masivo de última generación.
- BEGISARE-Gipuzkoa: Asociación de enfermos de retinosis pigmentaria de Gipuzkoa.



Durante la realización de la presente tesis doctoral han sido publicados los siguientes artículos científicos:

- **Ander Anasagasti**; Maitane Ezquerria Inchausti; Olatz Barandika Fernández; Maider Muñoz Culla; Adolfo López de Munain; David Otaegui Bichot; Javier Ruiz Ederra. Expression profiling analysis reveals key microRNA-mRNA interactions in early retinal degeneration in retinitis pigmentosa. (aceptado IOVS, 2018).
- Maitane Ezquerria Inchausti; **Ander Anasagasti**; Olatz Barandika Fernández; Gonzaga Garai-Aramburu, Marta Galdós, Adolfo López de Munain, Cristina Irigoyen, Javier Ruiz-Ederra. A new approach based on targeted pooled DNA sequencing identifies novel mutations in patients with Inherited Retinal Dystrophies. Sci Reports (en revisión, 2018).
- Maitane Ezquerria Inchausti; Olatz Barandika Fernández; **Ander Anasagasti**; Cristina Irigoyen Laborra; Adolfo López de Munain; Javier Ruiz Ederra. High prevalence of mutations affecting the splicing process in a Spanish cohort with autosomal dominant retinitis pigmentosa. Scientific reports. doi:10.1038/srep3965, Nature Publishing Group, 03/01/2017.
- Olatz Barandika Fernández; Maitane Ezquerria Inchausti; **Ander Anasagasti**; Ainara Vallejo Illarramendi; Lucia Bascarán; Txomin Alberdi; Javier Mendicute del Barrio; Giacomo de Benedetti; Javier Ruiz Ederra. Increased aquaporin 1 and 5 membrane expression in the lens epithelium of cataract patients. Biochim Biophys Acta. 1862 - 10, pp. 2015 - 2021. Elsevier Pub. Co., 01/10/2016.
- Olatz Barandika Fernández; Cristina Irigoyen Laborra; **Ander Anasagasti**; Garazi Egiguren Urkola; Maitane Ezquerria Inchausti; Adolfo López de Munain; Javier Ruiz Ederra. A Cost-effective Mutation Screening strategy for Inherited Retinal Dystrophies. Ophthalmic research. 56 - 3, pp. 123 - 131. Basel, New York, Karger, 05/05/2016.
- **Ander Anasagasti**; Olatz Barandika Fernández; Cristina Irigoyen Laborra; Bruno Benitez; Breanna Cooper; Carlos Cruchaga; Adolfo López de Munain; Javier Ruiz Ederra. Genetic high throughput screening in Retinitis Pigmentosa based on high resolution melting (HRM) analysis. Experimental eye research. 116, pp. 386 - 394. London: Academic Press, 01/11/2013.
- **Ander Anasagasti**; Olatz Barandika Fernández; Adolfo López de Munain; Javier Ruiz Ederra. Current Mutation Discovery Approaches in Retinitis Pigmentosa. Vision Research. 15 - 75, pp. 117 - 129. Elsevier Science Ltd., 15/12/2012.



## **ÍNDICE DE CONTENIDOS**



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	7
CLAVE DE ABREVIATURAS.....	13
RESUMEN.....	17
INTRODUCCIÓN.....	21
<b>1. El ojo humano.....</b>	<b>21</b>
<b>2. La retina .....</b>	<b>23</b>
<b>3. La fototransducción .....</b>	<b>31</b>
<b>4. Enfermedades hereditarias degenerativas de la retina (EHDR) .....</b>	<b>36</b>
<b>5. MicroRNAs.....</b>	<b>59</b>
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
<b>Hipótesis .....</b>	<b>69</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>69</b>
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
<b>1. Animales y Declaración Ética .....</b>	<b>73</b>
<b>2. Obtención de muestras .....</b>	<b>74</b>
<b>3. Estudio del comienzo y evolución de la muerte celular de los fotorreceptores en retinas de ratones rd10.....</b>	<b>76</b>
<b>4. Cultivos primarios de fotorreceptores.....</b>	<b>77</b>
<b>5. Estudios de la riqueza de fotorreceptores en cultivos primarios .....</b>	<b>78</b>
<b>6. Perfil global de expresión de miRNAs y mRNAs .....</b>	<b>79</b>
<b>7. Predicción de dianas genéticas para miRNAs.....</b>	<b>82</b>
<b>8. Análisis de las redes de interacción miRNA-mRNA .....</b>	<b>82</b>
<b>9. Estudios de ontología genética (GO) y análisis de enriquecimiento de rutas biológicas.....</b>	<b>83</b>
<b>10. Validación de expresión de miRNAs y mRNAs mediante qPCR .....</b>	<b>83</b>
<b>11. Transformación en bacterias competentes y amplificación de los plásmidos moduladores de miRNAs.....</b>	<b>88</b>

12. Generación lentivirus (LV) con moduladores de miRNAs.....	94
13. Generación virus adeno-asociados (AAVs) con moduladores de miRNAs.....	97
14. Inyecciones sub-retinianas .....	101
15. Registros electroretinográficos (ERGs) .....	103
16. Análisis histológicos de la modulación <i>in vivo</i> de los miRNAs.....	106
17. Análisis del transcriptoma con los arrays Clariom™ S de Affymetrix .....	107
18. Puesta a punto de las infecciones/transfecciones <i>in vitro</i> en células MU-PH1. .....	108
20. Aumento expresión miR-6937-5p <i>in vitro</i> y estudio de viabilidad celular y citotoxicidad .....	111
21. Análisis estadísticos.....	113
RESULTADOS .....	117
1. Estudio del comienzo y evolución de la muerte celular de los fotorreceptores en retinas de ratones rd10.....	117
2. Estudio de riqueza de células fotorreceptoras en cultivos primarios .....	118
3. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para RP basadas en miRNAs.....	119
4. Modulación <i>in vivo</i> de miRNAs en ratones rd10 y evaluación funcional de dicha modulación. ....	143
5. Modulación <i>in vitro</i> de miRNAs en cultivos celulares y evaluación de dicha modulación. ....	161
DISCUSIÓN.....	169
CONCLUSIONES.....	195
REFERENCIAS .....	199
ANEXOS.....	215

## **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

Figura 1. Esquema del globo ocular .....	21
Figura 2. Esquema de las principales capas y tipos celulares de la retina.....	24
Figura 3. Histología de una retina normal de humano. ....	26
Figura 4. El espectro electromagnético completo .....	27
Figura 5. Densidad de conos y bastones a lo largo de la retina humana. ....	28
Figura 6. Morfología básica de los fotorreceptores.....	29
Figura 7. Flujo iónico en los fotorreceptores.....	32
Figura 8. Localización y composición de la rodopsina y el cromóforo retinal .....	33
Figura 9. Cambio conformacional del cromóforo retinal al absorber la luz la rodopsina. .....	34
Figura 10. Cascada de la fototransducción.....	35
Figura 11. Aspecto histológico de la retina humana sana (izquierda) y de la retina de un paciente con RP en una etapa media de la enfermedad.....	38
Figura 12. Prevalencia de genes de casos de RP autosómica dominante.....	41
Figura 13. Prevalencia de genes de los casos de RP autosómica recesiva. ....	41
Figura 14. Comparativa visión normal y visión de paciente con RP. ....	44
Figura 15. Mecanismos de la biogénesis de los microRNA y regulación de la expresión génica.....	61
Figura 16. Diferencias en el mecanismo de regulación génica en base al grado de complementariedad entre los miRNAs maduros y sus mRNA diana.....	62
Figura 17. Metodología para obtención de muestras para los estudios de expresión global de miRNA y mRNA. ....	80
Figura 18. Cálculo de la curva estándar a partir de los Cqs obtenidos en la qPCR y de las concentraciones conocidas de las muestras de la dilución seriada. ....	85
Figura 19. Mapa de los plásmidos moduladores de miRNAs adquiridos en GeneCopoeia. ....	89
Figura 20. Esquema del sistema de inhibición de las moléculas miArrest™ miRNA Inhibitors.....	90
Figura 21. Esquema del sistema de precursores de las moléculas miExpress™ Precursor miRNA Expression.....	91
Figura 22. Resumen de los pasos en el proceso de transformación y amplificación de ADN plasmídico. ....	93
Figura 23. Mapas de los vectores empaquetadores pMDLg-pRRE, pRSV-REV y pCMV-VSV-G .....	96
Figura 24. Dos ejemplos de mapas definitivos de los plásmidos .....	99
Figura 25. Metodología inyecciones sub-retinianas .....	102
Figura 26. Ejemplo de registro ERG. ....	103
Figura 27. Instrumentación utilizada en los registros Electrorretinográficos (ERGs) .	105
Figura 28. Esquema de la metodología utilizada para el estudio del grosor del ONL y del número de filas de fotorreceptores. ....	107

Figura 29. Reacción ensayo de citotoxicidad .....	112
Figura 30. Muerte de las células fotorreceptoras en la retina del ratón rd10 detectada por TUNEL. ....	117
Figura 31. Detección de células apoptóticas mediante TUNEL en ratones rd10 .....	118
Figura 32. Estudio riqueza en fotorreceptores de cultivos primarios .....	119
Figura 33. Expresión relativa de cuatro miR .....	126
Figura 34. Expresión relativa de cuatro miRNAs del grupo-B medida por qPCR.....	127
Figura 35. Niveles de expresión de miRNAs en retinas de ratón rd10 .....	129
Figura 36. Expresión medida por qPCR de un grupo de miRNAs en fotorreceptores aislados (gris oscuro) comparado con la expresión en el pellet celular (gris claro) de las mismas retinas. ....	130
Figura 37. Redes de interacción miRNA-mRNA .....	136
Figura 38. Estudios con ClueGO de rutas biológicas y términos GO correspondientes a los mRNAs con expresión inversa del grupo-A .....	139
Figura 39. Expresión relativa medida por qPCR de dos genes sobre-expresados, <i>Serpina3n</i> y <i>Osmr</i> inversamente expresados con el miR-20b-5p .....	142
Figura 40. Expresión relativa de dos genes infra-expresados, <i>Nxn12</i> y <i>Rgr</i> , medida por qPCR.....	142
Figura 41. Expresión de mCherry (rojo) mediada por inyecciones sub-retinianas con solución ssAAV-KAnc80.....	144
Figura 42. Expresión de eGFP (verde) mediada por inyecciones sub-retinianas con solución ssAAV-KAnc80. ....	145
Figura 43. Área de la retina infectada con inyecciones SR de AAVs.....	146
Figura 44. Los ERGs muestran una mejora significativa de la capacidad visual en los ojos tratados con inhibidores de miR-6937-5p en comparación con los controles. ....	148
Figura 45. Los ERGs no muestran una mejora significativa de la capacidad visual en los ojos tratados con precursores de miR-142a-5p en comparación con los controles. ....	149
Figura 46. Los ERGs no muestran una mejora significativa de la capacidad visual en los ojos tratados con inhibidores de miR-6240 en comparación con los controles.....	150
Figura 47. Secciones de retina de ratones rd10 con diferentes soluciones moduladoras de miRNAs analizadas el día 22 posnatal. ....	152
Figura 48. Gráfica de barras del número de filas de fotorreceptores (arriba) y del grosor de la capa de fotorreceptores (ONL) (abajo) en las retinas de ratones WT y rd10 con modulación de la expresión del miR-6937-5p.....	153
Figura 49. Gráfica de barras del número de filas de fotorreceptores (arriba) y del grosor de la capa de fotorreceptores (ONL) (abajo) en las retinas de ratones WT y rd10 con modulación de la expresión del miR-6240 y miR142a-5p.....	154
Figura 50. Confirmación mediante histología de la especificidad de la infección en fotorreceptores.....	155
Figura 51. Cultivos primarios de células fotorreceptoras.....	161
Figura 52. Histogramas de los estudios de citometría de flujo.....	163
Figura 53. Capacidad de infección/transfección de células MU-PH1 de diferentes sistemas.....	163

Figura 54. Comparativa de la capacidad de infección y transfección de la línea celular MU-H1 mediante diferentes sistemas..... 164  
 Figura 55. Citotoxicidad de los cultivos tratados con miR-6937-5p mimic, con miRNA mimic negative control y los controles negativos (sin tratamiento)..... 166

**TABLAS**

Tabla 1. Modelos de la degeneración retiniana en ratones..... 48  
 Tabla 2. Resumen de las características principales de los plásmidos moduladores de miRNAs adquiridos en GeneCopoeia..... 89  
 Tabla 3. miRNAs diferencialmente expresados. (F.C. >1.5 y valor p<0.05) detectados por los arrays GeneChip miRNA 4.0. .... 120  
 Tabla 4. miRNAs diferencialmente expresados (F.C. >1.5) detectados por los arrays miScript miRNA PCR. .... 124  
 Tabla 5. Lista de miRNAs D.E. validados por qPCR ..... 128  
 Tabla 6. Número de mRNAs clasificados en cada uno de los grupos..... 131  
 Tabla 7. Resumen de los principales hallazgos de los niveles de expresión de los mRNAs y de sus rutas biológicas asociadas..... 132  
 Tabla 8. Resumen de los niveles de expresión de los miRNA candidatos, sus mRNAs diana y las rutas biológicas asociadas a éstos que podrían estar implicadas en la degeneración de la retina ..... 140  
 Tabla 9. Resumen de los resultados en los estudios histológicos de número de filas de FR y grosor de ONL en ratones rd10 con diferentes soluciones moduladoras de miRNAs..... 152  
 Tabla 10. Niveles de expresión de los mRNA diferencialmente expresados después de modulación *in vivo* del miR-6937-5p y las rutas biológicas asociadas a éstos ..... 157  
 Tabla 11. Resumen de las ventajas y desventajas de las técnicas de inyección sub-retinianas (SR) e intra-vítreas (IV). .... 183



## ***CLAVE DE ABREVIATURAS***



## **CLAVE DE ABREVIATURAS**

AAV	Virus adeno-asociados
ADRP	Retinosis pigmentaria autosómica dominante
AMO	Oligonucleótidos Anti-miRNA
arRP	Retinosis pigmentaria autosómica recesiva
BSA	Suero albúmina bovina (Bovine Serum Albumin)
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas intercaladas regularmente
D.E.	Diferencialmente expresados
DHA	Ácido Docosahexaenoico
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
dsDNA	RNA bicatenaria
EHDR	Enfermedades hereditarias degenerativas de la retina
ELM	Membrana limitante externa (External limiting membrane)
ERG	Electrorretinografía
F.C.	Fold-change
FBS	Fetal Bovine Serum
FR	Fotorreceptores
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GCL	Capa de células ganglionares (Ganglion cells layer)
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GO	Ontología genética (Gene Ontology)
GS	Suero de cabra (Goat Serum)
GTP	Guanosín trifosfato cíclico
ILM	Membrana limitante interna (Inner limiting membrane)
INL	Capa nuclear interna (Inner nuclear layer)
IPL	Capa plexiforme interna (Inner plexiform layer)
iPS	Células madre pluripotenciales inducidas
IV	Intra-vítrea
Kb	Kilo base
LB	Medio Luria-Bertani
LCA	Amaurosis congénita de Leber
LDH	Lactato deshidrogenasa
LncRNA	ARNs largos no codificantes
LV	Lentivirus
MGDP	Células progenitoras derivadas de las células de Müller (Müller glia-derived progenitors)
miRISC	Complejo de silenciamiento inducido por miRNA
miRNAs	microRNAs
mRNA	RNA mensajeros
NCS	Sistema nervioso central

---

NFL	Capa de fibras nerviosas (Nerve fibre layer)
NGS	Secuenciación de nueva generación
O.M.S	Organización Mundial de la Salud
ONL	Capa nuclear externa (Outer nuclear layer)
OP	Potenciales Oscilatorios (OPs, por sus siglas en inglés)
OPL	Capa plexiforme exterior (Outer plexiform layer)
P	Post-natal
PBS	Phosphate buffered saline
PDE6	Fosfodiesterasa 6
PDE6 $\beta$	Subunidad $\beta$ de la fosfodiesterasa de tipo 6
pi	Post-inyección
qPCR	PCR cuantitativa
rd1	Retinal degeneration 1
rd10	Retinal degeneration 10
RdCVF	Factor de viabilidad del cono derivado de bastón
RNA	ARN (por sus siglas en inglés)
RP	Retinosis Pigmentaria
RPE	Epitelio pigmentario de la retina
SC	Células madre (stem cell)
SE	Segmentos externos de los fotorreceptores
SI	Segmentos internos de los fotorreceptores
SR	Sub-retiniana
TLDA	Matriz de baja densidad de Taqman
TUDCA	Ácido tauroursodeoxicólico
TUNEL	TdT mediated dUTP Nick-End labeled assay
USH2A	Usher tipo II
VPU	Unidad de procesamiento de video
WT	Wild-type

*RESUMEN*



## **RESUMEN**

Las enfermedades hereditarias degenerativas de la retina (EHDR) comprenden un conjunto de trastornos hereditarios que causan la muerte de los fotorreceptores y resultan en una pérdida progresiva de la visión. Entre las EHDR la forma más frecuente es la retinosis pigmentaria (RP), que constituye la principal causa genética de ceguera. Las EHDR se caracterizan por su gran heterogeneidad genética y clínica, lo que dificulta en gran medida el desarrollo de terapias. Una de las estrategias más exitosas ha consistido en el reemplazo genético de los genes RPE65 y CNGA3 en un grupo de pacientes. Sin embargo, parece poco realista el desarrollo de terapias génicas dirigidas a cada uno de los más de 250 genes implicados en EHDR, que puedan incluir a todos los pacientes a corto o medio plazo.

Partimos de la hipótesis de que, en las EHDR, se ve alterado un conjunto de mecanismos moleculares comunes a distintas formas de la enfermedad, con independencia del gen mutado. Esta idea se apoya en distintos trabajos en los que se ha descrito un patrón común de expresión diferencial tanto de genes, como de microRNAs (miRNAs) en distintos modelos de EHDR, causados por mutaciones en genes diferentes.

El desarrollo de esta tesis se ha planteado alrededor de dos objetivos principales; por una parte el estudio de la expresión de miRNAs para la identificación de miRNAs diferencialmente expresados que sirvan como potencial diana terapéutica en la retinosis pigmentaria, y por otra parte el análisis del efecto de la modulación *in vivo* de un grupo de miRNAs en un modelo animal de la enfermedad, el ratón rd10.

Para la realización del primer objetivo llevamos a cabo un estudio del perfil de expresión global de miRNAs en las retinas de un modelo animal de EHDR, el ratón rd10, portador de una mutación espontánea en el gen *Pde6b*. Utilizamos para ello la tecnología de microarrays de expresión génica en RNA obtenido de muestras de retinas en etapas tempranas de la degeneración retiniana. Hemos observado un grupo de 19 microRNAs con expresión diferencial, algunos de ellos comunes a lo descrito en otros estudios utilizando distintos modelos de EHDR basados en mutaciones en los genes RHO y RDS.

Además, con el fin de obtener una mejor comprensión de la posible relación entre la alteración de miRNAs y la regulación de la expresión génica relacionada con la degeneración de la retina, realizamos un estudio del transcriptoma completo en las mismas muestras utilizadas para el análisis de expresión de miRNAs. Para establecer una relación entre los miRNAs diferencialmente expresados y el proceso degenerativo retiniano, construimos redes de interacción miRNA-mRNA con el software CytoScape. Esta metodología nos permitió identificar mRNAs con expresión inversa a la de sus miRNA diana, los cuales podrían estar desempeñando un papel importante en la degeneración de la retina. De este modo detectamos un total de 554 mRNAs inversamente expresados, que fueron sometidos a estudios de ontología genética (GO) y análisis de vías o rutas biológicas. De manera llamativa, un gran número de genes identificados juegan un papel esencial en la supervivencia y en los procesos fisiológicos normales de la retina. Se detectaron también genes probablemente relacionados con procesos patogénicos de la retina como la apoptosis o la inflamación, entre otros.

Por otro lado, la administración subretiniana de virus adeno-asociados (AAVs) con secuencias inhibidores de la expresión del miR-6937-5p, ha logrado ralentizar significativamente el deterioro visual y la degeneración de los fotorreceptores en nuestro modelo murino de RP.

En su conjunto, nuestros resultados contribuyen a ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares subyacentes al establecimiento y desarrollo de la retinitis pigmentosa y abren la posibilidad al desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la expresión de los miRNAs con alteración en su expresión.

## *INTRODUCCIÓN*



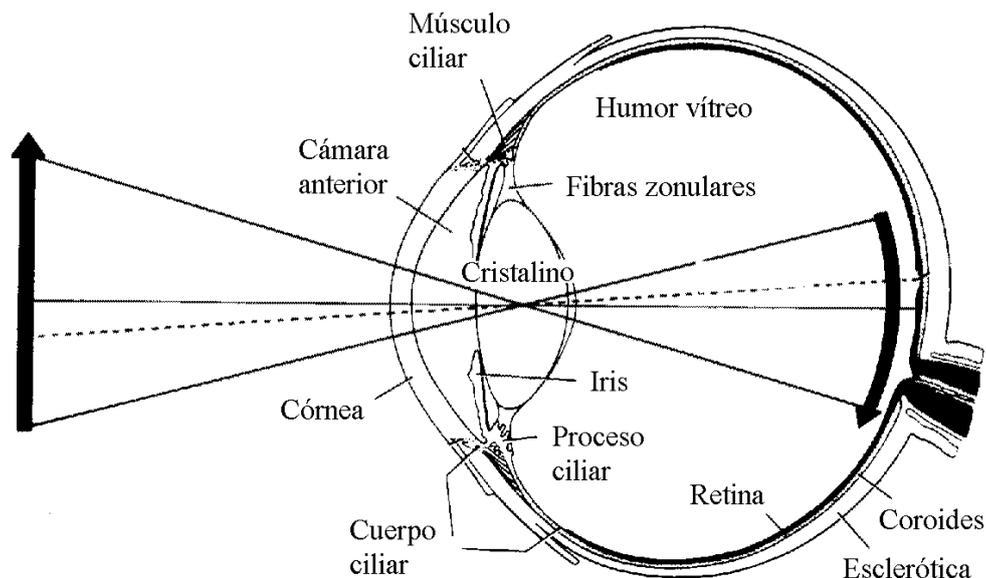
## INTRODUCCIÓN

### 1. El ojo humano

En los seres humanos, la visión es el más activo de nuestros sentidos, el mejor organizado y el que nos proporciona aproximadamente el 70% de la información que percibimos sobre nuestro entorno. No sólo nos proporciona información, sino una perspectiva de la totalidad de los objetos y del mundo que nos rodea, siendo la vía que más nos ayuda en el conocimiento de la realidad, a la vez que nos permite aprender y relacionar rápidamente lo aprendido. Por lo tanto, enfermedades o desordenes que reduzcan la capacidad de este sentido causan gran limitación para aquellas personas que lo padecen.

#### **1.1 Anatomía y fisiología del globo ocular**

Considerado como el órgano más complejo de nuestro cuerpo, el ojo humano es el elemento fundamental del sentido de la vista junto con el cerebro, siendo el órgano receptor externo encargado de recibir y procesar la información luminosa.



**Figura 1. Esquema del globo ocular.** Se muestra de forma esquemática un corte sagital de un ojo humano y se indican sus estructuras macroscópicas. Modificado de <http://www.uco.es/saguera/tema4.html>

El globo ocular es una esfera (Figura 1) que a pesar de su tamaño relativamente pequeño, sólo 25 mm (1 pulgada) de diámetro, consta de varios tipos de tejidos dispuestos de tal manera que permiten la refracción de la luz con el objetivo final de proyectar una imagen enfocada sobre una capa de células nerviosas, la retina, la cual estimula respuestas neuronales. Para que los rayos de luz que penetran en el ojo se puedan enfocar en la retina, se deben refractar, es decir, cambian de dirección a medida que los rayos de luz pasan por los diversos elementos del ojo.

El ojo humano está formado por tres capas (Figura 1): la capa externa o fibrosa, compuesta por la esclerótica y la córnea; la capa media o vascular, compuesta por la coroides, el cuerpo ciliar y el iris; y la capa interna o nerviosa compuesta por la retina. A su vez, el ojo está dividido en dos partes o cavidades: la anterior, espacio comprendido entre la córnea y el cristalino, y la cavidad posterior, espacio entre la retina y el cristalino y que está llena de un gel transparente llamado humor vítreo y que contribuye al mantenimiento de la forma del ojo y facilita que la luz llegue a la retina de forma uniforme.

La cavidad anterior, compuesta por la esclerótica, la córnea, el iris y el cristalino, contiene un líquido de relleno similar al agua (humor acuoso). La esclerótica es una membrana que rodea al ojo humano que por la parte frontal del globo ocular es transparente para formar una membrana externa delgada denominada córnea. La córnea es un dioptrio esférico que tiene el doble propósito de proteger el ojo y refractar la luz a medida que entra en el ojo.

Una vez que los rayos de luz se proyectan en la retina, la imagen formada es procesada por millones de células fotorreceptoras llamadas bastones y conos que son capaces de percibir la radiación electromagnética de la luz entrante (espectro visible; rango de longitudes de onda de 400 a 700 nm), transformarla en impulsos electroquímicos y enviarla al cerebro.

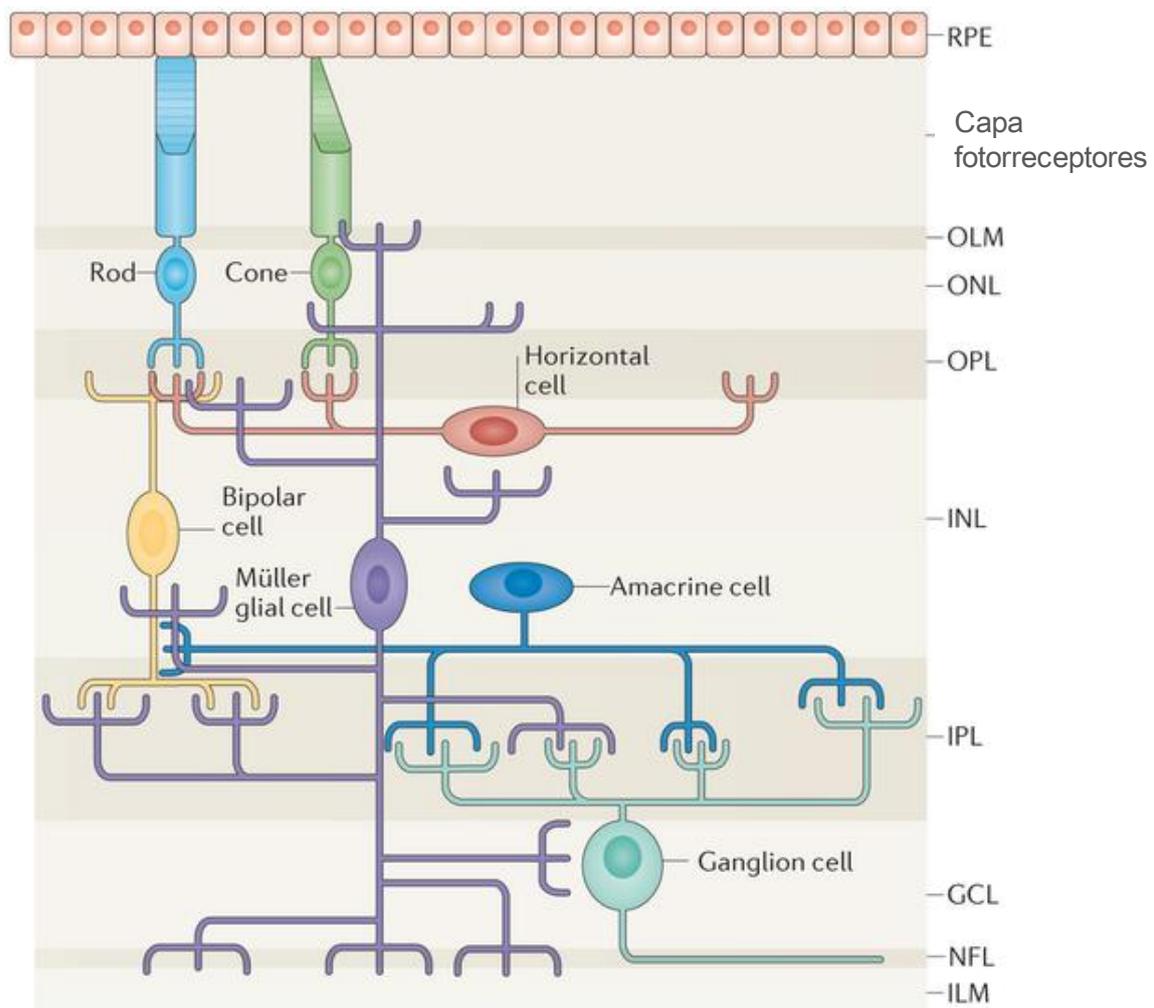
## **2. La retina**

Ramón y Cajal, a finales del siglo XIX, usando la tinción de nitrógeno de plata de Golgi fue el primer científico que identificó los principales tipos de células de la retina y descifró el flujo de información a través de la red retiniana<sup>1</sup> dando lugar a los primeros pasos en el conocimiento y comprensión de la estructura y función de este tejido.

La retina es un tejido nervioso situado en la pared posterior del ojo, entre la coroides y el humor vítreo (Figura 1), que funciona en esencia como un detector de imagen y una unidad de procesamiento. Su función consiste básicamente en la conversión biológica de la energía lumínica de los fotones, información óptica, en señales eléctricas y químicas. Estos impulsos eléctricos generados por la retina representan un nivel temprano, pero complejo, del procesamiento de la información visual. Posteriormente esta información de bajo nivel se transmite al resto del sistema visual y a las regiones superiores del cerebro (par nervioso II), que finalmente conduce a una comprensión visual del medio ambiente. Esta transmisión de la información se realiza a través del nervio óptico, compuesto por los axones de una red de células nerviosas de la retina, las células ganglionares (aproximadamente 1,1 millones de células). Esta información, para su interpretación, es enviada hasta el núcleo geniculado lateral del tálamo y desde ahí llegará a la corteza cerebral visual primaria y áreas de procesamiento visual, localizadas en la parte posterior del encéfalo.

Entre las otras funciones principales de la retina se incluyen la adaptación a la luz y a la oscuridad y el filtrado espacial para codificar, interpretar y mejorar la comprensión del estímulo luminoso.

La retina típica de los mamíferos tiene aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de espesor y como se muestra en la representación anatómica en la Figura 2, ésta está compuesta por varias capas y tipos celulares, cada una con su propio nombre y funcionalidad.



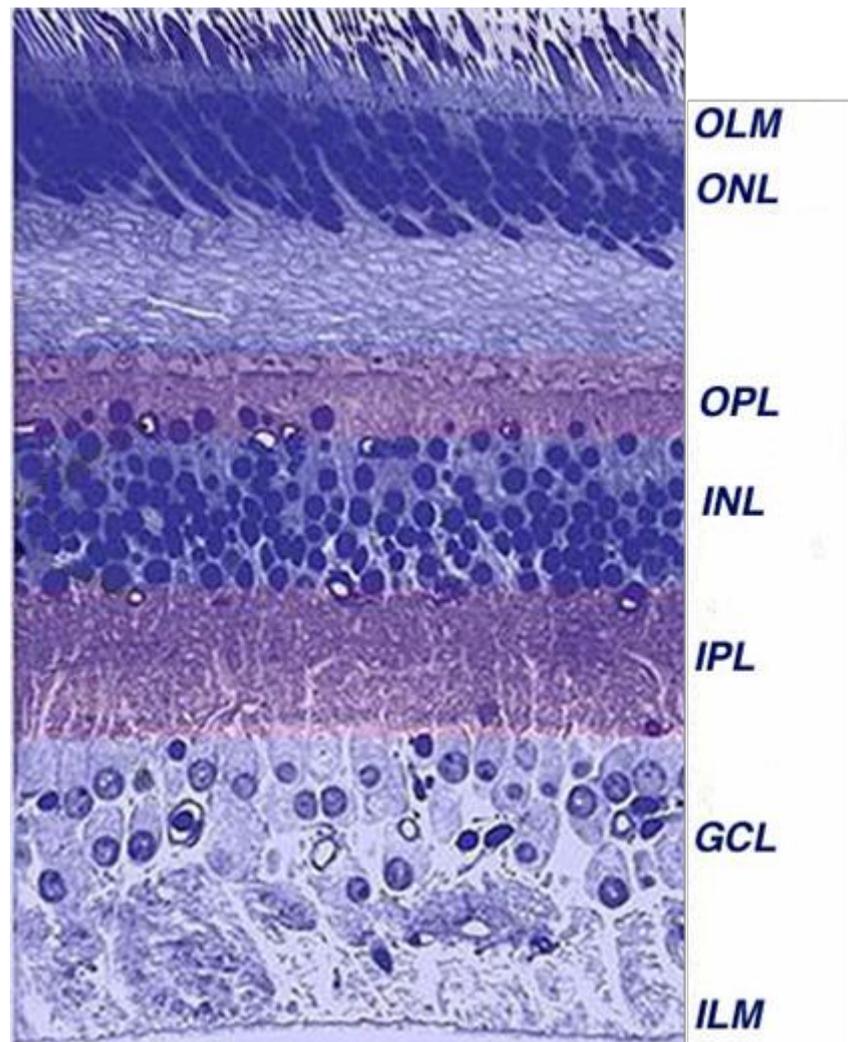
**Figura 2. Esquema de las principales capas y tipos celulares de la retina.** Modificado de Goldman, 2014<sup>2</sup>.

La retina vertebrada tiene diez capas distintas. Estas capas se diferencian principalmente en base a las células que las componen y en base a las conexiones constituyentes. A continuación se describirán cada una de estas capas por orden de ubicación anatómica, desde lo más cercano a lo más alejado del humor vítreo:

1. Membrana limitante interna (Inner limiting membrane, ILM): es el límite entre la retina y el cuerpo vítreo, formado por astrocitos y los pies distales de las células de Müller.
2. Capa de fibras nerviosas (Nerve fibre layer, NFL): se encuentran los axones de las células ganglionares.

3. Capa de células ganglionares (Ganglion cells layer, GCL): contiene los núcleos de las células ganglionares, cuyos axones se convierten en las fibras nerviosas ópticas.
4. Capa plexiforme interna (Inner plexiform layer, IPL): contiene las sinapsis entre los axones de las células bipolares y las dendritas de las células ganglionares y amacrinas.
5. Capa nuclear interna (Inner nuclear layer, INL): contiene los núcleos de las células amacrinas, células bipolares y células horizontales.
6. Capa plexiforme exterior (Outer plexiform layer, OPL): contiene las proyecciones de los conos y bastones. Estas proyecciones hacen sinapsis con las dendritas de células bipolares. En la región macular, esto se conoce como la capa de fibra de Henle.
7. Capa nuclear externa (Outer nuclear layer, ONL): se encuentran los cuerpos celulares de los conos y bastones.
8. Membrana limitante externa (External limiting membrane, ELM): membrana que separa el segmento interno de los fotorreceptores de su núcleo celular.
9. Capa de fotorreceptores (Photoreceptors, PR): contiene los segmentos internos y distales de los conos y bastones.
10. Epitelio pigmentario de la retina (Retinal pigment epithelium, RPE): monocapa de células cuboidales. Es la capa más cercana a la coroides.

En cuanto a la composición celular, hay seis tipos celulares principales en la retina:

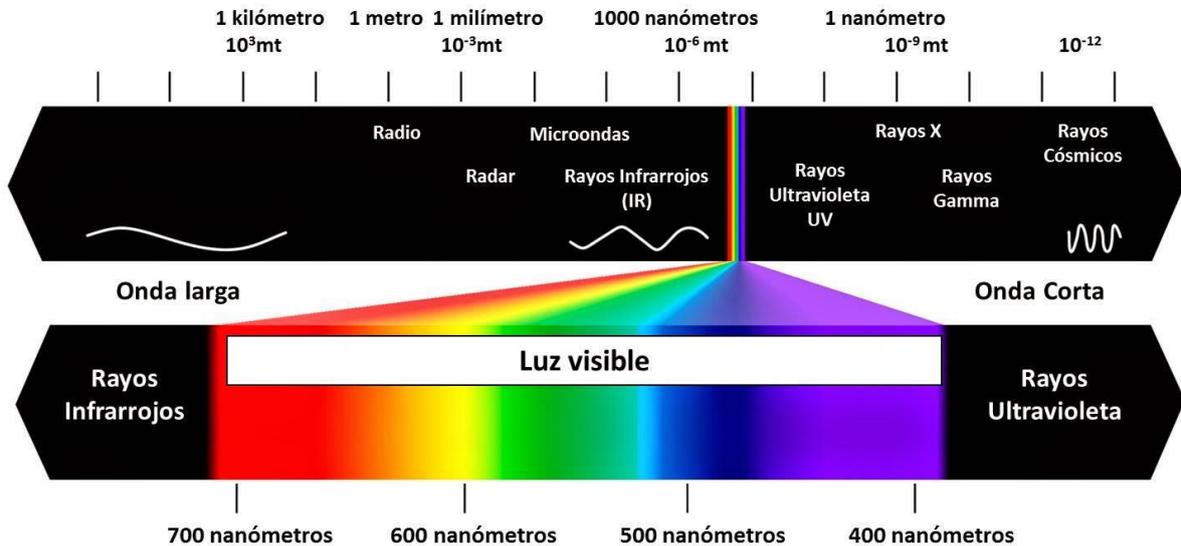


**Figura 3. Histología de una retina normal de humano.**

### **Células fotorreceptoras: Conos y bastones**

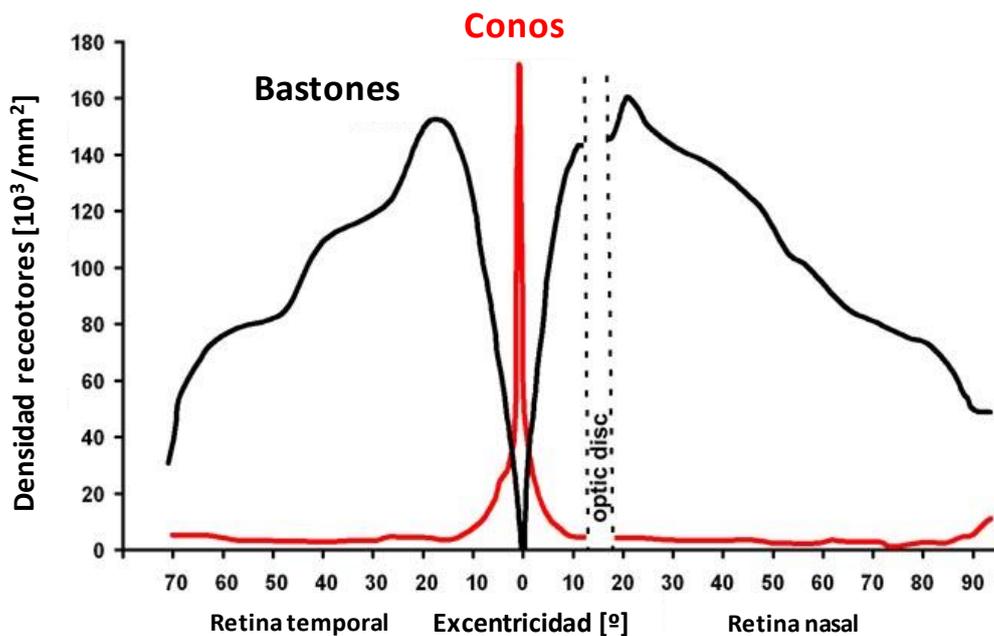
Los fotorreceptores se encuentran en la capa más profunda de la retina (Figura 2 y Figura 3), la más alejada de la luz entrante. Hay dos tipos de células fotorreceptoras, los bastones (hasta 120-150 millones, en un ojo humano) y los conos (6-7 millones), nombrados así por su morfología. Estas células tienen diferentes funciones, pero ambas se caracterizan principalmente por su capacidad para percibir los estímulos de la luz y convertirlos en señales eléctricas. Por un lado, los bastones son más sensibles a la luz que los conos (unas quinientas veces más sensibles) y se encargan principalmente de la visión nocturna (escotópica) y tienen sólo un tipo de célula en términos de sensibilidad a la longitud de onda. En cambio, existen tres tipos diferentes de conos (rojo, verde y azul), y cada tipo responde o tienen sensibilidad a diferentes longitudes de onda

(longitudes de onda larga [L] ( $\lambda_{\max} = 560 \text{ nm}$ ), media [M] ( $\lambda_{\max} = 530 \text{ nm}$ ) y corta [S] ( $\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$ ), respectivamente) (Figura 4), que ayudan principalmente a la visión diurna (fotópica) y la visión del color o cromática (Wässle, 2004).



**Figura 4. El espectro electromagnético completo (arriba).** Se ve ampliado el espectro visible (abajo), correspondiente a las longitudes de onda que los fotorreceptores de la retina son capaces de absorber para producir estímulos visuales.

Según la estructura y funcionalidad de la retina podemos separar dos partes: el área central, que proporciona visión aguda o discriminación fina de detalle, la cual contiene la mácula lútea y la fovea central; y el área periférica, que participa en la visión paramacular o periférica. Estas diferencias en la funcionalidad vienen dadas por las diferencias en la proporción de los dos tipos de fotorreceptores en cada una de estas áreas. En seres humanos, de media, la relación entre bastones y conos es aproximadamente de 20:1, pero este ratio varía en relación a la función desempeñada por cada área (Figura 5). En las áreas encargadas de la visión aguda los conos son mayoría, como en la fovea que está compuesta solamente por conos, mientras que en la periferia los bastones son el tipo celular predominante.

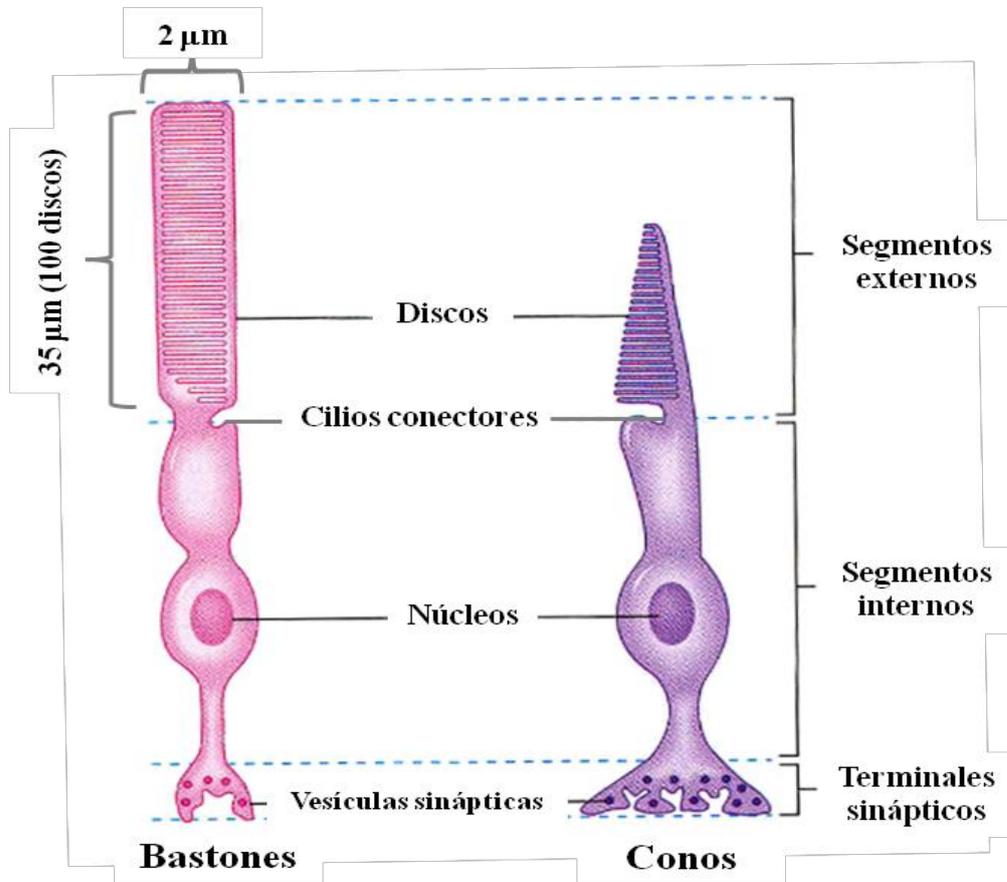


**Figura 5. Densidad de conos y bastones a lo largo de la retina humana.** (<http://webvision.med.utah.edu/>)

El ratón, especie animal utilizada en la presente tesis doctoral, sigue una proporción similar que los humanos, con la capa de fotorreceptores dominada por bastones con sólo un pequeño porcentaje de conos. Sin embargo, en la retina de los ratones no existe una fóvea central, como en el ojo humano<sup>3</sup> y por lo tanto no hay un área exclusiva de conos. No obstante, dado que la enfermedad estudiada en esta tesis doctoral afecta principalmente a la retina periférica humana, consideramos al ratón un buen modelo para la RP.

Los bastones y los conos son neuronas unipolares especializadas. Se pueden dividir en dos partes: segmentos interno (SI) y externo (SE). En el segmento interior se incluyen el cuerpo celular, el axón y la terminación sináptica. Por su parte, el segmento externo es un cilio modificado que contiene la maquinaria bioquímica necesaria para la fototransducción o transducción visual<sup>4,5</sup>. Los componentes de la cascada enzimática de la fototransducción están dentro de vesículas membranosas aplanadas ("discos") que en los bastones están cubiertas/envueltas por la membrana plasmática del segmento externo (Figura 6). Los conos tienen una estructura similar, pero las membranas del disco son

una extensión de la propia membrana plasmática, dispuestas en una serie de invaginaciones (Figura 6).



**Figura 6. Morfología básica de los fotorreceptores.** Los bastones y los conos tienen los mismos componentes estructurales básicos: el segmento exterior consiste en discos que contienen el fotopigmento, mientras que el segmento interno contiene el núcleo y la mayoría de los orgánulos. El terminal sináptico contiene las vesículas sinápticas, que almacenan un transmisor químico utilizado para la comunicación, el glutamato.

Las otras neuronas de la retina, cada una con sus características y propósito, transfieren y modulan la señal proveniente de las células fotorreceptoras, conformando una red compleja de células que permiten que dicha señal llegue al cerebro para ser interpretada. Entre ellas se encuentran las células horizontales y bipolares (localizadas en el INL), las amacrinas (INL y GCL) y las ganglionares (GCL).

En la retina también existe otros tipos celulares que no participan o no son parte de la transducción de la señal, pero que sí juegan un papel esencial en el buen funcionamiento

y/o protección inmunológica de la retina. Entre ellos se encuentran las células de Müller (localizados en el INL pero sus procesos abarcan toda la retina desde el borde interno del GCL hasta el borde distal del ONL). Éstas proporcionan apoyo estructural para las neuronas de la retina extendiéndose a través de todo el grosor de la retina neural. Son la forma predominante (90%) de células gliales que se encuentran en la retina, las cuales se activan por estímulos patógenos<sup>6</sup>. La función principal de las células de Müller es mantener la estabilidad del ambiente extracelular de la retina mediante la regulación de los niveles de  $K^+$ , la captación de neurotransmisores, la eliminación de los desechos, el almacenamiento de glucógeno, el aislamiento eléctrico de los receptores y otras neuronas.

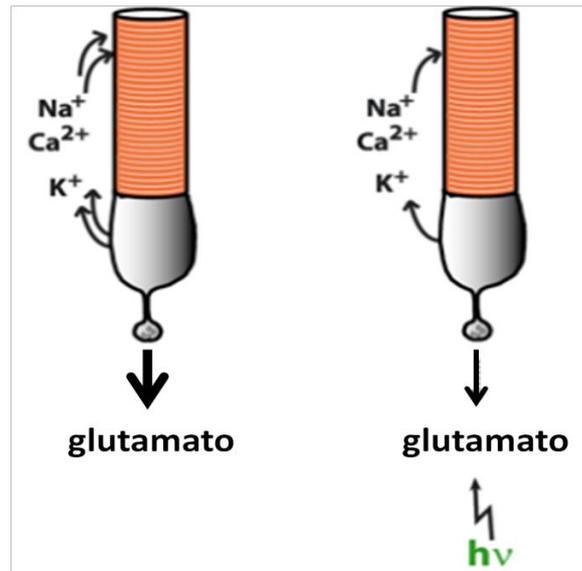
Aunque no se considere parte de la retina, una monocapa de células que juega un papel fundamental en el buen funcionamiento de la retina y en la formación de la barrera sangre/retina, es el epitelio pigmentario retiniano (RPE). Las células que conforman el epitelio pigmentario retiniano se localizan detrás de la retina, entre los fotorreceptores y su suministro de sangre. Conectadas a través de uniones estrechas, las células RPE extienden las microvellosidades que se intercalan con los segmentos externos de los fotorreceptores y realizan el intercambio de iones y nutrientes, la fagocitosis del segmento externo y el reciclaje del mismo. Las células RPE juegan un papel importante en la recuperación de los fotopigmentos. Durante el ciclo visual, en los fotorreceptores, el fotopigmento 11-cis-retinal se convierte en trans-retinal, cuya re-isomerización se realiza exclusivamente en el RPE por una proteína llamada RPE65, manteniendo así la excitabilidad de los fotorreceptores. Además de reciclar estos elementos de la cascada visual, las células RPE contienen enzimas antioxidantes y un pigmento oscuro que absorbe todos los fotones que no han sido absorbidos por los fotorreceptores<sup>5</sup>. Estas funciones del RPE sirven colectivamente para aumentar la calidad óptica, protegiendo al mismo tiempo a los fotorreceptores frente al daño oxidativo<sup>7</sup>.

### **3. La fototransducción**

La fototransducción visual es la transducción sensorial del sistema visual. Es el proceso biológico por el cual las partículas elementales de la luz, los fotones, se convierten en señales eléctricas en las células fotosensibles de la retina del ojo, los fotorreceptores cono y bastón. Este ciclo fue descubierto por George Wald (1906-1997) por el que recibió el Premio Nobel en 1967. Se le llama también "Ciclo Visual de Wald" en honor a él.

En la mayoría de los sistemas sensoriales, la activación de un receptor por el estímulo apropiado hace que la membrana celular se despolarice, estimulando en última instancia un potencial de acción y la liberación del transmisor sobre las neuronas con las que entra en contacto. En la retina, sin embargo, los fotorreceptores no exhiben potenciales de acción; más bien, la luz provoca un cambio gradual en el potencial de la membrana y un cambio correspondiente en la velocidad de liberación del neurotransmisor sobre las neuronas postsinápticas.

Tal vez aún más sorprendente es que la luz brillante en un fotorreceptor, ya sea un bastón o un cono, conduce a la hiperpolarización de la membrana en lugar de la despolarización. En oscuridad, el receptor está en un estado despolarizado, con un potencial de membrana de aproximadamente  $-40$  mV. Los incrementos progresivos en la intensidad de la iluminación hacen que el potencial se vuelva más negativo, que se satura cuando el potencial de la membrana alcanza aproximadamente  $-65$  mV<sup>8</sup>. Al igual que en otras células nerviosas, la liberación del neurotransmisor, en este caso el glutamato, desde los terminales sinápticos del fotorreceptor es dependiente de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje en la membrana terminal. De hecho, en esencia, la fototransducción es un mecanismo que conlleva una serie de eventos bioquímicos en cascada en el segmento externo de los fotorreceptores que tiene como objetivo final provocar el cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , que de manera habitual en la oscuridad se mantienen abiertos.

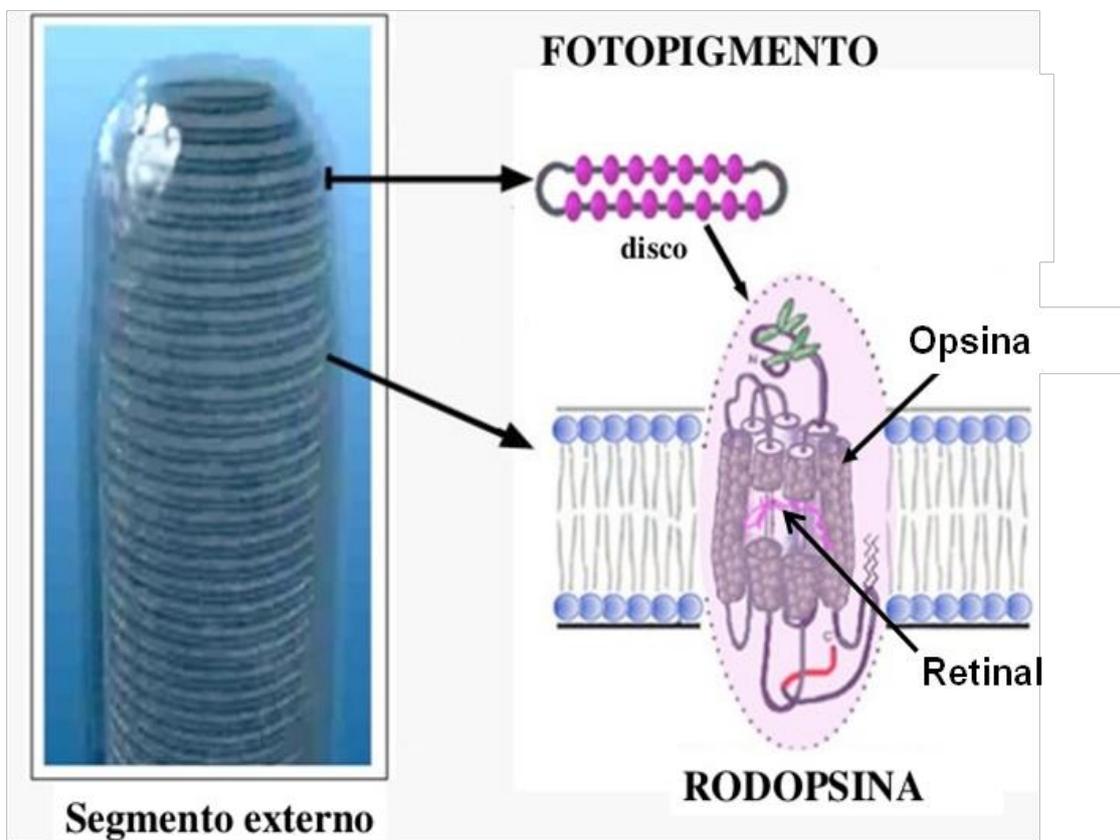


**Figura 7. Flujo iónico en los fotorreceptores.** La corriente en oscuridad. El  $\text{Na}^+$  y una cantidad menor de  $\text{Ca}^{2+}$  entran a través de canales nucleótidos cíclicos en la membrana del segmento externo, mientras que el  $\text{K}^+$  se desplaza a través de canales con voltaje en el segmento interno. En oscuridad (izquierda), los bastones están despolarizados y liberan el neurotransmisor glutamato continuamente. En respuesta a la luz (derecha), los canales en la membrana del segmento externo se cierran, los bastones se hiperpolarizan y la liberación de glutamato disminuye. Modificado de “The Molecular Design of Visual Transduction”<sup>9</sup>.

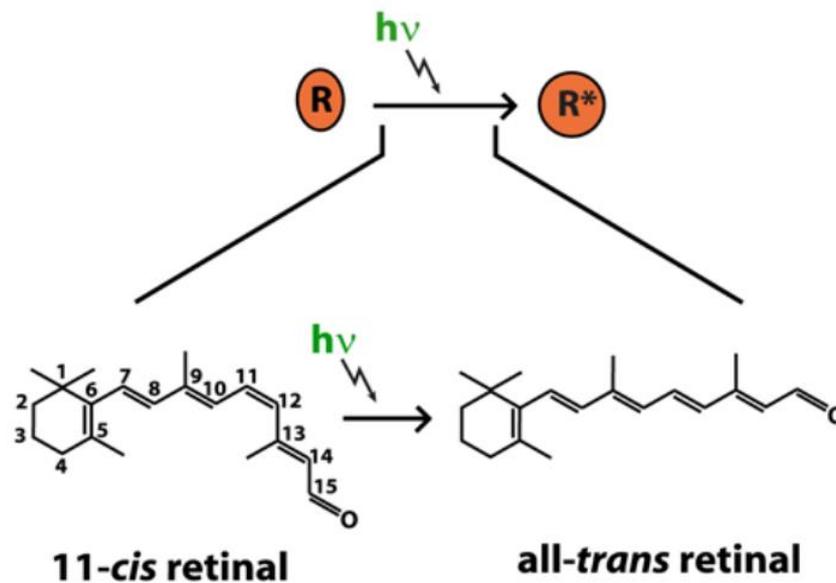
El estado relativamente despolarizado de los fotorreceptores en la oscuridad depende de la presencia de canales iónicos en la membrana del segmento externo que permitan que los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  fluyan hacia la célula, reduciendo así el grado de negatividad interna (Figura 7). La apertura o cierre de estos canales en el segmento externo está regulada por los niveles intracelulares del guanosín monofosfato cíclico (GMPc). En la oscuridad, altos niveles de GMPc en el segmento externo mantienen los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  abiertos y mantienen también la alta velocidad de liberación de glutamato. Sin embargo, con luz, los niveles de GMPc disminuyen y algunos de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se cierran disminuyendo el número de canales abiertos, lo que conduce a la hiperpolarización de la membrana del segmento externo y, en última instancia, la reducción de la liberación del transmisor en la sinapsis del fotorreceptor (esquema del proceso de fototransducción en la Figura 10).

La serie de cambios bioquímicos que finalmente conducen a una reducción en los niveles de GMPc y por consiguiente a una disminución en el número de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  abiertos, comienza cuando un fotón es absorbido por un fotorreceptor, receptor

acoplado a proteína G, localizado en los discos de los segmentos externos (o distales) de los fotorreceptores (Figura 8). El fotorpigmento consta de una parte proteica, la opsina, y un cromóforo de tipo retinal capaz de absorber la luz (retinal, un aldehído de la vitamina A). En oscuridad, el cromoforo retinal está en forma cis, pero cuando la luz es absorbida por éste, su configuración cambia rápidamente del isómero 11-cis retinal a su forma trans (Figura 9). A este proceso se le denomina fotoisomerización. Una vez ocurrido esta fotoisomerización, el retinal ya no “encaja” bien en la opsina (rodopsina en el caso de los bastones), lo cual desencadena entonces una serie de alteraciones que provoca su cambio conformacional.



**Figura 8. Localización y composición de la rodopsina y el cromóforo retinal.** Se encuentran dentro de la membrana de los discos, en los segmentos externos de los fotorreceptores. Modificado de <http://webvision.med.utah.edu>.



**Figura 9. Cambio conformacional del cromóforo retinal al absorber la luz la rodopsina.** La fotoisomerización del 11-cis retinal a all-trans retinal (derecha) conlleva la activación de la rodopsina (R\*). Modificado de “The Molecular Design of Visual Transduction”<sup>9</sup>.

Este cambio en su conformación, a su vez, lleva a la activación de un mensajero intracelular llamado transducina, el cual activa una fosfodiesterasa de cGMP, la fosfodiesterasa 6 (PDE6). Esta enzima cataliza la hidrólisis del cGMP a 5'-GMP. La degradación en la membrana del disco de GMPc gracias a la enzima PDE6, reduce la concentración de GMPc en todo el segmento exterior de los fotorreceptores y, por tanto, reduce el número de moléculas de GMPc disponibles para unirse a los canales en la superficie de la membrana del segmento externo, dando lugar al cierre de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 10).

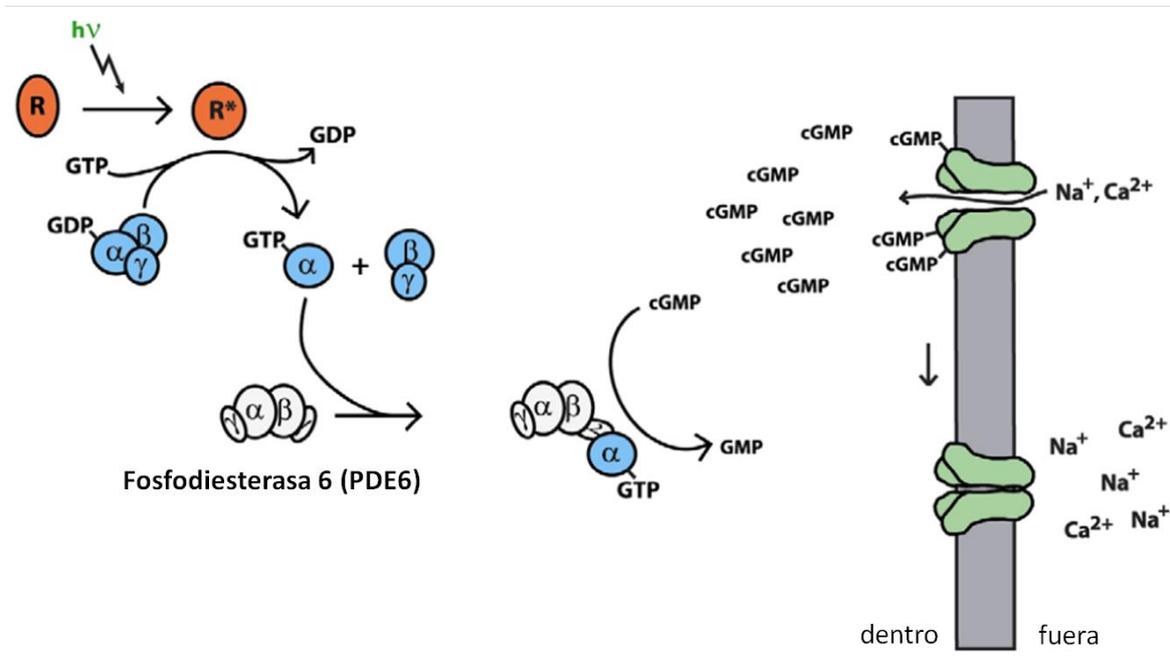
Después de la isomerización y liberación de la proteína opsina, todo el trans-retinal se reduce a trans-retinol y viaja al RPE para ser "recargado". Este proceso deja de manifiesto el papel clave que el RPE juega en el buen funcionamiento de la retina.

Una de las características importantes de esta cascada bioquímica iniciada por la captura de fotones, es que proporciona una enorme amplificación de señal. Se ha estimado que una sola molécula de rodopsina activada por luz puede activar 800 moléculas de transducina, aproximadamente el ocho por ciento de las moléculas en la superficie del disco. Aunque cada molécula de transducina activa sólo una molécula de PDE6, cada una de éstas es a su vez capaz de catalizar la descomposición de hasta seis moléculas de

GMPc. Como resultado, la absorción de un solo fotón por una molécula de rodopsina da como resultado el cierre de aproximadamente el 2% del número total de canales iónicos de cada bastón, los cuales están abiertos en la oscuridad. Este número de cierres de canal provoca un cambio neto en el potencial de membrana de aproximadamente 1 mV.

En la membrana del disco

En la membrana plasmática



**Figura 10. Cascada de la fototransducción.** Esquema de los mecanismos moleculares en cascada que se producen en la fototransducción los cuales provocan el cierre de los canales en la membrana plasmática de los segmentos distales de los fotorreceptores. En la membrana del disco (izquierda), la absorción de un fotón por la rodopsina (R) conduce a la fotoisomerización y formación del estado activo del pigmento (R\*). R\* promueve el intercambio de GDP por GTP sobre la unidad  $\alpha$  de la transducina, haciendo que las subunidades  $\beta\gamma$  se desprendan y dejando la transducina  $\alpha$ -GTP libre para activar la enzima fosfodiesterasa 6 (PDE6). La PDE6 activada hidroliza cGMP para formar 5'-GMP. La reducción de los niveles intracelulares de GMPc cierra los canales, bloqueando la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y por lo tanto disminuyendo la corriente circulante. Modificado de “The Molecular Design of Visual Transduction”<sup>9</sup>.

#### **4. Enfermedades hereditarias degenerativas de la retina (EHDR)**

Para obtener la información visual, es necesario que todas las estructuras antes mencionadas que intervienen en el proceso de la visión estén en perfectas condiciones. Cuando algunas de éstas se encuentran afectadas, parcial o totalmente, sin posibilidad de mejora, aun aplicando procedimientos oftalmológicos, farmacológicos u ópticos, hablamos de discapacidad visual.

Un número cada vez mayor de personas se ven afectadas por discapacidad visual. Según un informe publicado por la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), en el mundo hay aproximadamente 285 millones de personas con discapacidad visual, de las cuales 39 millones son ciegas y 246 millones presentan baja visión debido a errores refractivos u a otros motivos (O.M.S. 2014). Este número de personas ciegas aumentó a 45 millones en el año 2016 constituyendo un aumento del 15%. Teniendo en cuenta los crecientes porcentajes de ancianos en los países tecnológicamente desarrollados y que el 82% de las personas que viven con ceguera tienen 50 años o más, se prevé que la prevalencia de ceguera seguirá aumentando.

Las enfermedades hereditarias degenerativas de la retina (EHDR) conducen a discapacidad visual, provocando una limitación o impedimento en la ejecución de actividades que afectan al desarrollo personal y social de la persona afectada. Además de la disminución de la calidad de vida que la discapacidad visual puede causar en los pacientes, la existencia de discapacidad visual en la población también genera costes significativos para la economía.

Las EHDR están entre las principales causas de discapacidad visual y ceguera en las personas mayores<sup>10</sup>. Son un grupo amplio y heterogéneo de enfermedades que conducen a la pérdida visual progresiva. Se estima que más de 15 millones de personas en todo el mundo sufren de pérdida visual debido a una degeneración retiniana heredada. La mayoría de las enfermedades degenerativas de la retina se caracterizan por la pérdida progresiva de células fotorreceptoras, con la excepción de algunas formas de degeneración vitreoretiniana.

En los seres humanos, ya se han identificado más de 300 genes que al sufrir mutaciones pueden conducir a pérdida de la visión debido a la muerte de los fotorreceptores conos y bastones (RetNet, 2017). Los dos trastornos más prevalentes entre ellos son: la

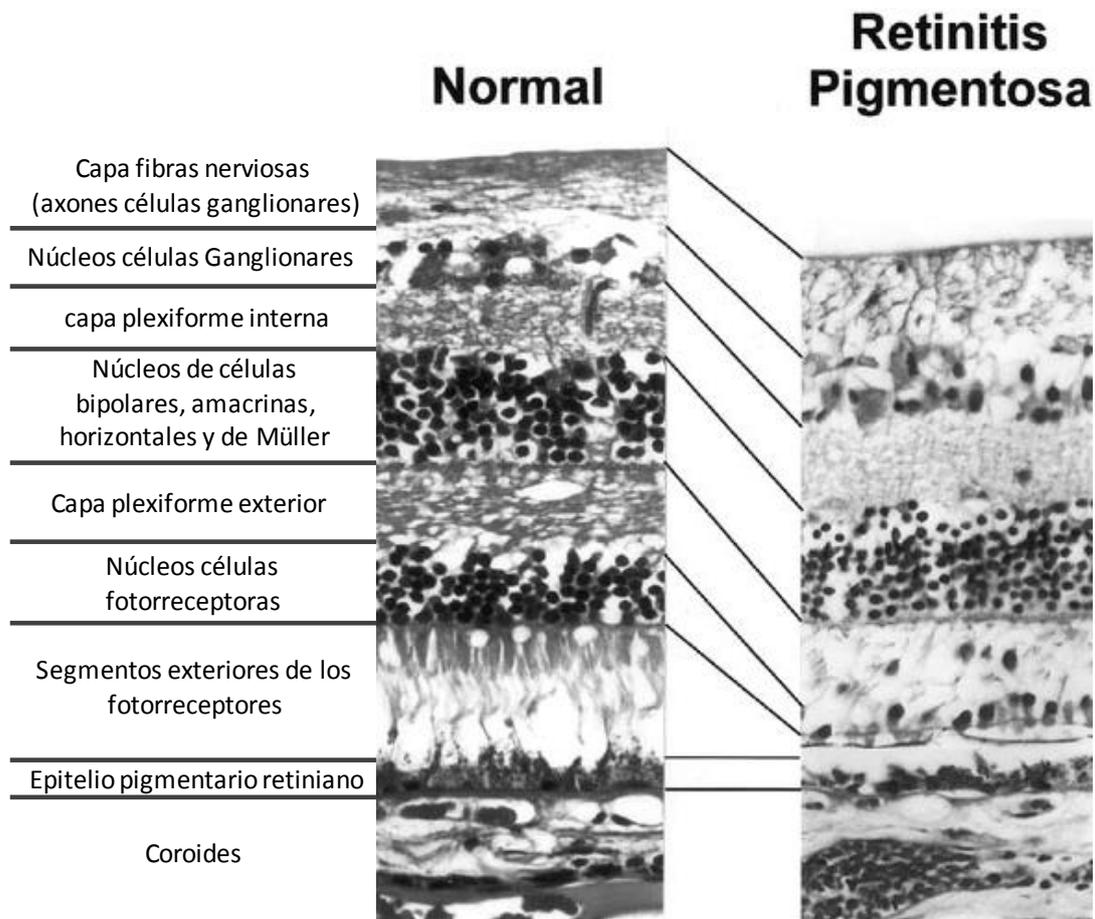
degeneración macular relacionada con la edad y las EHDR. Dentro de las EHDR, la retinosis pigmentaria (RP) es la más prevalente. La distrofia cono-bastón, el síndrome de Usher y la Amaurosis congénita de Leber (LCA) son otras de las EHDR más prevalentes<sup>11</sup>.

## **4.1 La Retinosis pigmentaria**

### ***4.1.1. Características principales y prevalencia de la Retinosis pigmentaria.***

La Retinosis pigmentaria, también conocida como retinitis pigmentosa, es el término que engloba a un conjunto de enfermedades genéticas degenerativas de la retina. A pesar de que no es una enfermedad con una incidencia muy alta, es la cuarta causa más habitual de ceguera<sup>12</sup> y la forma más común de degeneración hereditaria de la retina<sup>13-16</sup>. Su prevalencia varía según la etnia y la geografía. Así, por ejemplo, hay más casos en Estados Unidos y menos en el sur de Europa<sup>17-19</sup>. En general, se estima que la enfermedad afecta aproximadamente a 1 de cada 4000 individuos. Se estima que hay más de 1.5 millones de personas con esta enfermedad ocular en todo el mundo. En España más de 25.000 personas están afectadas y 500.000 son portadoras de variantes patogénicas y por lo tanto posibles transmisores de la enfermedad<sup>20</sup>.

Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida progresiva de la visión asociada a la muerte también progresiva de las células fotorreceptoras de la retina. En muchos casos, en estadios finales de la enfermedad, la RP puede terminar por conducir a una disfunción visual central o ceguera total mediante la atrofia del tejido retiniano<sup>18</sup> (Figura 11). El defecto primario subyacente a la RP afecta a la función de los fotorreceptores y/o las células del RPE, donde los mecanismos moleculares y celulares desencadenan la degeneración apoptótica de las células. Generalmente, la afectación es bilateral y los dos ojos se ven afectados por igual.



**Figura 11.** Aspecto histológico de la retina humana sana (izquierda) y de la retina de un paciente con RP en una etapa media de la enfermedad. Se puede observar una gran disminución en la densidad de células fotorreceptoras. Modificado de <http://ommbid.mhmedical.com>.

Los hallazgos en el examen clínico de la retina incluyen los depósitos pigmentarios de la espícula ósea, la atenuación del vaso retiniano, palidez papilar, campo visual reducido y ondas a y b anormales, disminuidas o ausentes en los estudios electroretinográficos (ERG)<sup>21</sup>.

La RP típica es también conocida como distrofia bastón-cono, dado que la pérdida funcional de los bastones excede a la de los conos<sup>18,21</sup>. A nivel celular, primero son las células bastones (células fotorreceptoras encargadas de la adaptación a la oscuridad) las que sufren degeneración y en etapas posteriores son los conos (células fotorreceptoras encargados de proporcionar información cromática) las células afectadas.

Hasta hace relativamente poco tiempo se trabajaba bajo la suposición general de que la degeneración de la retina tenía únicamente efectos directos en las poblaciones de

bastones y conos, mientras que las interneuronas y las células ganglionares de la retina interior permanecen relativamente intactas durante la enfermedad. En este sentido, se observó que el 80% de las neuronas de la capa nuclear interna (INL) y el 30% de las células glanglionares estaban preservadas en los explantes post-mortem de retinas de pacientes con RP avanzada<sup>22</sup>. No obstante, estudios recientes han revelado que la retina sufre reordenamientos biológicos, ahora referidos como "remodelación", en etapas avanzadas de la enfermedad, es decir, la retina interna se desorganiza progresivamente a medida que degenera la retina externa<sup>23-25</sup>. Se revelaron y demostraron cambios morfológicos, moleculares y funcionales graduales que acompañan constantemente a la pérdida de fotorreceptores, independientemente de la causa subyacente de la degeneración entre las células ubicadas en la retina interna (que comprenden las neuronas, la glía y los vasos sanguíneos).

El epitelio pigmentario retiniano de los pacientes está también alterado en RP presentando cúmulos o depósitos de pigmento en la retina debido a que las células epiteliales del pigmento retiniano migran cerca de los vasos sanguíneos de la retina<sup>26</sup>, signo muy característico de RP, y fenotipo que dio origen al nombre de esta enfermedad al ser observable en los exámenes del fondo de ojo.

#### ***4.1.2. Clasificación y genética de la RP***

La RP se puede dividir en dos grandes grupos atendiendo a distintos criterios:

- Por el fenotipo del individuo afectado: por un lado, las RP no sindrómicas, en las cuales la enfermedad se limita a los ojos sin otras manifestaciones sistémicas y por el otro lado las RP sindrómicas en las que los pacientes además de tener la visión afectada cursan con enfermedades no oculares. Este último grupo representa el 20-30% del total de todos los casos de RP<sup>14,19,21</sup>. Las formas más comunes de RP sindrómicas son: el síndrome de Usher, que se caracteriza por RP y discapacidad auditiva sensorial-neural, acompañada o no de disfunción vestibular<sup>27</sup> y el síndrome de Bardet-Biedl, que se caracteriza por RP con obesidad, polidactilia, retraso mental, hipogonadismo y deficiencia renal en algunos casos<sup>28</sup>.
- Por el patrón de herencia en tres grupos principales: autosómica dominante (25-30% de los casos), autosómica recesiva (40-50% de los casos) y ligada al cromosoma X (10-15% de los casos). No obstante, también hay un porcentaje significativo de casos cuyo

patrón queda por determinar; éste es el tipo denominado esporádico, en el que no existen antecedentes familiares ni consanguinidad.

### **Autosómica dominante (ADRP)**

Se establece que es del tipo ADRP cuando se observa en tres generaciones consecutivas, aunque algunos autores consideran suficiente que se manifieste solamente en dos. El 25-30% de las mutaciones que presentan los casos de RP autosómica dominante lo son a nivel del gen de la rodopsina (gen RHO)<sup>29,30</sup> (Figura 12).

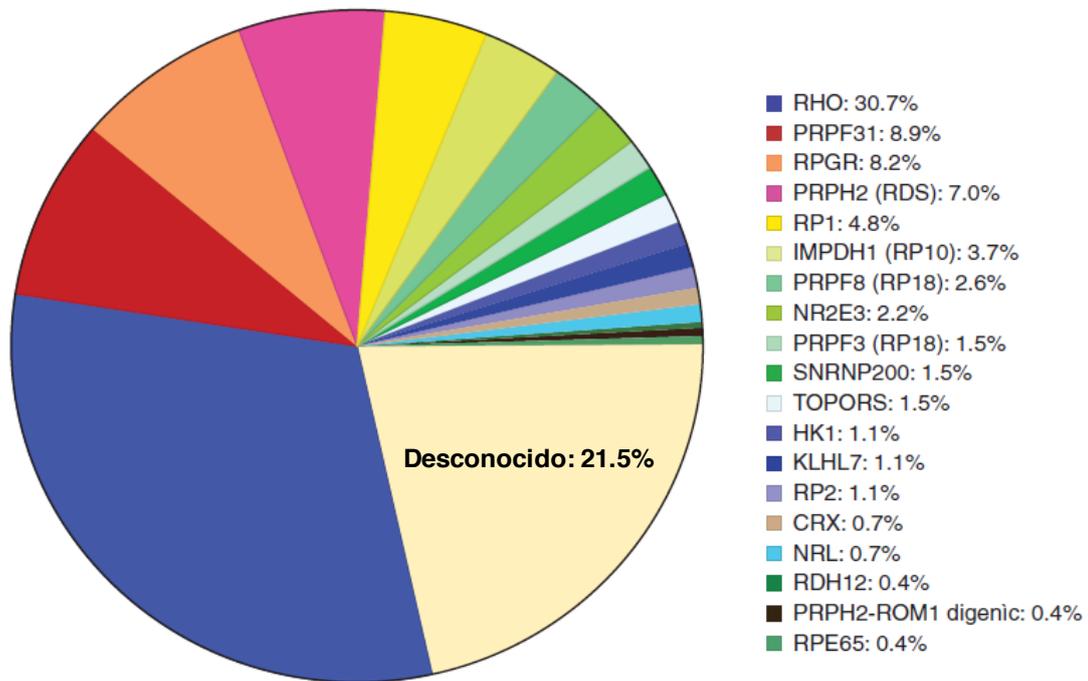
### **Autosómica recesiva (arRP)**

Es el tipo más frecuente para la transmisión de la retinosis pigmentaria. Los progenitores son portadores de la enfermedad pero no están afectados, en cambio sí puede haber familiar/es que presenten la patología. Por otro lado, es el tipo que, con mayor frecuencia, se suele presentar asociado a otras alteraciones o síndromes.

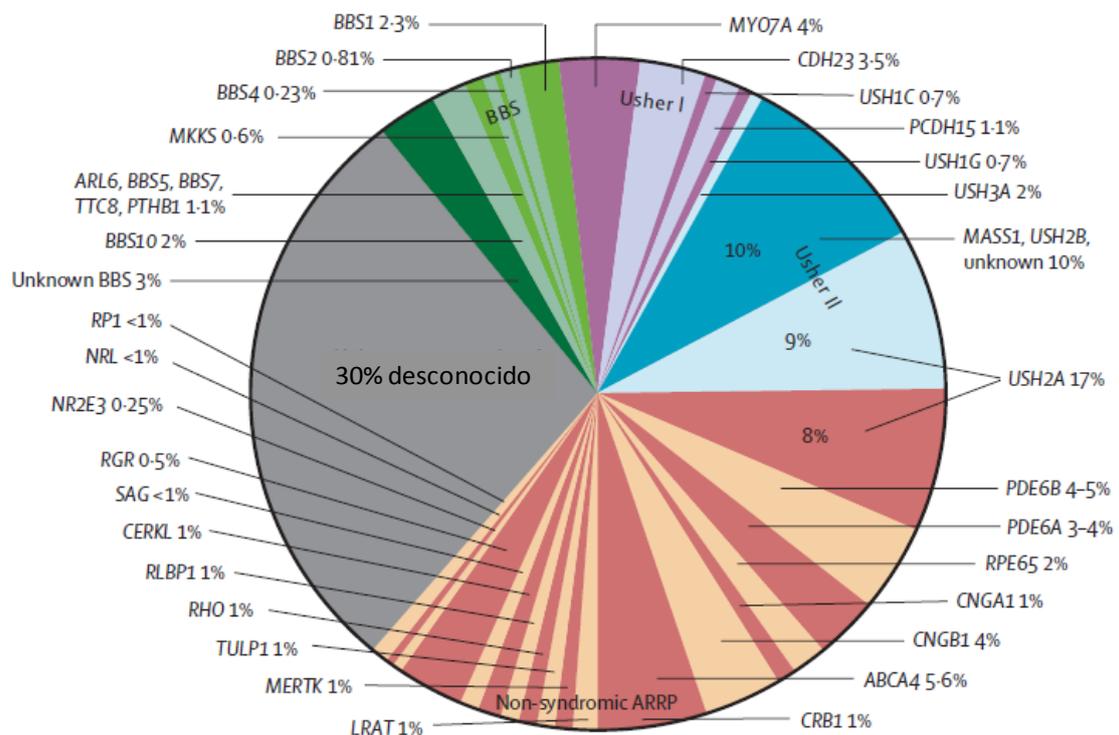
Más de 40 genes han sido relacionados con la retinosis pigmentaria autosómica recesiva. La mayoría de ellos son raros y causan solamente el 1% o menos de todos los casos de arRP<sup>19,30</sup>. Algunos genes como EYS, PDE6A, RPE65 y PDE6B tienen un porcentaje de prevalencia de hasta el 2-5%<sup>19,30</sup> (Figura 13).

### **Ligado al cromosoma X**

Suponen aproximadamente el 10-15% de todos los casos de RP<sup>19,30</sup>. Es transmitida por las mujeres, sin embargo, es el hombre quien la padece. Es el menos frecuente pero el más grave de los tipos de RP, ya que su evolución suele ser rápida. Hoy en día, si se conoce la mutación genética causante de la enfermedad, mediante un análisis de ADN se puede detectar si la mujer es portadora y establecer un diagnóstico prenatal y/o preimplantacional.



**Figura 12. Prevalencia de genes de casos de RP autosómica dominante.** Representan aproximadamente el 25-30% de todos los casos de esta enfermedad (modificado de Daiger et al., 2014<sup>29</sup>).



**Figura 13. Prevalencia de genes de los casos de RP autosómica recesiva.** Representan aproximadamente el 50-60% de todos los casos de esta enfermedad (modificado de Hartong et al., 2006<sup>18</sup>).

La mayoría de los casos de RP son monogénicos, es decir, causada por la alteración de un solo gen. Desde el descubrimiento del gen rodopsina, el primer gen directamente vinculado a esta enfermedad<sup>31</sup>, más de 100 genes han sido asociados a RP, de los cuales 70 corresponden a la forma no-sindrómica (última actualización en mayo de 2017 en: <http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/>). Sin embargo, los genes identificados hasta el momento solamente hacen posible la identificación de las mutaciones patógenas en el 60-70% de los casos de RP autosómica recesiva y autosómicos dominantes, 80-85% de los casos vinculados al X y el 85% de los casos de los síndrome de Usher y de Bardet-Biedl<sup>21,32</sup>. Por lo tanto, es necesario avanzar en el descubrimiento de nuevos genes o regiones del genoma implicados en el desarrollo de la enfermedad para poder determinar las causas genéticas del resto de los casos de RP todavía sin diagnosticar.

Para una actualización de la información genética y genómica en relación con trastornos genéticos de la retina, están disponibles varias bases de datos, entre las que se incluyen:

<http://www.sph.uth.tmc.edu/retnet/>

<https://www.omim.org/>

El diagnóstico genético es de vital importancia en estos pacientes ya que el descubrimiento de las causas genéticas supone el poder realizar el adecuado consejo genético a las familias afectadas y poder también beneficiarse en un futuro de posibles tratamientos como la terapia génica o edición génica, ya que sin el conocimiento de la causa molecular no se podrían establecer terapias adecuadas y específicas para corregir la alteración genética de cada paciente.

#### ***4.1.3 Sintomatología de la RP***

Al tratarse de una enfermedad genética, las personas afectadas tienen la enfermedad desde el nacimiento, pero los problemas asociados a la misma suelen iniciarse entre la lactancia y la adolescencia, siendo alrededor de la edad adulta temprana cuando adquiere un carácter más incapacitante en la mayoría de los casos. Por tanto, la persona

afectada no es consciente de su enfermedad hasta que ésta se encuentra en fases avanzadas.

En general los primeros síntomas suelen manifestarse en los primeros años de la adolescencia y la discapacidad visual severa se produce a los 40-50 años de edad<sup>32</sup>. La típica progresión de los síntomas de los individuos afectados comienza en la adolescencia con la experimentación inicial de dificultades para adaptarse a la oscuridad o ceguera nocturna (nyctalopia, debido a la degeneración de los primeros bastones), seguida de una reducción progresiva de la visión periférica en la edad adulta temprana (visión en túnel o en cañón de escopeta, Figura 14) debido a la continua muerte de más bastones en las zonas periféricas de la retina. A veces, y debido a la degeneración secundaria de los conos, en el estadio final de la enfermedad se puede dar pérdida de visión central o ceguera completa<sup>18,26</sup>.

No obstante, hay que tener en cuenta que existe gran heterogeneidad clínica en la RP. La manera en que se presentan los síntomas varía de un caso a otro, especialmente en cuanto a la severidad y a la velocidad con que avanza la enfermedad. Uno de los factores determinantes en la variabilidad en la progresión y en la gravedad de esta enfermedad es su modo de herencia. En general, aquellos enfermos con patrón de herencia ligada al cromosoma X sufren una evolución más rápida que aquellos con patrón de herencia recesiva, y de igual manera los enfermos con patrón de herencia recesiva evolucionan más rápidamente que los de patrón de herencia dominante<sup>30</sup>. De todas maneras, se ha visto entre pacientes con el mismo patrón de herencia e incluso entre individuos de una misma familia con la misma mutación patogénica, una progresión muy dispar de los síntomas, lo que sugiere la implicación de otros factores moleculares que pueden estar modulando el desarrollo de la enfermedad además del defecto genético en sí mismo.



**Figura 14. Comparativa visión normal y visión de paciente con RP.** En estas dos imágenes se comparan la visión normal de un individuo no afectado por Retinosis pigmentaria (izquierda) y un individuo afectado por RP que ha desarrollado la denominada visión en túnel o en cañón de escopeta a causa de la pérdida progresiva de fotorreceptores bastón ([www.medicalcenter.osa.edu](http://www.medicalcenter.osa.edu)).

En la retinosis pigmentaria, la mayoría de las mutaciones ocurren en las proteínas específicas de los bastones. Sin embargo, cuando los bastones mueren, hay una pérdida secundaria de fotorreceptores cono, a pesar de que no hay nada inherentemente patológico en ellos. En muchas de las EHDR, una mutación en los bastones (como en ciertas formas de RP y en la enfermedad de Stargardt<sup>33</sup>) o en células de soporte tales como el RPE (como en algunas formas de LCA<sup>34</sup> y RP), provoca una pérdida secundaria de conos debido a la pérdida del soporte trófico de los bastones. Como ya hemos comentado anteriormente, la periferia de la retina consiste principalmente en bastones, mientras que los conos comprenden la mayor parte de la mácula y toda la fovea, en el área central de la retina (Figura 5); por lo tanto, la pérdida de bastones causa defectos periféricos de visión y ceguera nocturna sin efectos significativos en la visión diurna y central. La pérdida secundaria de conos es el síntoma más devastador para los pacientes, ya que los conos transmiten visión en color y visión de agudeza alta o de precisión. Esta pérdida supone una gran limitación o impedimento en la ejecución de movimientos y actividades de precisión habituales en la vida cotidiana de cualquier persona sin disfunción visual, hecho que afecta gravemente al desarrollo personal y social de los pacientes de RP<sup>35</sup>.

#### ***4.1.4. Mecanismos moleculares de la RP***

La base genética y las mutaciones que conducen al desarrollo de RP son altamente complejas y heterogéneas. Las mutaciones en genes que causan otras retinopatías hereditarias como la enfermedad de Stargardt, la ceguera nocturna estacionaria congénita y la amaurosis congénita de Leber (LCA) también se han asociado con la RP. Además, se ha visto que los genes que causan formas sindrómicas de RP, como el síndrome de Bardet-Biedl, también se han identificado como la causa de RP no sindrómica<sup>36,37</sup>. Esta superposición genética entre RP y otros tipos de distrofias retinianas hereditarias sugiere similitudes fundamentales de los mecanismos subyacentes y las vías genéticas comunes, a pesar de las diferencias en las características clínicas.

La degeneración de la retina puede desencadenarse por mutaciones o defectos genéticos en diferentes genes involucrados en diversas vías metabólicas relacionadas con funciones fisiológicas clave de la retina. Incluyen proteínas de la transducción visual de bastones (rodopsina, fosfodiesterasas de bastones y las subunidades a y b del canal GMPc de bastones), las proteínas del citoesqueleto (periferina/RDS, ROM1, fascina 2), proteínas responsables del tráfico intracelular (RPGR, RP1, RP2, prominina-like 1), proteínas involucradas en la diferenciación de fotorreceptores (NRL, NR2E3, CRX), en el corte y empalme (splicing) del mRNA (PRPC8, HPRP3, PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31, PAP1, SNRNP200), en la composición de las matrices extracelulares (USH2A) y en las vías metabólicas de lípidos (ABCA4, CERKL), nucleótidos (IMPDH1) u otras sustancias (TULP1, CRB1, MITS2, CA4, SEMA4A).

Además, la RP también está causada por mutaciones en los genes expresados en los tejidos de apoyo al fotorreceptor, como el epitelio pigmentario de la retina (RPE). Las proteínas codificadas por estos genes están involucradas en el metabolismo del retinol (retinol isomerasa RPE65, el 11-cis retinoide transportador CRALBP, la lecitina retinol acilo transferasa LRAT, RGR) o en la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (MERTK). De todas maneras, a pesar de los avances en el descubrimiento de las alteraciones genéticas relacionadas con RP, los mecanismos biológicos por los que las mutaciones genéticas inducen la muerte de las células fotorreceptoras no han sido plenamente dilucidados en muchos de los casos de RP<sup>38-40</sup>.

Sin embargo, es destacable el hecho de que a nivel celular y molecular, la respuesta a la lesión de la retina es similar en la mayoría de los tipos de RP. Los defectos genéticos inducen en última instancia un conjunto de señales celulares que conducen a cambios morfológicos y funcionales bien establecidos y similares, incluida la muerte celular controlada y la remodelación de la retina<sup>23,41</sup>. Curiosamente, la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo y la activación de las vías apoptóticas son características comunes en todas estas enfermedades<sup>41-43</sup>. Además, es importante tener en cuenta el papel relevante de las células gliales, incluidos los astrocitos, las células de Müller y la microglia, ya que su respuesta a la lesión es decisiva para mantener la salud o para provocar la degeneración de la retina.

La muerte celular y la inflamación son procesos estrechamente relacionados y la neuroinflamación ha sido estudiada como componente crítico en la progresión de diversas enfermedades neurodegenerativas<sup>44</sup>. Ha sido demostrado que las citoquinas pro-inflamatorias se incrementan sustancialmente en el humor acuoso y en el vítreo de los pacientes con RP<sup>45</sup>. Además, un mayor nivel de inflamación ocular, medido por la oftalmoscopia de lámpara de hendidura o por fotometría, se correlaciona con peor función visual en pacientes con RP<sup>45,46</sup>, apoyando la interacción entre la muerte de los fotorreceptores e inflamación intraocular. De acuerdo con estos hallazgos, los estudios experimentales mostraron que la activación y reclutamiento de las células de la microglia inflamatorias de la retina ocurre en el inicio o en una fase temprana de la degeneración retiniana<sup>45,47</sup> y que esta activación contribuye a la muerte de las células fotorreceptoras bastones y conos en modelos animales de RP<sup>48,49</sup>.

## **4.2. Modelos animales de degeneración retiniana**

Existen muchos y diversos modelos animales para la investigación de la degeneración retiniana, como por ejemplo ratones, ratas, conejos, cerdos, pez cebra, perros y primates no humanos. Pero sin duda, el modelo animal más ampliamente utilizado en el estudio de las enfermedades degenerativas de la retina es el roedor, y más concretamente el ratón. Una de las razones es que el sufrimiento de los ratones al quedarse completamente ciegos de ambos ojos no supone tanto desgaste como para un animal más grande (por ejemplo, conejo o gato), teniendo en cuenta la capacidad específica de

la especie animal para sufrir y a que, como animales nocturnos, los ratones tienen que orientarse predominantemente en la oscuridad. Sus órganos sensoriales más importantes para la comunicación intraspecie y el monitoreo ambiental son las vibrisas y su sentido del olfato, dejando en un segundo plano la visión. Por el contrario, el estrés de los animales diurnos (activos durante el día y durmiendo por la noche) o crepusculares (activos principalmente durante el crepúsculo) después del desarrollo de una ceguera completa parece ser mayor, aunque estos animales también tienen otros órganos sensoriales muy desarrollados. Además, los ratones tienen otras ventajas y características especiales que hacen que sean los animales de elección para todo tipo de investigaciones, incluyendo, entre otros, cáncer, inmunología, metabolismo, biología del desarrollo, diabetes, obesidad, envejecimiento, y estudios cardiovasculares<sup>50</sup>. Entre estas características se encuentran su bajo costo, reducido tamaño, su corto período de gestación, su facilidad de reproducción dentro del ambiente del laboratorio y la capacidad de realizar manipulaciones genéticas, característica importante y necesaria para producir modelos de ratón con mutaciones en los genes de elección.

Diferentes modelos murinos han sido investigados con el fin de comprender mejor las diversas formas de enfermedades degenerativas de la retina<sup>51-53</sup>. Curiosamente, fueron los estudios en ratón los que condujeron a la identificación de la apoptosis como mecanismo importante de la muerte de fotorreceptores en la degeneración retiniana<sup>54,55</sup>. Los más de 100 modelos murinos de RP se clasifican básicamente en dos grupos dependiendo de si la degeneración del fotorreceptor es inducida por tratamiento físico o químico, o por una modificación genética (modelos animales genéticos). En este primer grupo se incluirían modelos animales a los que se les induce degeneración retiniana mediante por ejemplo incidencia directa de altas intensidades de luz<sup>56</sup> o mediante ablación selectiva de células de Müller de la retina<sup>57</sup>. En el segundo grupo nos encontramos con los modelos animales de degeneración retiniana producida por modificaciones genéticas.

#### ***4.2.1 Modelos murinos genéticos de RP***

Los primeros modelos hereditarios documentados para la degeneración retiniana fueron una cepa de ratón, denominada ratón r, que carecía de fotorreceptores bastones<sup>58</sup>. Casi 30 años después se descubrió una cepa de ratón (ratón rd) por Bruckner y

colaboradores, la cual se cree que son los mismos ratones *rd* extintos que han sido redescubiertos como ratones *rd*<sup>59</sup>. *Rd* es la abreviatura de “retinal degeneration” o degeneración retiniana en castellano<sup>51</sup>. Hasta la fecha, se han identificado quince mutantes de ratón “naturales”, con mutaciones que se han generado de forma espontánea, que presentan degeneración de fotorreceptores. Paralelamente a la identificación de nuevos genes de la enfermedad retiniana, se han ido generando numerosos modelos de ratón manipulados genéticamente. El Laboratorio de Jackson ha desarrollado una gran colección de mutantes de ratones de *rd*. En la Tabla 1 se presenta un breve resumen de la degeneración de la retina en varios modelos de ratón, sus loci con defecto genético, junto con su homólogo cromosómico correspondiente en humanos y el inicio de la enfermedad.

**Tabla 1. Modelos de la degeneración retiniana en ratones.** 15 mutantes naturales del ratón para la degeneración de fotorreceptores con la preservación de otros tipos de células de la retina.

	<b>Gene</b>	<b>Mouse Chromosome</b>	<b>Human Chromosome</b>	<b>Retinal ONL Disappear (months)</b>
Retinal degeneration 1	<b>Pde6b<sup>rd1</sup></b>	5	4p16	1
Motor neuron degeneration	<b>mnd</b>	8	8p or 13q	6
Nervous	<b>nr</b>	8	8p or 13q	10
Purkinje cell degeneration	<b>pcd</b>	13	5q	13
Retinal degeneration 2	<b>rds/Prph2<sup>rd2</sup></b>	17	6p	12
Retinal degeneration 3	<b>rd3<sup>rd3</sup></b>	1	1q32	4
Retinal degeneration 4	<b>rd4</b>	4	1p3	2
Retinal degeneration 5	<b>rd5</b>	7	11p15	8
Retinal degeneration 6	<b>rd6</b>	9	11q23	24
Retinal degeneration 7	<b>rd7</b>	9	15q23	30
Retinal degeneration 9	<b>rd9</b>	X	X21.1	3
Retinal degeneration 10	<b>Pde6b<sup>rd10</sup></b>	5	4p16	2

#### 4.2.2 Ratón *Pde6b*<sup>rd10</sup>

Para identificar posibles miRNAs asociados con la etiología de la RP, en este proyecto utilizamos el ratón *Pde6b*<sup>rd10</sup>. Esta cepa mutante, descubierta hace más de 15 años y más conocida como ratón rd10, es un modelo que se produce de forma natural<sup>60</sup>. Está bien caracterizado y ha sido ampliamente utilizado en el ámbito experimental. Los análisis genéticos muestran que estos ratones rd10 llevan una mutación puntual espontánea sin sentido (missense) en el exón 13 de la subunidad  $\beta$  de la fosfodiesterasa de tipo 6 (PDE6 $\beta$ ) específica de bastones (gen *Pde6b*). Este gen juega un papel fundamental en el proceso de la fototransducción visual regulando el nivel citoplasmático de la guanosina monofosfato cíclico (GMPc) en los fotorreceptores bastones en respuesta a la luz (ver apartado 3 de la introducción). Cuando un fotón es absorbido por la rodopsina, la PDE6 se activa, lo que reduce el nivel de GMPc. Esto conduce al cierre de los canales catiónicos de GMPc ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) que luego hiperpolarizan la membrana plasmática del bastón y, en última instancia, generan una señal visual. El resultado bioquímico de una mutación en este gen, por lo tanto, es una fosfodiesterasa no funcional que provoca la ruptura de la cascada de fototransducción y la acumulación de GMPc. Esto conlleva, por tanto, una desregulación intracelular de la homeostasis del calcio en los segmentos exteriores de los bastones que conduce a la muerte de las células fotorreceptoras mediante apoptosis; primero mueren los bastones y luego los conos, empezando desde el centro de la retina extendiéndose hacia la periferia de la misma<sup>51,61</sup>.

Exámenes histológicos de diferentes autores han revelado que la degradación celular se inicia típicamente en la retina central después de 16 días desde el nacimiento (P16) y el pico de degeneración de los fotorreceptores se alcanza a P25<sup>51,62,63</sup>, momento en el que solamente quedan dos o tres capas de fotorreceptores. Chang y colaboradores observaron la pérdida completa de fotorreceptores a P60, mientras que las capas internas de la retina sobreviven y el espesor de la capa de células ganglionares y la capa nuclear interna no disminuye<sup>51</sup>. No obstante, otros autores sí han observado que, por ejemplo, las células horizontales y células bipolares de bastones y conos, sufren remodelación, es decir, cambios morfológicos y funcionales<sup>61-64</sup>. Tal remodelación también se ha documentado en pacientes con RP autosómica recesiva (arRP)<sup>24,65</sup>. En cuanto a la respuesta eléctrica de los fotorreceptores, los electroretinogramas (ERGs) de los ratones homocigotos para la mutación nunca son normales, con respuesta máxima a las 3 semanas de edad y no detectable a los 2 meses del nacimiento.

Junto al ratón rd10, hay muchos otros modelos murinos de degeneración retiniana comparables, como es el ratón rd1 antes mencionado. Sin embargo, el ratón rd1, en comparación con el ratón rd10, tiene una aparición más temprana y una degeneración retiniana más rápida con comienzo a P8 y en el que a las 4 semanas de edad no quedan fotorreceptores vivos. De esta manera, el ratón rd10 emula mejor la lenta progresión del arRP típico y se considera una mejor herramienta para el estudio de la etiología de la arRP y para estudiar los efectos de diversas intervenciones terapéuticas ya que proporciona una ventana terapéutica más amplia. Además, en contraste con el modelo rd1, dicha ventana terapéutica puede ser ampliada mediante la cría de los ratones en oscuridad<sup>51</sup>. Se ha observado que privando a los ratones de luz, se retrasa el inicio de la degeneración retiniana y se enlentece el proceso degenerativo de la retina. Esta diferencia en el establecimiento de la enfermedad puede ser debida a que existe una actividad residual del PDE6 $\beta$  en retinas de los ratones rd10, actividad que puede prevenir el aumento tóxico temprano de GMPc en la vida del ratón, retrasando así el inicio de la muerte celular de los fotorreceptores.

Entre los genes arRP identificados hasta el momento, las mutaciones dentro de los genes PDE6 $\alpha$  y PDE6 $\beta$  son, de hecho, la segunda causa identificable más común de arRP en humanos. Alrededor de 36.000 casos de RP en todo el mundo se deben a defectos en el complejo PDE6, que se calcula que representan aproximadamente el 8% de todos los arRP diagnosticados<sup>19,21</sup>. Más concretamente, las mutaciones en el gen que codifica la subunidad beta de la fosfodiesterasa del bastón (PDE6B) son la causa identificada más común de arRP, representando aproximadamente el 5% de todos los casos de arRP en todo el mundo y el 4% y el 6% de los casos en Norteamérica y en España, respectivamente<sup>18,19,66</sup>. Por lo tanto, los ratones rd10 proporcionan un modelo útil de RP que se asemeja mucho a la enfermedad humana emulando la progresión típica de la RP autosómica recesiva en humanos.

Por todo ello, el ratón rd10 es un modelo animal bien establecido y ampliamente utilizado en el estudio de la RP autosómica recesiva. Este ratón se ha utilizado bien para el testado de diferentes tipos de intervenciones terapéuticas para mejorar la supervivencia de los fotorreceptores y/o la respuesta visual<sup>67-69</sup> o en estudios centrados en el análisis de los cambios celulares y moleculares subyacentes a la degeneración retinal<sup>48,70-72</sup>.

### 4.3. Tratamientos para la RP

Desde un punto de vista terapéutico, no existen a día de hoy formas de tratamiento estandarizadas y eficaces para esta enfermedad ocular, pero el descubrimiento de las causas moleculares en un número importante de casos ha permitido diseñar diversos ensayos que están progresando gradualmente desde los modelos animales hasta los ensayos clínicos en humanos con resultados prometedores (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=retinitis+pigmentosa>).

Se han desarrollado diferentes enfoques en un intento de preservar la función de la retina o de restaurar la visión en condiciones patológicas mediante diferentes aproximaciones. En este contexto, las líneas de investigación más avanzadas incluyen: la terapia génica<sup>73-75</sup>, el empleo de factores neurotróficos<sup>76,77</sup>; la terapia celular y regenerativa<sup>78-80</sup>; la edición genética con CRISPR<sup>81,82</sup>; y las prótesis electrónicas<sup>83,84</sup>.

La accesibilidad de la retina para procedimientos quirúrgicos relativamente seguros y el privilegio inmunitario del ojo (combinación de mecanismos locales y sistémicos para limitar las respuestas inmunes e inflamatorias en el ojo) han hecho de las enfermedades de la retina el escenario ideal para utilizar herramientas de vanguardia, como la terapia génica y la terapia con células madre, que tienen el potencial de producir un tratamiento efectivo para algunos tipos de RP.

No obstante, en la RP se dan una serie de características que dificultan en gran medida avanzar en el desarrollo de terapias, como son su gran heterogeneidad genética y clínica. Además, es destacable mencionar que las diferentes terapias deben aplicarse en la etapa apropiada de degeneración de la retina para obtener resultados exitosos. En este sentido, para los distintos estadios del proceso neurodegenerativo que nos encontramos en RP, es necesario el desarrollo de un repertorio diverso de abordajes terapéuticos adaptados a cada paciente. Así, en las etapas iniciales, en las que existe una preservación de la mayoría de los fotorreceptores, estrategias neuroprotectoras como la terapia génica, el uso de factores neurotróficos, suplementos alimenticios (vitaminas o antioxidantes) o una combinación de estas técnicas podrían ser alternativas terapéuticas adecuadas y beneficiosas, mientras que en aquellos pacientes con estados más avanzados de la enfermedad, en la que la disfunción visual está asociada a una muerte significativa de fotorreceptores y otros tipos celulares de la retina, serían necesarios otros abordajes terapéuticos, como el uso la terapia celular o de prótesis electrónicas<sup>85</sup>.

## Terapia génica

Con respecto a la terapia de reemplazo genético o terapia génica, en síntesis, se trata de una técnica que utiliza la maquinaria de los virus para insertar genes no mutados en las células de los pacientes, para que éstas generen las proteínas funcionales. Este es un método potencialmente eficaz para enfermedades genéticas con mutaciones recesivas, en las que no se produce ninguna proteína funcional. Un elevado número de diferentes tipos de RP han sido tratadas con éxito mediante terapia génica en modelos animales de la enfermedad, utilizando estrategias de reemplazo genético para restablecer la función visual de los animales<sup>74,86</sup>. En el caso de los humanos, los estudios más avanzados en este campo han dado lugar a los primeros ensayos clínicos en los que se introdujo la copia correcta del gen alterado mediante una inyección sub-retiniana con virus adeno-asociados (AAVs, por sus siglas en inglés). Estos ensayos demostraron seguridad y lograron la recuperación parcial de la visión en pacientes con distrofias retinianas tales como la Amaurosis congénita de Leber tipo 2, la coroideremia o el síndrome de Usher<sup>87-90</sup>. De esta manera, gracias a la demostración de seguridad y eficacia en estos estudios en fase I y II, la terapia génica ha ganado impulso considerable aumentando la inscripción de pacientes a estos estudios, y propiciando que un ensayo clínico de fase III de AAV-RPE65 para LCA esté en estos momentos comercializado (NCT00999609) y otro de fase I/II de AAV-MYO7A (NCT01505062) para el síndrome de Usher.

Sin embargo, a pesar de que se lograron mejoras en la función visual de algunos de los pacientes que recibieron terapia génica en los ensayos iniciales, un posterior estudio de seguimiento realizado a dichos pacientes mostró que los fotorreceptores continuaban muriendo en las retinas tratadas. En este sentido, Beltran y colaboradores sugieren que la degeneración de la retina puede ser revertida en las primeras etapas de la enfermedad, antes del comienzo de la pérdida de los fotorreceptores. Estos autores observaron como en ensayos realizados en perros, la terapia génica fue eficaz para preservar la función visual y prevenir la degeneración de los fotorreceptores durante más de dos años<sup>86</sup>, pero solamente cuando los virus fueron inyectados antes de que la pérdida de los fotorreceptores hubiera comenzado, mientras que la terapia génica no pudo prevenir la degeneración de los fotorreceptores una vez comenzada la pérdida de los primeros fotorreceptores. De acuerdo con esta hipótesis, la terapia génica sólo prevendría la degeneración retiniana en pacientes jóvenes que no muestran signos de pérdida de fotorreceptores. La naturaleza de este "punto de no retorno" se está abordando en

modelos preclínicos, en animales, para encontrar posibles vías para eludir esta barrera a la terapia génica en humanos<sup>91</sup>. Una de las opciones que se barajan es la implementación de terapias conjuntas, terapia génica junto a otras terapias como farmacológicas o de otra índole que logren preservar la anatomofisiología de la retina el máximo tiempo posible para asegurar así el efecto de la terapia génica en el mayor número de células fotorreceptoras posibles.

Otra limitación de la terapia génica es su especificidad para cada tipo de mutación, que se hace particularmente evidente en enfermedades tan complejas como la RP con un gran número de genes y mutaciones involucradas en su desarrollo. Por ejemplo, en el caso de la terapia para la LCA tipo 2, solamente el 0.5% de los pacientes presentan mutaciones en el gen RPE65, por lo tanto el 99.5% restante quedaría excluido.

Otra de las limitaciones radica en que los trastornos heredados de manera dominante son difíciles de tratar usando la terapia génica. En este tipo de herencias, el gen mutado produce una proteína tóxica y las proteínas producidas por la copia correcta del gen introducido artificialmente mediante la terapia génica no son capaces de superar dicho efecto tóxico y se degradan. En los casos de herencia dominante, aparte de introducir la copia correcta del gen mutado, habría que desarrollar estrategias para silenciar la proteína generada por el gen mutado, lo que a día de hoy supone una gran limitación técnica.

El AAV ha sido el vector de elección en la mayoría de los ensayos de terapia génica para la RP, debido sobre todo a su falta de patogenicidad, a su capacidad de infectar muchos tipos de células humanas a un ritmo eficiente y a que permiten una expresión transgénica estable a largo plazo<sup>92</sup>. La retina, que forma parte del sistema nervioso central, es un sitio inmunológicamente privilegiado y tiene poca respuesta inmune a la terapia génica con administración de AAV, aunque en algunos casos se puede producir una respuesta inmune innata a AAV produciendo inflamación leve en los sitios de inyección<sup>93</sup>. Sin embargo, el uso de AAV como vector para la terapia génica se ha visto limitado por su capacidad para transportar un máximo de 4,5 kb de ADN, que es un tamaño relativamente pequeño<sup>92</sup>. De hecho, en el caso de la RP, muchos de los genes implicados con el desarrollo de la enfermedad exceden en tamaño a dicha capacidad de los AAVs, resultando en una clara desventaja para la aplicación de esta estrategia terapéutica en los casos en los que dichos genes estén alterados.

## **Factores de crecimiento locales, factores neurotróficos y moléculas neuroprotectoras**

Otra vía en desarrollo para tratar la degeneración retiniana es el uso de factores de crecimiento locales o factores neurotróficos (proteínas o hormonas esteroideas) producidos por los propios bastones o por otras células circundantes. En el ojo, las principales fuentes de estas moléculas son las células retinianas de RPE y las células de Müller. La administración exógena de estos factores pro-supervivencia, ya sea individualmente o en combinación, se ha utilizado en un intento por mejorar la degeneración de la retina. Entre estos factores destaca el factor neurotrófico ciliar (CNTF), producido por varias células neuronales, que ha demostrado capacidad para preservar los conos y los bastones en modelos animales<sup>73,94</sup>. En un ensayo de fase II, el CNTF consiguió aumentar la supervivencia del cono, pero no hubo mejoría en la función visual<sup>95</sup>.

Otro factor que ha ganado considerable atención en los últimos 10 años es el factor de viabilidad del cono derivado de bastón (RdCVF). Un estudio mostró que la terapia génica con administración de RdCVF mediante vectores virales prolongaba la supervivencia del cono en un modelo murino de degeneración retiniana<sup>96</sup>.

Moléculas neuroprotectoras como el ácido tauroursodeoxicólico (TUDCA) y la pro-insulina han demostrado eficacia en el tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina preservando la estructura y la función de los conos y bastones<sup>43,97</sup>.

Para una revisión más extensa de los efectos *in vivo* de la administración exógena de diferentes factores tróficos en modelos animales véase Kolomeyer y Zarbin, 2014<sup>98</sup>.

## **Edición genética con sistema CRISPR/Cas**

Una alternativa terapéutica en auge para las enfermedades con componente genético y que se está desarrollando a pasos agigantados en los últimos años, es la edición de genes mediante la técnica conocida como CRISPR. La edición de genes es el principio de la reparación específica de genes diana, útil para estudiar la etiología y fisiopatología de las enfermedades y para estudiar los potenciales tratamientos en enfermedades genéticas. Esta técnica se adapta a partir de un sistema de defensa contra los virus

encontrados en las bacterias, llamadas repeticiones palindrómicas cortas intercaladas regularmente (CRISPR). Los CRISPR con frecuencia se hallan asociados con los genes *cas*, que codifican para proteínas nucleasas creando el sistema CRISPR/Cas. Al administrar la proteína Cas9 y los ARN (RNA, por sus siglas en inglés) guía apropiados a una célula, el genoma de esta puede cortarse en los lugares deseados, cuyas secuencias serán complementarias a las de los RNA guía utilizados. Esto permite la eliminación funcional de genes o la introducción o eliminación de mutaciones concretas<sup>99</sup>. Utilizando vectores virales de AAV para empaquetar la Cas9 y el RNA guía, ya se han editado genes específicos en el cerebro de ratones<sup>100</sup>. En otro experimento, la edición de genes usando el sistema CRISPR/Cas9 también se demostró que era capaz de modificar genes en células humanas incluyendo células iPS<sup>101</sup>. En cuanto a la RP, esta técnica se ha aplicado para la generación de modelos animales de degeneración retiniana<sup>102</sup> así como en terapia génica *in vivo* de la retinosis pigmentaria<sup>81</sup> y la amaurosis congénita de Leber<sup>82</sup>. Por ejemplo, Latella y colaboradores informaron de la viabilidad del sistema CRISPR/Cas9 para realizar edición génica y noquear *in vivo* el gen de la rodopsina humana (RHO) en el ratón transgénico P23H, modelo de RP.

Pero, al igual que sucede en la terapia de restitución génica, para poder aplicar esta técnica es necesario conocer la mutación génica responsable del desarrollo de la enfermedad, limitación considerable en enfermedades tan heterogéneas como la RP con tantos genes y mutaciones diferentes relacionados con su desarrollo.

### **Terapia celular**

Esta estrategia terapéutica se presenta como una alternativa emergente con gran potencial terapéutico. Mientras que la terapia génica se centra en corregir la alteración genética en las células existentes o remanentes, la terapia celular se basa principalmente en reemplazar las células del cuerpo que han degenerado en el proceso de la enfermedad.

En los últimos años se ha producido un gran avance en ensayos preclínicos en los que se implantan células madre (SC) y células madre pluripotenciales inducidas (iPS) reprogramadas a células del epitelio pigmentario e incluso a fotorreceptores<sup>103</sup>. Pero la RP ofrece un gran reto para la terapia celular ya que los fotorreceptores trasplantados deben integrarse en el circuito neural de la retina del huésped creando conexiones sinápticas con la INL. En este caso, los fotorreceptores maduros trasplantados son

ineficaces porque son incapaces de incorporarse a las conexiones neuronales de la retina. El uso de células con mayor potencial de diferenciación, como células progenitoras neurales, células madre o células progenitoras derivadas de las células de Müller (Müller glia-derived progenitors o MGDPs), ofrece la posibilidad de eludir esta cuestión debido a su mayor plasticidad<sup>104</sup>. Sin embargo, el trasplante directo de células madre conlleva ciertos riesgos, como el desarrollo de teratomas<sup>105</sup> o el rechazo de las células transplantadas. Entre las soluciones potencialmente eficaces estarían el trasplante de células precursoras de fotorreceptores, que han mostrado en modelos animales integrarse de manera eficaz en la retina del huésped y mejorar su capacidad visual<sup>79,106</sup> y la utilización de células iPS creadas a partir de los propios fibroblastos del paciente<sup>78,107</sup>. Utilizando un modelo de ratón de RP con el gen RPE65 defectuoso, se demostró que los trasplantes de células RPE derivadas de iPS son seguros y causan una mejoría funcional en el sitio de inyección medida por electroretinografía, con incorporación satisfactoria confirmada por histología<sup>78</sup>. Un ensayo clínico en Japón, iniciado en septiembre de 2014, fue el primero en utilizar células iPS en seres humanos<sup>80</sup>. Los fibroblastos de los pacientes se utilizaron para generar células iPS, que se diferenciaron en células RPE y se inyectaron en el espacio sub-retiniano. Al año después de la cirugía, la lámina celular transplantada permaneció intacta, pero la agudeza visual de los pacientes no mejoró, aunque tampoco empeoró.

Sin embargo, una de las desventajas del trasplante de las células iPS en el tratamiento de la RP es que las células madre pluripotenciales producidas utilizando células obtenidas del paciente generarán células maduras que tienen la misma mutación genética y por lo tanto la misma propensión a degenerar que las células del paciente, lo que no sería efectivo para formas agresivas de RP como en los trastornos heredados de manera dominante. Una opción para evitarlo sería la reversión de la mutación con sistemas de edición génica como los CRISPR en las células iPS antes de ser inyectadas en los pacientes. Esta estrategia ya se ha utilizado por ejemplo en animales con beta-talasemia con resultados prometedores<sup>108</sup>.

### **Implante de retina electrónica**

Por último, para los pacientes que tienen la enfermedad retiniana en etapa terminal, es decir, paciente con una degeneración visual y celular muy avanzada, un implante de retina electrónica se antoja como una alternativa terapéutica prometedora. Esta

alternativa terapéutica se ha convertido recientemente en una realidad después de años de investigación. Estos implantes, ofrecen restauración limitada de la percepción visual.

Producida por Second Sight Medical Products Inc. (Sylmar, CA), la prótesis retiniana Argus II, de 60 electrodos, ha demostrado mejora en la capacidad de más de la mitad de los 30 sujetos en un estudio para identificar la dirección del movimiento de un objeto en una pantalla en adultos mayores de 25 años con RP avanzada<sup>109</sup>. El dispositivo incluye una pequeña cámara de vídeo, un transmisor montado en unas gafas, una unidad de procesamiento de vídeo (VPU) y una prótesis retiniana implantada (retina artificial) o chip fototransductor colocado epiretinalmente (en la superficie de la retina). La VPU transforma las imágenes de la cámara de vídeo en datos electrónicos que se transmiten de forma inalámbrica a la prótesis de retina. Aproximadamente dos tercios de los pacientes no presentaron eventos adversos relacionados con el dispositivo o el procedimiento; Sin embargo, más de un tercio de los pacientes presentaron un total de 23 eventos adversos graves, incluyendo erosión conjuntival, dehiscencia, desprendimiento de retina, inflamación e hipotonía. El seguimiento realizado a los pacientes mostró estabilidad y seguridad a largo plazo, ya que se observó que 24 de los 30 pacientes permanecieron con el sistema Argus II en funcionamiento a los 5 años después del implante<sup>84</sup>. Todavía no hay suficientes datos para determinar la estabilidad a largo plazo en los humanos. Aunque este dispositivo no restaurará la visión de los pacientes, reemplaza la función de las células degeneradas en la retina y puede mejorar el desempeño de las actividades básicas de un paciente mejorando su capacidad de percibir imágenes y movimiento.

### **Suplementación alimenticia**

Hasta el momento, y mientras surgen y evolucionan nuevas terapias como las anteriormente mencionadas, el único tratamiento recomendado para la RP es la suplementación con palmitato de vitamina A y aceite de pescado rico en omega-3 a alta dosis, junto con la eliminación de la vitamina E de la dieta. Se ha observado que estos compuestos ralentizan la progresión de la enfermedad un 2% al año aproximadamente<sup>110</sup>, con dosis diarias altas de palmitato de vitamina A (15.000 U/d). Los efectos son modestos; Por lo tanto, este tratamiento debe ponderarse frente al riesgo incierto de los efectos adversos a largo plazo debido a grandes dosis crónicas de vitamina A. Además, este tratamiento con vitamina A no estaría recomendado para

aquellos pacientes con mutaciones en el gen ABCA4. Ya que en éstos la muerte de fotorreceptores está asociada a una excesiva acumulación de un derivado tóxico de la vitamina A.

Otro compuesto recomendado es el ácido Docosahexaenoico (DHA). El DHA es un ácido graso poli-insaturado omega-3 y antioxidante. Los estudios han demostrado una correlación de las amplitudes de ERG con la concentración de DHA de los pacientes<sup>111</sup>, aunque se deben hacer más ensayos clínicos para determinar el beneficio de DHA ya que otros estudios no fueron capaces de reproducir los beneficios del anterior estudio.

Como ya he comentado anteriormente, la complejidad genética en la etiología de la RP, que comprende más de 3000 mutaciones descritas en aproximadamente 70 genes diferentes<sup>112,113</sup>, supone la principal limitación para la aplicación de diferentes terapias como la terapia génica o la edición génica. Así mismo, todavía existe un 30-40% de pacientes con diagnóstico genético desconocido. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de desarrollar tratamientos alternativos a la terapia génica, dirigidos a la modulación de mecanismos moleculares comunes independientes a la mutación causante, con el fin de ralentizar significativamente la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, el desarrollo de un tratamiento de “amplio espectro” para la RP podría expandir de manera muy notoria el periodo de visión útil de la mayoría de pacientes de RP, de gran relevancia a su vez para expandir la ventana terapéutica mientras se avanza en el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas específicas para cada tipo de RP.

Pero para el desarrollo de estas terapias de amplio espectro sería necesaria la caracterización detallada de los procesos comunes que conducen al deterioro de la retina, como una estrategia para descubrir nuevas dianas terapéuticas. Como ya he mencionado con anterioridad, existe un gran número de rutas moleculares comunes implicadas en la supervivencia y muerte de los fotorreceptores. En este sentido se ha descrito la implicación de mecanismos epigenéticos, como la modulación génica mediada por microRNAs en procesos clave en la degeneración retiniana como la apoptosis e inflamación<sup>114,115</sup>. Además, se ha demostrado que los microRNAs actúan como actores clave en el desarrollo de la retina o en el control del proceso visual y también su implicación en diversos procesos patológicos de la retina.

## **5. MicroRNAs**

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de RNAs monocatenarios no codificantes de pequeño tamaño, de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. Juegan un papel crucial en la regulación post-transcripcional de la expresión génica mediante su unión a la zona 3'UTR de sus RNA mensajeros (mRNA) diana. Dicha unión puede conducir a la inhibición parcial de la traducción o provocar la degradación del mRNA<sup>116,117</sup>.

Los miRNAs se expresan en una amplia variedad de organismos, desde plantas hasta gusanos y humanos. La mayoría de los miRNAs están bien conservados entre especies, y muchos componentes de la maquinaria de los miRNA se han encontrado incluso en Archaea y eubacterias, lo que revela que su origen es antiguo<sup>118,119</sup>. Actualmente está bien establecido que los miRNAs juegan papeles reguladores claves en casi todos los aspectos de la biología, incluyendo procesos fisiológicos y patológicos. La desregulación de un solo miRNA o familias enteras de miRNAs está asociada con la patogénesis de diferentes enfermedades humanas<sup>120-124</sup>.

### **5.1. Historia de los miRNAs**

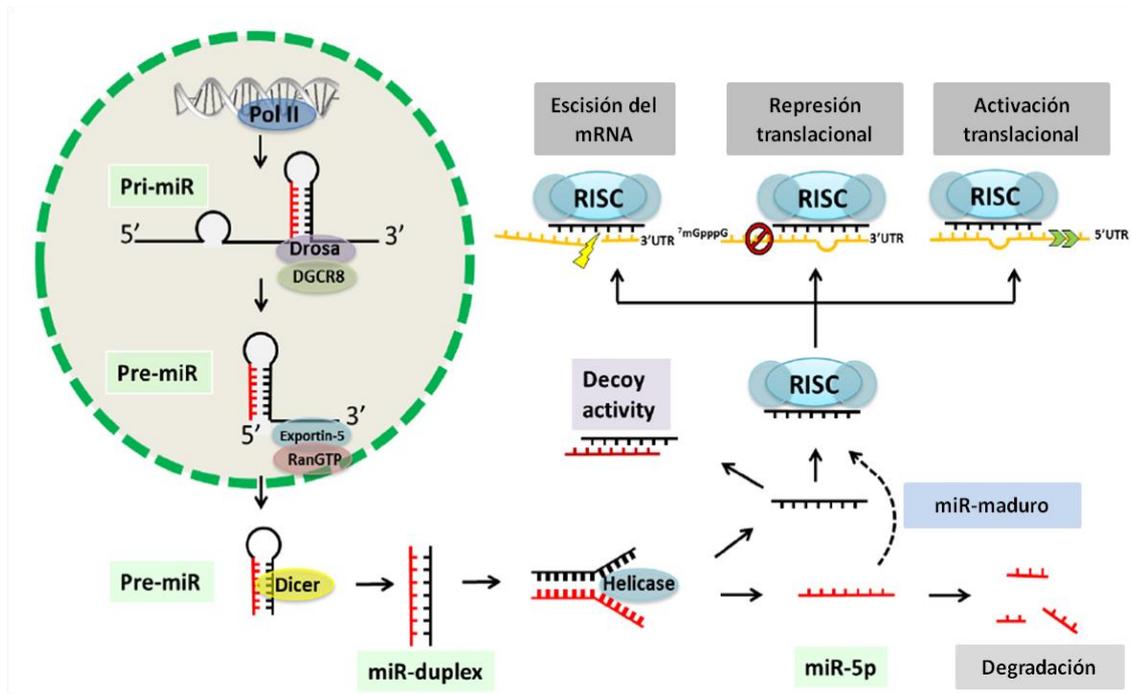
En las últimas décadas, nuestro conocimiento de la complejidad de la regulación de la expresión génica en células eucariotas se ha expandido drásticamente. Uno de los avances más significativos es el descubrimiento de los microRNAs. Estas moléculas fueron inicialmente descritas en 1993 por Lee y colaboradores en el laboratorio de Victor Ambros y por Wightman y colaboradores en el laboratorio de Gary Ruvkun<sup>125,126</sup>. Estos autores descubrieron que lin-4, una molécula que se pensaba era reguladora del desarrollo larval de *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), realmente no codificaba para proteína sino que codificaba un pequeño RNA de aproximadamente 22 nucleótidos que regulaba post-transcripcionalmente la expresión de la proteína LIN-14 ya que contenía secuencias parcialmente complementarias a múltiples secuencias en la 3'UTR del mRNA de lin-14<sup>125,126</sup>. Siete años después se encontró otro regulador del desarrollo de *C. elegans*, let-7, que generaba un RNA de 21 nucleótidos bien conservado a través de la filogenia animal, que reprimía el mRNA de lin-41<sup>127,128</sup>. Mientras lin-4 no tiene homólogo humano, el segundo miRNA descubierto, let-7, se

encuentra en los seres humanos y otras especies superiores<sup>128</sup>, por lo que se empezó a estudiar estas moléculas con mucha más atención.

Sin embargo, el término "microRNA" no se acuñó hasta 2001, año en el que fueron reconocidos como una clase distinta de reguladores biológicos en un conjunto de tres artículos publicados en Science<sup>129</sup>. Desde entonces, el campo de la biología de los miRNA ha avanzado a pasos agigantados, y se ha demostrado que los miRNAs desempeñan un papel muy importante en muchos procesos fisiológicos y del desarrollo celular incluido la apoptosis o la respuesta inmune entre otros<sup>130-133</sup>.

## **5.2. Localización genómica, biogénesis y función de los miRNAs**

La biogénesis de los miRNAs es un proceso de múltiples etapas que tiene lugar tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura 15). Primero, los genes de microRNAs se transcriben a partir del ADN genómico por la RNA polimerasa II como grandes transcritos primarios bicatenarios (pri-micro RNA), de aproximadamente 150 a 200 nucleótidos. Estos pri-miRNAs se pliegan en estructuras de horquilla gracias a que la secuencia de ADN que codifica para un gen de miRNA incluye la región miRNA y una región que es complementaria a la anterior. Posteriormente, estas estructuras son procesadas por una enzima nuclear de RNasa tipo III, llamada DROSHA, la cual corta las bases de la horquilla para formar los pre-miRNA, precursores de los miRNAs maduros de aproximadamente 70 nucleótidos. Estos pre-miRNAs son posteriormente transportados desde el núcleo al citoplasma por la exportina 5<sup>134</sup>. Son entonces catalizados por una segunda enzima de RNasa tipo III, la enzima DICER, dando lugar a una secuencia de RNA bicatenaria (dsRNA) de una longitud final de unos 20-25 nucleótidos<sup>57</sup>. Cada una de las hebras de ese dsRNA son miRNAs maduros, conocidos como miRNA-3p y miRNA-5p. Anteriormente se pensaba que solamente una de estas dos hebras era la que ejercía la acción biológica, mientras que la otra hebra era degradada, sin embargo la evidencia actual sugiere que ambas hebras pueden ejercer acción inhibitoria en la expresión génica.



**Figura 15. Mecanismos de la biogénesis de los microRNA y regulación de la expresión génica.**

Una vez se han generado los miRNAs maduros de cadena sencilla, estos se incorporan en una partícula ribonuclear para formar el complejo efector conocido como el complejo de silenciamiento inducido por miRNA, el miRISC. Este complejo es el responsable de inducir el silenciamiento génico postranscripcional (Figura 15).

Los miRNAs se encuentran en todas las eucariotas multicelulares. En plantas, los miRNA suelen mostrar complementariedad perfecta con regiones codificantes e inducen el corte y la posterior degradación del mRNA diana (como ocurre con los siRNAs en animales). Por el contrario, los miRNAs de los animales suelen mostrar complementariedad parcial o imperfecta con la región 3'UTR, y generalmente inhiben la traducción del mRNA<sup>131</sup>. Los miRNAs de animales son capaces de reconocer a sus mRNA diana tan solo mediante el uso de regiones de apenas 6-8 nucleótidos (la región semilla o “seed región” en inglés) en el extremo 5' UTR del miRNA que no es suficiente para inducir la escisión de los mRNA diana<sup>135,136</sup>. Por lo tanto, se podría decir que el tipo de represión depende del grado de complementariedad de bases entre el miRNA y el mRNA diana. Así, cuando hay complementariedad parcial se induce la

inhibición de la traducción, mientras que la complementariedad perfecta o casi perfecta resulta en la escisión del mRNA<sup>137</sup> (Figura 16Figura 16).



**Figura 16. Diferencias en el mecanismo de regulación génica en base al grado de complementariedad entre los miRNAs maduros y sus mRNA diana.**

Según la versión actual de la base de datos miRBase ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org), release 21), se han identificado más de 2000 miRNAs humanos, cada uno de los cuales se une a varios cientos de mRNA diferentes<sup>138</sup>, en gran parte debido al hecho de que la mayoría de los sitios diana del mRNA solo tienen complementariedad parcial con su correspondiente miRNA. Además, cada mRNA puede contener múltiples sitios de unión para diferentes miRNAs, resultando en una compleja red reguladora de la expresión génica. Tomados en conjunto, parece que relativamente pocos miRNAs pueden regular el 50-60% de los genes en los seres humanos y otros mamíferos<sup>138</sup>.

### 5.3. Detección y cuantificación de miRNAs

Existen varios enfoques para cuantificar la expresión de miRNAs en tejidos, células y fluidos corporales. Debido a que la expresión del transcrito pri- y pre-miRNA no se corresponde linealmente con el nivel de expresión de los miRNAs maduros, sólo la cuantificación de los miRNAs maduros indicará con precisión su presencia y regulación<sup>139</sup>. Se pueden emplear diferentes métodos para identificar y cuantificar los miRNAs. Los más ampliamente utilizados son los microarrays, la secuenciación de RNA y la PCR cuantitativa en formato de arrays<sup>140</sup>. Estos tres métodos permiten el

análisis de un gran número de miRNAs en paralelo y se pueden utilizar para la detección de expresión diferencial de miRNAs en diferentes enfermedades. Cada uno de estos métodos tiene sus ventajas y desventajas con respecto a los demás, y solamente la finalidad de los experimentos determinará su idoneidad. Los microarrays son una metodología ampliamente utilizada, costo-eficiente, fácil y rápida de analizar. Pero los datos obtenidos a partir de ellos requieren confirmación adicional por qPCR y el estudio está limitado al análisis de miRNAs conocidos representados en el array. Las tecnologías de qPCR en formato de arrays, como la matriz de baja densidad de Taqman (TLDA, por sus siglas en inglés) o las matrices de formato abierto (open arrays), permiten el análisis de hasta 750 miRNAs en paralelo. Aunque el análisis esté limitado a un número relativamente bajo de miRNAs comparado con los microarrays, la ventaja reside en que estas tecnologías tienen la opción de poder diseñarse a medida, por lo tanto, estas plataformas son más flexibles y permiten solamente el análisis de los RNAs de nuestro interés. Por último, gracias a los grandes avances recientes en la secuenciación de última generación, la secuenciación de RNA total o de RNA de pequeño tamaño ofrece una visión completa de todos los RNAs incluyendo los pri-miRNA y pre-miRNA. Este método ofrece la ventaja de tener el potencial para la identificación de nuevos miRNAs y permite la determinación de las diversas etapas de la biosíntesis para los miRNAs de interés, pero por el otro lado el análisis de los datos obtenidos es más complejo y suelen ser estudios más costosos económicamente<sup>141</sup>.

#### **5.4. miRNAs y enfermedades**

El control de la expresión de proteínas mediada por miRNAs se ha descrito como un mecanismo ampliamente utilizado para la regulación postranscripcional en un gran número de procesos biológicos tanto fisiológicos como patológicos de la biología, incluyendo la proliferación, la diferenciación, determinación del destino y muerte celular o la respuesta inmune y la oncogénesis entre otros<sup>142,143</sup>. Hay cada vez más evidencia de la participación de una desregulación en la expresión de miRNAs en un creciente número de enfermedades lo que apoya su contribución a los mecanismos patológicos de las mismas<sup>121-124,144</sup>. Entre ellas se incluyen varios tipos de cáncer, enfermedades neurológicas, de corazón o inflamatorias, así como en algunas enfermedades hereditarias como la fibrosis quística<sup>123,124,145-152</sup>. En consecuencia,

numerosos estudios se han centrado en el descubrimiento de miRNAs para utilizarlos como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de diferentes enfermedades y también como predictores de respuesta farmacológica<sup>153,154</sup>.

### **MiRNAs en retina y en enfermedades degenerativas de la retina**

Se han identificado más de 250 miRNAs con expresión en la retina (Karali et al 2010). Estudios recientes han demostrado la relevancia del DICER -una enzima clave en biogénesis de los miRNAs- en la función y supervivencia de los fotorreceptores<sup>155,156</sup>. En estos estudios en los que se suprimió específicamente dicha enzima en la retina de ratones, estos animales exhibieron una degeneración retiniana avanzada acompañada de pérdida de la función visual. Otros estudios han demostrado que ciertos miRNAs son clave en la retinogénesis y en la diferenciación a células de la retina, como el miR-28, el cual es capaz de inducir la diferenciación de las células de Müller hacia células fotorreceptoras<sup>104,157</sup> o el miR-410 que induce la diferenciación a células de RPE<sup>158</sup>. Otros miRNAs, como el cluster de expresión miR-183/96/182, son clave en la morfogénesis y en la conectividad sináptica de la retina<sup>159,160</sup>.

Al igual que en muchas otras condiciones humanas, en la actualidad hay numerosas evidencias que apoyan el interés de los miRNAs como potencial diana terapéutica para las distrofias retinianas. Se ha observado desregulación en la expresión de miRNAs en diversas enfermedades de la retina. De hecho, hay una creciente lista de miRNAs diferencialmente expresados en modelos humanos y animales de diferentes trastornos de la retina, incluyendo el miR-9, miR-34a, miR-125b y miR-155 en la degeneración macular<sup>161,162</sup>, miR-146a y miR-195 en retinopatía diabética<sup>163,164</sup> o miR-125b y miR-17 en retinoblastoma<sup>165,166</sup>. Además, se ha identificado un grupo de miRNAs anti-apoptóticos (miR-155, miR-146a y miR-29b) expresados diferencialmente durante la fase de muerte celular crónica en modelos caninos de degeneración retiniana<sup>167</sup>. Otros estudios en los que la degeneración de los fotorreceptores fue inducida de manera física en ratas y ratones, esta muerte celular daba lugar a perfiles de expresión diferencial de miRNA<sup>56,57</sup>.

Más concretamente en la Retinosis pigmentaria, Loscher y colaboradores describieron un patrón común de miRNAs aberrantemente expresado en cuatro modelos murinos de la enfermedad. A pesar de que diferentes genes (*Rho* y *Rds*) y patrones de herencia estaban involucrados, el miR-1, miR-133 y miR-142 fueron encontrados desregulados

de forma consistente en todos los modelos murinos de RP<sup>168,169</sup>. Estos estudios nos indicarían una posible alteración común en la expresión de miRNAs en modelos diferentes de RP que podrían abrir el camino a estrategias terapéuticas comunes aplicables a diferentes tipos de retinosis pigmentaria, independientemente de la naturaleza de su causa genética.

### **5.5. Tratamientos terapéuticos basados en miRNAs**

Los miRNA son secuencias reguladores de la expresión génica ideales para ser utilizadas en diferentes tipos de estudios o terapias, debido a su facilidad de ser transfectadas, a su resistencia a la acción de las nucleasas celulares y por tener una bioactividad larga<sup>104,170</sup>. Recientemente, se han desarrollado nuevas herramientas para modular *in vivo* e *in vitro* los miRNAs de manera selectiva<sup>171</sup>. Por un lado, los oligonucleótidos Anti-miRNA (AMO), originalmente llamados antagomirs, que son oligonucleótidos sintéticos diseñados con alta especificidad y complementariedad de al menos 15 nt con su miRNA diana para formar un dúplex de doble cadena, capaz de bloquear la actividad de un miRNA maduro. En esta línea, estos sistemas AMO han sido ampliamente utilizados con éxito en ensayo con animales y en cultivos celulares<sup>172-174</sup> y recientemente también en los primeros ensayos clínicos de fase I y II para pacientes con enfermedades tan diversas como enfermedades cardiovasculares (NCT03213743), hepatitis C<sup>175</sup> (NCT01200420), linfoma cutáneo (NCT02580552) o diabetes tipo 2 (NCT02826525).

Por el otro lado, los miRNA mimics o precursores de microRNAs son también oligonucleótidos sintéticos de doble cadena pero con una hebra guía idéntica al miRNA diana y otra hebra que contiene elementos de estabilización y absorción tales como el colesterol<sup>141</sup>. Están diseñados para simular la actividad de los miRNAs maduros endógenos. La introducción de un miRNA mimic en las células permite el análisis funcional y el estudio de las consecuencias fenotípicas del aumento de la actividad de un miRNA maduro. Al igual que con los sistemas AMO, recientemente se han desarrollado estudios en los que se han utilizado estos imitadores de miRNAs con resultados prometedores tanto en animales de experimentación y cultivos celulares<sup>104,176-178</sup>, como en humanos en ensayos clínicos (NCT02369198; NCT01829971; NCT02603224)<sup>179</sup>.

Para administrar el cassette de expresión del miRNA en las células diana se pueden usar vectores de transferencia génica virales, como virus adeno-asociado o lentivirus<sup>104,180</sup> como no virales<sup>173</sup>. Los vectores más ampliamente utilizados se basan en el virus adeno-asociado, los cuales no se integran en el genoma del huésped, sino que existen como episomas circulares extragenómicos, lo que disminuye significativamente el riesgo de oncogénesis de inserción. Por lo general, provocan respuestas inmunes mínimas y permiten una expresión transgénica estable a largo plazo en una variedad de células de la retina, como fotorreceptores, RPE, Müller y células ganglionares. Los vectores adenovirales también son vectores no integrativos; sin embargo, provocan respuestas inmunes mediadas por linfocitos T citotóxicos que limitan la duración de la expresión transgénica. Los vectores lentivirales inducen una transducción eficiente y gracias a su integración en el genoma de la célula huésped permiten una expresión transgénica estable a largo plazo en las estructuras oculares anteriores, incluido el endotelio corneal y la malla trabecular, además de los tejidos de la retina. Debido a que son vectores integrativos, se han suscitado preocupaciones sobre el riesgo de generar oncogénesis de inserción. También se han estudiado diversos métodos no virales de transferencia génica en aplicaciones oculares, incluido el uso de nanopartículas de ADN<sup>181,182</sup>, el sistema de integrasa  $\phi$ C31<sup>183</sup>, electroporación y lipofección<sup>184</sup>. Una de las limitaciones de estos sistemas radica en que permiten una transfección transitoria.

*HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

Partimos de la hipótesis de que, una alteración en la expresión de un grupo relativamente reducido de microRNAs (miRNAs) está involucrado en diferentes tipos de retinosis pigmentaria (RP). Esta alteración repercute en la expresión de genes clave en el desarrollo y/o evolución de distintas formas de la enfermedad con independencia del gen mutado. Por lo tanto, en el presente proyecto de tesis doctoral nos planteamos que el análisis de los patrones de expresión de miRNAs y mRNAs en ratones modelo de RP nos permitirá avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares de esta enfermedad ocular y permitirá también el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la modulación *in vivo* de los niveles de expresión de miRNAs.

### **Objetivos**

El principal objetivo del presente trabajo es identificar los miRNAs con expresión alterada en nuestro modelo murino de la enfermedad, el ratón rd10, y analizar el potencial terapéutico de un grupo de miRNAs diferencialmente expresados mediante su modulación *in vivo* e *in vitro*.

Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio del comienzo y evolución de la muerte celular de los fotorreceptores en retinas de modelo murino de RP, ratones rd10.
2. Análisis de la expresión global de miRNAs y mRNAs de retinas de ratones rd10 e identificación de miRNAs y sus genes diana con expresión alterada con posible implicación en el desarrollo y/o evolución de la degeneración retiniana.
3. Modulación de los niveles de expresión de una selección de miRNAs alterados y evaluación funcional de dicha modulación.

#### 3.1 Sistemas *in vivo*:

- 3.1.1. *Modulación*: mediante inyecciones sub-retinianas (SR) de virus adeno-asociados (AAVs)
- 3.1.2. *Evaluación funcional*: mediante análisis electroretinográfico (ERG) y análisis histológicos de las retinas (contaje del número de filas y grosor en capa de fotorreceptores).

3.2 Sistemas *in vitro*:

3.2.1. *Modulación*: mediante sistemas de transfección en células MUPH1.

3.2.2. *Evaluación funcional*: mediante ensayos de citotoxicidad y muerte celular.

4. Análisis del transcriptoma completo de retinas de ratones rd10 tratadas con moduladores de la expresión de miRNAs.

## *MATERIALES Y MÉTODOS*



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Animales y Declaración Ética**

El manejo de los animales y los experimentos se realizaron de acuerdo con la declaración de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) para el uso de animales en la investigación oftálmica. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Cuidado y uso de Animales del Instituto de Investigación Biodonostia y por el Comité de Ética en Investigación Clínica del País Vasco, España (CEIC-E).

En la presente tesis doctoral los estudios se realizaron utilizando dos tipos distintos de ratón: 1) ratones controles sanos C57BL/6J y 2) modelo de ratón de RP con degeneración retiniana de curso temporal intermedio, ratones Pde6b<sup>rd10/-</sup>. Ambas cepas fueron adquiridas en el Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME, EE.UU., [www.jax.org](http://www.jax.org)).

La cepa de ratones C57BL/6J es una de las cepas más utilizadas como ratón control en todo el mundo. Tienen una vida media de entre 2 y 3 años y su fondo genético les permite la máxima expresión de las mutaciones inducidas ([www.jax.org](http://www.jax.org)). A lo largo de toda la memoria de tesis nos referiremos a él como "WT" (wild-type) o como ratón control.

En cuanto a la cepa Pde6b<sup>rd10/-</sup>, es una cepa ampliamente utilizada en la investigación de las enfermedades degenerativas de la retina (ver sección 6.1 de la Introducción). Estos ratones tienen un fondo genético C57BL/6J. A lo largo de toda la memoria de tesis nos referiremos a él como ratón "rd10".

Los ratones de ambas cepas fueron criados y mantenidos en las instalaciones de la Plataforma de Animalario y Quirófano Experimental del Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia (IIS Biodonostia). Dicho centro cumple en todos sus extremos con la Directiva 2010/63/UE, y la normativa vigente sobre Protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos incluida la docencia, reflejada en el R.D. 53/2013 del 1 de febrero. Asimismo, dicho Centro de Experimentación Animal se encuentra registrado en el Departamento de Innovación, Desarrollo Rural y Turismo de la Diputación Foral de Gipuzkoa como centro Usuario con el número: ES200690050419. A su vez la instalación está en el registro de actividad de utilización confinada de Organismos Modificados Genéticamente de Tipo I (A/ES/11/05).

Los ratones fueron estabulados en racks ventilados, con jaulas independientes, con ultrafiltración de aire de entrada y salida a través de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air Filtres) absolutos de una eficiencia de 99,997% (filtra las partículas < 0.3 micras). Durante la estabulación, los animales fueron sometidos a un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas, y se mantuvieron bajo una temperatura aproximada de 22 °C, bajo humedad relativa del aire de 55±10% y con agua y alimento suministrado *ad libitum*.

## **2. Obtención de muestras**

### **2.1 Sacrificio de animales**

Los ratones rd10 y WT pareados por edad fueron sacrificados por diferentes metodologías en función del estudio/experimento en el que serían utilizadas las muestras biológicas obtenidas a partir de ellos:

- Para los estudios histológicos de retinas (detección de apoptosis, medida de grosor de ONL y número de filas de fotorreceptores) y para los estudios de expresión de miRNAs y mRNAs en retinas completas, los animales fueron sacrificados por exsanguinación mediante punción cardíaca bajo efecto de anestesia inhalatoria (2% de isofluorano).
- Para los estudios de expresión de miRNAs en fotorreceptores aislados y para los cultivos primarios de fotorreceptores, los ratones fueron sacrificados mediante decapitación bajo efecto de anestesia inhalatoria (2% de isofluorano).

Todos los ratones fueron eutanasiados a la misma hora del día para minimizar los efectos de los ciclos circadianos en la expresión de los miRNAs y mRNAs.

### **2.2 Obtención de muestras de retinas completas**

Una vez sacrificados los ratones, el tejido retiniano de cada animal se extrae y se conserva a 4°C. Posteriormente se añaden 700µl de Qiazol (primer paso en la extracción de *RNA del miRNeasy Mini Kit*) y se homogeniza el tejido pasándolo a través de jeringas de diferentes tamaños de mayor a menor diámetro (23G, 26G y 30<sup>1/2</sup>G,

respectivamente). Una vez homogenizadas las muestras de retina, se conservan a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **2.3 Obtención de muestras de fotorreceptores aislados**

Los cultivos primarios de fotorreceptores se obtuvieron a partir de las retinas de ratones de 6 días post-natales (P6). Una vez sacrificados los ratones, se les realiza una pequeña incisión en el párpado mediante bisturí para poder exponer el ojo, que se encuentra aun cerrado en esa etapa del desarrollo. Posteriormente, se enuclean los ojos, se diseccionan y se extraen las retinas en PBS frío. Las retinas se lavan dos veces en solución de Ringer sin  $\text{Ca}^{2+}$ . El tejido retiniano se digiere mecánica y enzimáticamente mediante incubación en solución de Ringer sin  $\text{Ca}^{2+}$  con 0,3 mg/ml de papaína (Sigma-Aldrich, P3375, Steinheim, Alemania) y 2,5 mM de L-cisteína (Sigma-Aldrich, C7352, Steinheim, Alemania) a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. La reacción de digestión se detiene añadiendo 1 mL de medio DMEM/F12 (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) con 2% de FBS (suero fetal bovino, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) y 0,1 mg/ml de ADNasa I (Sigma-Aldrich, D4263, Steinheim, Alemania). Posteriormente, el tejido se disocia agitando suavemente los tubos durante 1-2 minutos, para luego dejar reposar durante 2 minutos. El sobrenadante, que contiene fotorreceptores, se recoge cuidadosamente. Al resto de células (*pellet*) que no han sido recogidas se le añade otro mililitro de medio DMEM/F12 y se repite la agitación suave durante otros 1-2 minutos. De nuevo se deja reposar el contenido durante 2 minutos, después de lo cual se vuelve a recoger el sobrenadante y se junta con el primero recogido. Las dos fracciones, el sobrenadante (fotorreceptores) y el *pellet* (restos celulares de la retina) se centrifugan durante 5 minutos a 800 rpm. Se retira el sobrenadante de cada una de las fracciones y se resuspenden en 700  $\mu\text{L}$  de Qiazol (primer paso en la extracción de *RNA del miRNeasy Mini Kit*). Se homogeniza la suspensión celular pasándola a través de jeringas de diferentes tamaños de mayor a menor diámetro (23G, 26G y 30<sup>1/2</sup>G, respectivamente). Finalmente se conservan las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para obtener muestra suficientemente amplia y enriquecida en fotorreceptores aislados, para los estudios de expresión de miRNAs, se agruparon 10 retinas (5 ratones).

## **2.4 Obtención y tratamiento de muestras para estudios histológicos**

Tras el sacrificio animal, los ojos de los ratones fueron enucleados y fijados en paraformaldehído al 4% en PBS 0,1M (Sigma-Aldrich, D5652-10X1L, Steinheim, Alemania) con un pH de 7.4 y a una temperatura de 4°C. Pasadas unas 24 horas, los ojos se lavan tres veces en PBS 0,1M y se crioprotegen mediante un tratamiento consistente en incubaciones de 2 horas en soluciones con concentraciones crecientes de sacarosa, al 10%, al 15% y finalmente al 30%. A continuación, los ojos crioprotegidos se montan en OCT (Optimal Cutting Temperature, Tejido Tek, Sakura Finetek, Tokio, Japón), se congelan en nieve carbónica, y se cortan transversalmente en secciones de 7µm en un criostato (Leica, modelo CM 1950, Wetzlar, Alemania). Los cortes se colocan sobre portaobjetos de vidrio y se conservan a -20°C hasta su uso.

## **2.5 Extracción de RNA**

El RNA total se extrae utilizando el *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen, Woburn, MA, EE.UU.), de acuerdo con el protocolo del fabricante. La cantidad y calidad de las muestras se analizaron con el espectrofotómetro Nano-Drop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.) y solamente las muestras de RNA con ratios de absorbancia 260/280 por encima de 1,8 fueron utilizadas en estudios posteriores. El RNA extraído se almacenó a -80°C hasta su uso.

## **3. Estudio del comienzo y evolución de la muerte celular de los fotorreceptores en retinas de ratones rd10**

Para estudiar los procesos de muerte celular en las células fotorreceptoras de la retina, producidas por apoptosis, se utilizó el ensayo de TUNEL (TdT mediated dUTP Nick-End labeled assay). Este ensayo está diseñado para la detección y cuantificación específica de células apoptóticas dentro de una población celular mediante la medición de la fragmentación del ADN nuclear. Dicha fragmentación es un importante sello bioquímico de la apoptosis en muchos tipos de células, proporcionando una detección simple, precisa y rápida de células apoptóticas *in situ*. En este ensayo el ADN fragmentado de las células apoptóticas se determina mediante la incorporación catalítica

de la fluoresceína-12-dUTP en los extremos 3'-OH de ADN usando la enzima TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase), que forma una cola polimérica. El ADN marcado con fluoresceína-12-dUTP puede entonces ser visualizado directamente por microscopía de fluorescencia o cuantificado por citometría de flujo.

Analizamos secciones retinianas de al menos tres muestras por cada grupo experimental y por cada punto de tiempo entre los días 13 y 22 posnatales, obtenidas a intervalos de 12 horas. Utilizamos el kit comercial *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System* (Promega, Madison, WI, EE.UU.), siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, las secciones sobre cubreobjetos se vuelven a fijar con paraformaldehído al 4% en PBS, se rehidratan con PBS, se tratan con proteinasa K, se hacen reaccionar con un mix de TdT y nucleótidos (que contiene fluoresceína-12-dUTP) y se lavan con PBS 0,1M. Después de ser marcadas usando la técnica de TUNEL, las retinas se tiñen con DAPI para la visualización de núcleos y después de varios lavados con PBS se añade Prolong Gold (Eugene, OR, EEUU) y se cubren con cubreobjetos para observación microscópica.

Examinamos la fluorescencia de células apoptóticas marcadas con dUTP (TUNEL) con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokio, Japón) con una cámara digital acoplada (Nikon DS-U2, Nikon, Tokio, Japón). Se obtuvieron imágenes de cinco áreas diferentes (área central, áreas intermedias izquierda y derecha y áreas periféricas izquierda y derecha) en cada sección retiniana analizada.

#### **4. Cultivos primarios de fotorreceptores**

Los primeros procedimientos para obtener los cultivos primarios de fotorreceptores aislados son los mismos que los detallados en la sección *Obtención de muestras de fotorreceptores aislados*. El último paso en común entre los dos procedimientos sería la centrifugación durante 5 minutos a 800 rpm de las fracciones obtenidas después de la disociación del tejido retiniano y su separación por agitación suave. A partir de este punto, la fracción de sobrenadantes (fotorreceptores) se resuspende en 1 mL de medio DMEM/F12 con 2% de FBS y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomina 10.000µg/ml, Thermo Fisher) suplementado con 2% de complemento B27 (Thermo Fisher, 17504044, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) y 20 ng/ml de factor FGF-2

humano (Miltenyi, 130-093-838, Bergisch Gladbach, Alemania). A continuación, la viabilidad celular se mide usando la técnica de exclusión basada en tinción con el colorante vital Trypan Blue (Thermo Fisher, 15250061, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) y se cuentan las células vivas y muertas usando un hemocitómetro Neubauer. Finalmente, los fotorreceptores se siembran en placas de 24 pocillos con una densidad inicial de siembra de aprox.  $2 \times 10^5$  células por pocillo (suficiente para el cultivo óptimo) a 37°C en una incubadora bajo una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire. Es importante para la supervivencia de los cultivos primarios que en los pocillos haya un cubreobjetos de vidrio (12 mm de diámetro) pre-tratados previamente con poli-D-lisina (20 µg/ml) y laminina (5 µg/ml) o con laminina natural<sup>185</sup>.

Después de 2-3 horas, el medio de cultivo se retira y se reemplaza por 1mL de DMEM/F12 con 2% de FBS y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 10.000µg/ml) suplementado con 2% de complemento B27 y 20 ng/ml de factor FGF-2 humano en cada pocillo. Desde el primer día de incubación, el medio se reemplaza cada 48 horas.

## **5. Estudios de la riqueza de fotorreceptores en cultivos primarios**

Una vez transcurridas aproximadamente 24 horas desde el sembrado, los cubreobjetos de plástico, en los que han crecido las células, se recogen y se pasan a otra placa p24. Una vez ahí, las células se lavan dos veces con PBS y se fijan con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, las células se lavan tres veces con tampón PBS y se mantiene en PBS a 4°C hasta su uso.

Para determinar la riqueza en fotorreceptores de nuestros cultivos primarios (porcentaje de células fotorreceptoras) realizamos marcaje inmunocitoquímico de los cubreobjetos fijados. Para ello, el protocolo utilizado consistió en los siguientes pasos: **a)** Bloqueo: incubación de las células durante 1 hora en agitación con una solución bloqueante compuesta por suero albúmina bovina (BSA, por sus siglas en inglés) y suero de cabra (GS, por sus siglas en inglés) al 2% en PBS con 0,5% de Triton X-100 y 0.02% de azida sódica para bloquear la unión inespecífica de anticuerpos. **b)** Incubación con el anticuerpo primario: se incuban las muestras durante la noche a 4 °C en agitación en una solución igual a la de bloqueo con anticuerpo primario policlonal contra recoverina

desarrollado en conejo (Millipore AB5585, Massachusetts, EE.UU.) a una dilución de 1:1000. Pasado este período, se realizan tres lavados intensivos de 5 minutos con PBS. Siempre se utilizan controles de especificidad del anticuerpo primario, que consisten en cubreobjetos con células fijadas que no son tratadas con los anticuerpos primarios ni con los secundarios. **c)** Incubación con el anticuerpo secundario y marcaje de núcleos celulares: las células se incuban durante una hora a temperatura ambiente en agitación con anticuerpo secundario inmunofluorescente anti IgG de conejo AlexaFluor® 555 (Molecular Probes, Oregon, US, A31572) en PBS a una dilución de 1: 400 y con Hoechst (1 mg/ml, Molecular Probes) para poder visualizar los núcleos celulares. **d)** Lavados finales y montaje: los cubreobjetos se lavaban tres veces con PBS y se montan sobre portaobjetos de vidrio. Los cubreobjetos se colocan sobre una gota de Prolong Gold (Eugene, OR, EE.UU.), se presiona para eliminar las burbujas generadas y se guardan a 4°C hasta su visualización.

La inmunofluorescencia de las muestras se valoró en un microscopio de fluorescencia modelo Nikon Eclipse 80i con una cámara digital Nikon DS-U2 acoplada. Para determinar la riqueza de los cultivos primarios en fotorreceptores, se cuantificó la cantidad de células recoverina positivas con respecto al total de células, determinadas mediante Hoeschst, en un total de 6 muestras.

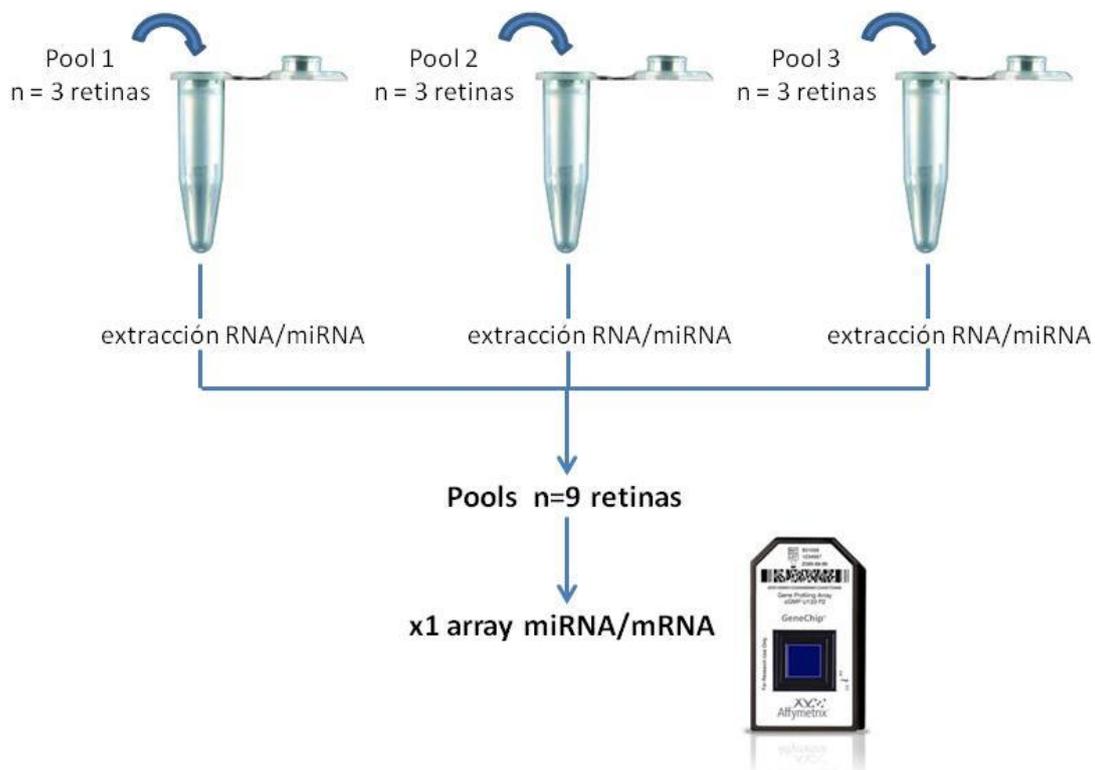
## **6. Perfil global de expresión de miRNAs y mRNAs**

Realizamos un análisis detallado de la expresión global de miRNAs y su correlación con el transcriptoma en muestras de retinas de ratones rd10 y WT. Para ello, utilizamos los arrays miScript miRNA PCR (Qiagen, Hilden, Alemania), los GeneChip miRNA 4.0 y los GeneChip 1.0 MTA arrays (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.), los cuales analizan el 100% de los miRNA de ratón de la versión 20 (v20) de la base de datos miRBase y el 100% del transcriptoma de ratón, respectivamente.

Se utilizaron 10 arrays GeneChip miRNA 4.0 y 10 arrays GeneChip 1.0 MTA para analizar 10 muestras de retina, tres para cada uno de los puntos de tiempo en los ratones rd10, a P13, P15 y P17 y una para ratones WT a P13. Cada una de estas muestras analizadas consistió en una agrupación de 9 retinas, procedentes de 3 camadas diferentes en las que se sacrificaron dos ratones por camada para obtener agrupaciones

de 3 retinas y un ojo para histología (Figura 17 y Figura Anexo 1). Los ojos obtenidos fueron utilizados para certificar que cada camada seguía el patrón de muerte de fotorreceptores establecida en los estudios de TUNEL previos. Las muestras provenientes de camadas que no siguieran dicho patrón fueron excluidas.

Por otra parte, se utilizaron tres miScript miRNA PCR Arrays (Qiagen, MIMM-001Z) para analizar 12 muestras de retina, dos muestras por grupo experimental - rd10 y WT - en tres puntos de tiempo, a P13, P15 y P17. Todas las muestras consistieron también en una agrupación de 9 retinas.



**Figura 17. Metodología para obtención de muestras para los estudios de expresión global de miRNA y mRNA.** De una camada se sacrifican 2 ratones y se obtienen agrupaciones de 3 retinas. A continuación se juntan 3 agrupaciones de diferentes camadas (n=9) y se extrae el RNA/miRNA que posteriormente será analizado en los arrays de expresión global tanto de miRNA como de mRNA.

Previamente a ser utilizadas en los arrays, además de con el NanoDrop, la cantidad, calidad, distribución de tamaños e integridad cada una de estas muestras de RNA fue analizada utilizando el Agilent 2100 Bioanalyzer con el *RNA 6000 Pico kit* (Agilent Technologies, Foster City, CA, EE.UU.). La cantidad de RNA inicial tanto en los arrays GeneChip miRNA 4.0, miScript miRNA PCR Arrays como en los arrays GeneChip 1.0 MTA fue de 250 ng.

En los arrays de microRNA 4.0, el primer paso es un marcaje del RNA con biotina y su purificación usando *FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit* (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En el caso de los arrays de MTA 1.0, el primer paso fue retro-transcribir, amplificar, fragmentar y marcar las muestras utilizando el *GeneChip WT PLUS Reagent Kit* (Affymetrix). A continuación, ambos sistemas comparten el mismo protocolo y Kit para realizar la hibridación de muestras, la tinción, lavado y escaneo de los arrays. Para ello se utilizó el GeneChip Hybridization, *Wash and Stain Kit* de acuerdo con protocolos estándar del GeneChip Hybridization Oven 640 (Affymetrix) y GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix), respectivamente. Finalmente, los arrays se escanearon con el Affymetrix GeneChip Scanner GCS3000 (Affymetrix).

Una vez realizado el protocolo completo de los GeneChip, se exportan los datos crudos procedentes del escaneo de los arrays y se realiza el análisis de los mismos utilizando el Expression Console Software v 1.4. 1 (Affymetrix), que consiste en: 1) análisis de control de calidad interno (Internal Quality Control) de cada una de las muestras gracias a los controles internos distribuidos por todo el array; 2) detección de la señal de las sondas que superan un umbral establecido por encima del ruido de fondo resultando en un “*call*” de ausencia/presencia y; 3) un paso de normalización cuantil.

Una vez comprobado que todos los arrays superaron los controles de calidad internos, en un paso de filtrado posterior, se eliminaron las sondas no detectadas (señal por debajo del valor umbral del ruido de fondo) en ninguno de los arrays para asegurar que trabajamos con miRNAs y mRNAs que se expresan en retina de ratón.

Para la identificación de miRNAs y mRNAs diferencialmente expresados (D.E.), los datos de expresión de los ratones rd10 a diferentes tiempos post-natales fueron comparados respecto a: 1) ratones de tipo WT pareados por edad (en los arrays miScript miRNA PCR) y 2) ratones rd10 a día P13 (en los arrays GeneChip de Affymetrix), que equivale a 3 días antes de la aparición de la apoptosis. Se consideró que el valor de  $p$  inferior a 0,05 era estadísticamente significativo y se usó el valor de cambio relativo o *fold-change*  $\pm 1.5$  como criterio de corte para miRNAs y mRNAs.

A continuación, se filtró la lista de miRNAs D.E. principalmente en función de los valores de *fold-change* y excluyendo aquellos miRNAs con una desviación estándar

igual o mayor al 10% en la tríplica muestral y/o aquellos miRNAs con valores cercanos al ruido de fondo.

A continuación, los miRNAs candidatos se sub-clasificaron en 2 grupos basándonos en su dinámica de expresión, es decir, si la expresión alterada se produjo antes o después del inicio de la detección de apoptosis en los fotorreceptores, de la siguiente manera: 1) Grupo-A: miRNAs con una sobre-expresión o infra-expresión a días P13 y/o P15 en comparación con ratones WT pareados por edad (P13 y P15) y en comparación con muestras de ratones rd10 a P13. 2) Grupo-B: miRNAs con una expresión diferencial a P17 en comparación con WT de la misma edad (P17) y en comparación con rd10 a P13, pero sin expresión diferencial en etapas previas. Por lo tanto, consideramos los miRNAs del grupo-A como aquellos probablemente implicados en la etiología de la enfermedad, mientras que consideramos al grupo-B como aquellos miRNAs que probablemente participen en mecanismos compensatorios y/o en la progresión de la enfermedad.

## **7. Predicción de dianas genéticas para miRNAs**

Se realizó un estudio *in silico* de predicción de los mRNA diana de los miRNAs candidatos D.E. utilizando la base de datos miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>)<sup>186</sup>, la cual es capaz de predecir los mRNA diana de los miRNAs utilizando algoritmos de múltiples bases de datos, incluyendo la propia miRWalk 2.0, MiRanda<sup>187,188</sup>, TargetScan<sup>135</sup>, y RNA22<sup>189</sup>, entre otras. Se seleccionaron para posteriores estudios aquellos genes predichos por al menos dos de estas bases de datos para definirlos como genes diana de nuestros miRNAs candidatos.

## **8. Análisis de las redes de interacción miRNA-mRNA**

Usando el software de acceso libre Cytoscape v3.0.0<sup>190</sup> construimos redes de interacción miRNA-mRNA utilizando los miRNA D.E. y sus mRNA diana predichos por la base de datos miRWalk 2.0. Posteriormente, con el fin de identificar las relaciones de expresión inversa entre los miRNAs y los mRNAs, es decir, para identificar mRNAs con alteración en su expresión de signo opuesto a su miRNAs diana/regulador, filtramos estas redes de interacción incorporando los datos de nuestros

arrays de expresión de mRNAs (arrays MTA de Affymetrix). Para ello, primero filtramos los datos seleccionando aquellos mRNAs con expresión enriquecida en retina (valores de la señal por encima del ruido de fondo) y a continuación seleccionamos los mRNAs con expresión inversa a su miRNA diana predicho (Figura Anexo 1). En este caso, se estableció el valor de *fold-change* de 1.3 como punto de corte para los mRNAs con el fin de reducir al mínimo el número de genes diana descartados y enriquecer así los estudios de interacción miRNA-mRNA. Generamos de esta manera 3 redes de interacción diferentes, incluyendo las redes entre miRNAs del grupo-A vs. mRNAs D.E. a P15 y a P17 y la red entre miRNAs del grupo-B vs. mRNAs D.E. a P17.

## **9. Estudios de ontología genética (GO) y análisis de enriquecimiento de rutas biológicas**

Los genes identificados expresados de forma inversa con sus miRNA diana fueron posteriormente sometidos a estudios de ontología genética (GO) y análisis de rutas biológicas utilizando la aplicación ClueGO de CytoScape (versión 2.2.3)<sup>191</sup>, DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery: <http://David.abcc.ncifcrf.gov/>) y WikiPathways ([www.wikipathways.org](http://www.wikipathways.org)) con el fin de identificar procesos biológicos posiblemente afectados por la desregulación en la expresión de miRNAs. Los datos de ClueGO se integraron a partir de las bases de datos KEGG, WikiPathways y DAVID, y la puntuación kappa se estableció en 0,4, que mide la superposición de genes compartidos entre los términos de GO.

## **10. Validación de expresión de miRNAs y mRNAs mediante qPCR**

La qPCR o PCR a tiempo real es una variación de la PCR estándar que permite la cuantificación de ADN o RNA de una muestra. Al igual que la PCR estándar, esta técnica se basa en la amplificación de un segmento de ADN comprendido entre dos secuencias complementarias a los nucleótidos cebadores o primers denominado amplicón. Para la cuantificación, la cantidad producida de dicho amplicón se mide en cada ciclo de PCR a tiempo real gracias a la adición de fluoróforos que se unen al él de forma cuantitativa. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de ADN

amplificado, que a su vez es proporcional al número de copias de ADN iniciales en cada muestra. De esta forma aquellas muestras con mayor expresión del gen, el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores (ciclo umbral o Cq) y podrá ser comparada para determinar su expresión relativa.

Una limitación de la qPCR es que se debe utilizar ADN como secuencia diana, ya que las ADN polimerasas no pueden amplificar RNA de una manera similar. Este problema se puede superar mediante el uso de la enzima transcriptasa inversa para generar ADN complementario (cDNA) a partir de de RNA<sup>192</sup>. De esta manera, cuando se combina la técnica de qPCR con una reacción de retro-transcripción o RT puede determinarse la cantidad de un determinado mRNA de una muestra mediante una cuantificación relativa. Dicha cuantificación se denomina relativa ya que se compara la cantidad del mRNA de un gen específico en un grupo de estudio respecto a la cantidad de dicho mRNA en un grupo control.

### **10.1 Determinación de la eficiencia de los cebadores**

Antes de realizar los estudios de validación de miRNAs y mRNAs es importante la optimización de las condiciones de la qPCR para el desarrollo de un ensayo robusto. Una mala optimización puede suponer una falta de reproducibilidad entre estudios así como ensayos ineficientes e insensibles. Unos resultados reproducibles en qPCR requieren que la eficiencia de la PCR sea cercana al 100 % (duplicación del producto en cada ciclo).

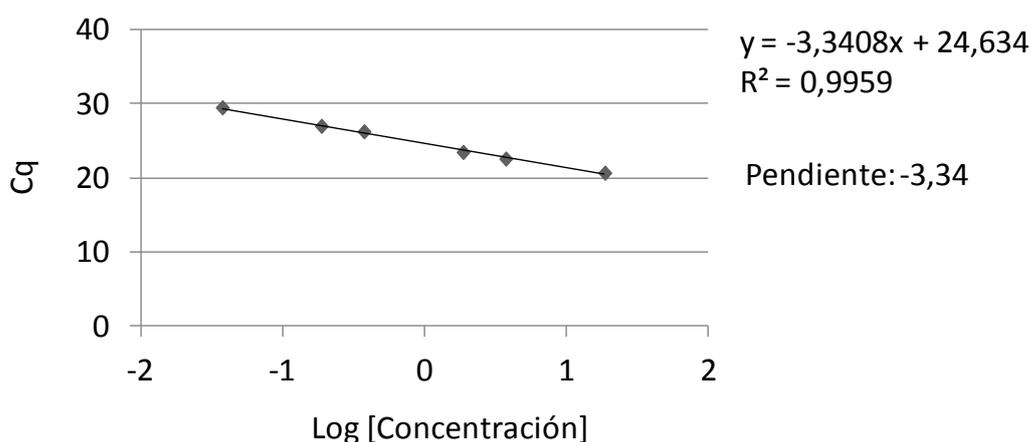
Entre los factores que afectan a dicha eficiencia, destaca la capacidad de los cebadores para amplificar de manera eficaz una secuencia concreta del genoma. Existen múltiples aspectos que determinan dicha capacidad o eficiencia, ya sean sus características primarias (longitud, contenido de C/G, composición extremo 3', complementariedad interna) o secundarias (complementariedad entre cebadores, estructuras secundarias). Por lo tanto un buen diseño de los cebadores es clave para realizar estudios de qPCR fiables y reproducibles.

De esta manera, con aquellos cebadores diseñados por nosotros es necesario realizar estudios de eficiencia que sirvan para establecer parámetros correctores que normalicen las diferencias en la capacidad de amplificación de distintas parejas de cebadores.

Teniendo en cuenta que para la cuantificación de la expresión de los miRNA utilizamos cebadores comerciales de miScript (Qiagen, Hilden, Alemania), estos estudios solamente fueron necesarios para los cebadores utilizados en la validación mediante qPCR de la expresión de mRNAs.

En los estudios de eficiencia de cebadores se realiza una qPCR en la cual se utilizan 7 muestras procedentes de una dilución seriada (1, 1/2, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500 y 1/1000) de una muestra de cDNA con concentración conocida. Utilizamos el SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EE.UU.) para realizar la qPCR siguiendo el protocolo del fabricante. Cada muestra se amplifica por triplicado.

A continuación, teniendo en cuenta la concentración conocida de las muestras y el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo (Cq), se calcula la curva estándar (Figura 18).



**Figura 18. Cálculo de la curva estándar a partir de los Cqs obtenidos en la qPCR y de las concentraciones conocidas de las muestras de la dilución seriada.**

La eficiencia se calcula a partir de la pendiente de la curva estándar.

$$\text{Eficiencia} = [10^{-1/\text{pendiente}}] - 1$$

En este ejemplo, si la pendiente es -3,34 la eficiencia será del 99.5%.

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/-3.34)} - 1 = 10^{0.30} - 1 = 1.995 - 1 = 0.995 = 99.5\%$$

## 10.2 Validación de la expresión de miRNAs y mRNAs mediante qPCR

La validación tanto de miRNAs como de los mRNAs D.E. candidatos se realizó en las mismas muestras que las estudiadas en el análisis de microarrays, es decir, tres muestras para cada ratón rd10 y WT en tres puntos temporales diferentes (P13, P15 y P17). Previamente a la qPCR dichas muestras fueron sometidas a reacción de retro-transcripción o RT. Se utilizó el *miScript II RT Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) para estudios de miRNA y el *SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Se realizaron estudios de qPCR para validar la expresión de un total de 25 miRNAs y 49 mRNAs. Se adquirieron los cebadores comerciales miScript Primer assays (Qiagen, Hilden, Alemania) para la validación de los miRNAs. En cambio, para la validación de los mRNA los cebadores utilizados fueron diseñados por nosotros mediante el software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) y producidos por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Para verificar la especificidad teórica de los cebadores diseñados se utilizó la herramienta bioinformática e-PCR (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/e-pcr/>). En el Anexo 2 se muestran los mRNA analizados y los cebadores diseñados para amplificarlos.

Las qPCRs se realizaron utilizando el *miScript SYBR Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) para la expresión de miRNAs y SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EE.UU.) para la expresión de mRNAs, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Cada muestra biológica se amplificó por triplicado (2 ng cDNA/réplica).

Se utilizó el termociclador ABI Prism HT-7900 (Applied Biosystems) y placas de 384 pocillos para realizar las qPCRs y se implementó el siguiente perfil térmico estándar para todas las qPCR: un paso inicial de activación de 95°C durante 15 minutos seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15 segundos, hibridación durante 30 segundos a 55°C y una fase de extensión durante 34 segundos a 70 ° C. La obtención de datos de fluorescencia se realiza durante la etapa de extensión. Los resultados se analizaron con la ayuda del programa SDS 2.4.1 (Foster City, California, EE.UU.) para el cálculo de las C<sub>q</sub> (punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo).

Los valores del ciclo umbral o C<sub>q</sub> para la expresión de miRNAs se normalizaron con respecto a los valores medios de expresión de miR-26a y miR-191-5p, que fueron

utilizados como endógenos ya que mostraron la menor variabilidad en sus niveles de expresión entre todas las muestras analizadas. Para normalizar la expresión de mRNA se utilizaron los valores medios de los genes *Gapdh*, *Tubb5* y  $\beta$ -*Act* para la expresión de mRNA, que mostraron una fuerte correlación entre ellos en sus niveles de expresión en todas las muestras ( $r^2 = 0,905$  y  $p < 0,001$ ).

Los datos de expresión de los miRNAs se analizaron utilizando el método  $\Delta\Delta Cq$  de cuantificación relativa y se presentaron como *fold-change*. Este método consiste en comparar directamente los Cqs del miRNA testado y los miRNAs endógenos ( $\Delta Cq$ ) en cada muestra, y posteriormente se comparan los  $\Delta Cq$  del grupo experimental con respecto al grupo control.

Los datos de expresión de los mRNAs se analizaron aplicando el método de las curvas estándar. Este método se basa en la utilización de la curva estándar previamente calculada en los estudios de eficiencia de los cebadores. Primero se interpola la concentración del gen en la muestra experimental a partir del Cq obtenido mediante la aplicación de la fórmula de la curva estándar. Posteriormente se calcula la relación entre la cantidad del mRNA testado y el gen de referencia o endógeno (normalización), y se compara dicha relación entre las muestras para determinar la expresión relativa de cada mRNA. Los datos de expresión relativa se presentan como *fold-change*.

También se utilizó la técnica de qPCR para analizar los niveles de expresión de un grupo de 7 miRNAs en los días posnatal 19 y 22: miR-6240, miR-6937-5p, miR-3473b, miR-142a-5p, miR-7035-5p, miR-146a-5p y miR-155-5p. Los criterios utilizados para la inclusión de estos miRNAs en este estudio fueron: 1) valores de *fold-change* y 2) estudios de predicción de sus mRNA diana, potencialmente implicados en la degeneración retiniana, tales como genes implicados en apoptosis, inflamación, función normal de la retina o relacionados con RP, entre otros. Se analizaron 3 muestras por cada grupo experimental: retinas WT a P19 y P22 y retinas rd10 a los mismos días postnatales. Cada muestra biológica se amplificó por triplicado (2 ng cDNA/réplica). Además, se analizó también la expresión de este grupo de 7 miRNAs en muestras de fotorreceptores aislados y de pellets (resto de la retina) procedentes de retinas de ratones rd10. Dos muestras por grupo experimental: fotorreceptores y pellets a P17. Cada muestra biológica se amplificó por triplicado (2 ng cDNA/réplica).

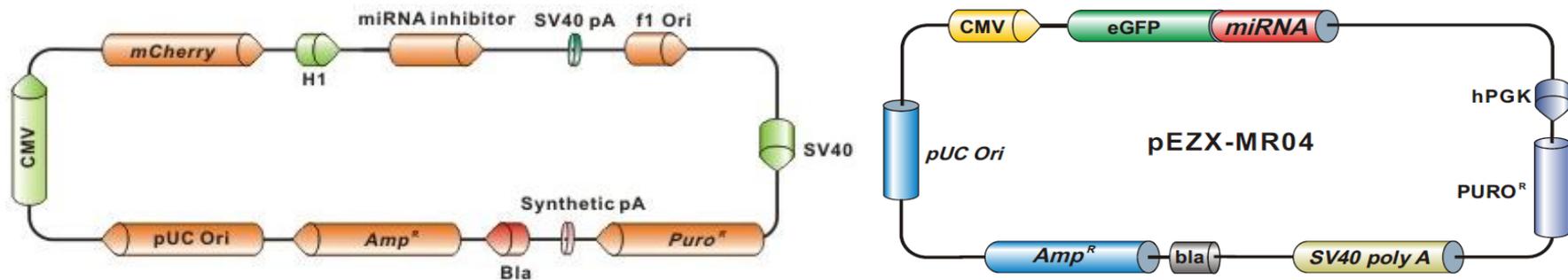
## **11. Transformación en bacterias competentes y amplificación de los plásmidos moduladores de miRNAs.**

### **11.1 Plásmidos:**

Se adquirieron tres plásmidos moduladores de miRNAs de la casa comercial GeneCopoeia (Rockville, Maryland, EE.UU.); dos inhibidores (miArrest™ miRNA Inhibitors) para los miR-6240 y miR-6937-5p, y un precursor (miExpress™ Precursor miRNA Expression) para el miR-142a-5p. También se adquirieron controles (*scramble*) de cada uno de los tipos de moduladores, es decir, un plásmido control de inhibidores y un plásmido control de precursores. El vector *scramble* consiste en una solución idéntica a la que contiene modulador de miRNA pero con la única salvedad de que los plásmidos contienen una secuencia artificial de nucleótidos que se ha comprobado que no es complementaria a ninguna hebra de mRNA del genoma. Los plásmidos expresan un reportero fluorescente para poder realizar seguimiento del éxito de las infecciones, eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) en el caso del precursor de miRNA y su *scramble*, y mCherry en el caso de los inhibidores de miRNAs y su *scramble*. A continuación en la Tabla 2 y en la Figura 19 se presenta un resumen con las características principales de los plásmidos adquiridos:

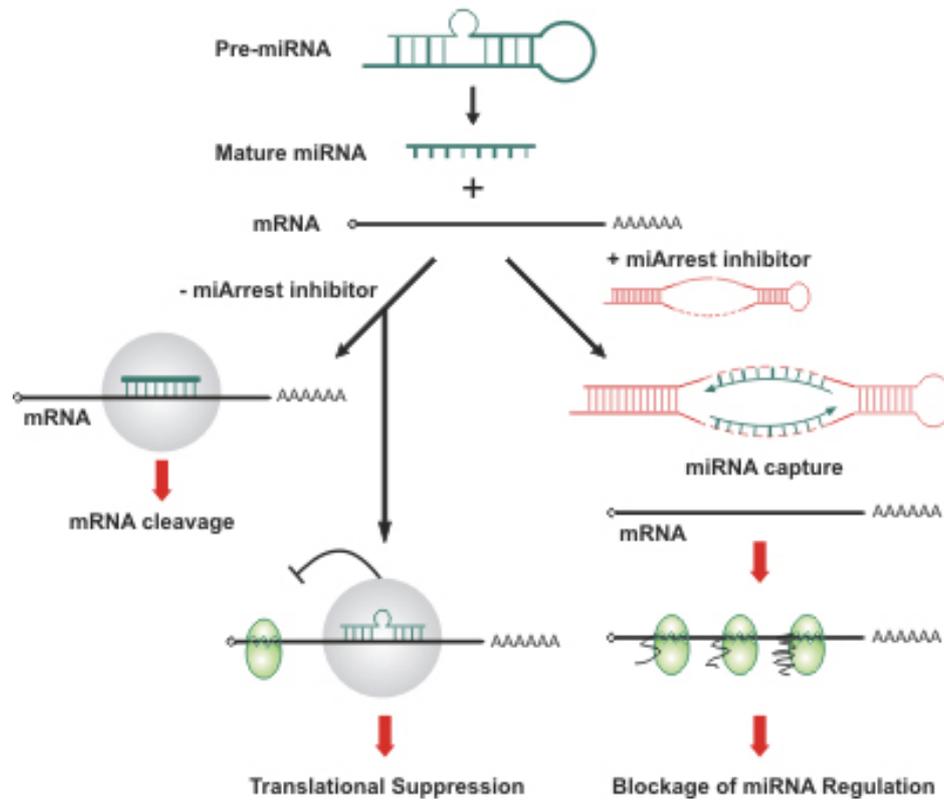
**Tabla 2. Resumen de las características principales de los plásmidos moduladores de miRNAs adquiridos en GeneCopoeia.** pb=pares de bases.

Descripción	# catálogo	Tipo	Vector	Antibiótico	Gen reportero	Tamaño completo plásmido	Marcador estable de selección	Promotor
Inhibidor mmu-miR-6240	MmiR-AN2804-AM01	Inhibidor miRNA	pEZX-AM01	Ampicilina	mCherry Fluorescent Protein	6579 bp	Puromicina	H1/CMV
Inhibidor mmu-miR-6937-5p	MmiR-AN3970-AM01	Inhibidor miRNA	pEZX-AM01	Ampicilina	mCherry Fluorescent Protein	6575 bp	Puromicina	H1/CMV
Control inhibidor (Scramble-inhibidor)	CmiR-AN0001-AM01	Scramble	pEZX-AM01	Ampicilina	mCherry Fluorescent Protein	6569 bp	Puromicina	H1/CMV
Precursor mmu-miR-142a-5p	MmiR3437-MR04	Precursor miRNA	pEZX-MR04	Ampicilina	eGFP	5026 bp	Puromicina	CMV
Control precursor (precursor-Scramble)	CmiR0001-MR04	Scramble	pEZX-MR04	Ampicilina	eGFP	5018 bp	Puromicina	CMV



**Figura 19. Mapa de los plásmidos moduladores de miRNAs adquiridos en GeneCopoeia.**

Las construcciones inhibidoras de miRNA se unen específicamente a su miRNA diana tras la transducción/infección de las células. El procesamiento post-transcripcional provoca la formación de una estructura que atrae y se une a dos moléculas del miRNA diana impidiendo la unión del miRNA endógeno a su mRNA diana, inhibiendo así el efecto del miRNA endógeno y facilitando la expresión de sus genes diana (Figura 20).



**Figura 20. Esquema del sistema de inhibición de las moléculas miArrest™ miRNA Inhibitors.** (<http://www.genecopoeia.com/product/mirna-inhibitor/>)

Las construcciones precursoras (miExpress™ Precursor miRNA Expression) por su parte, son moléculas de RNA de doble cadena imitadoras de las secuencias de los pre-miRNA diana que se benefician de la maquinaria de la biogénesis de los miRNAs endógenos para generar miRNAs maduros, aumentando así la expresión y la función biológica de los miRNA (Figura 21).

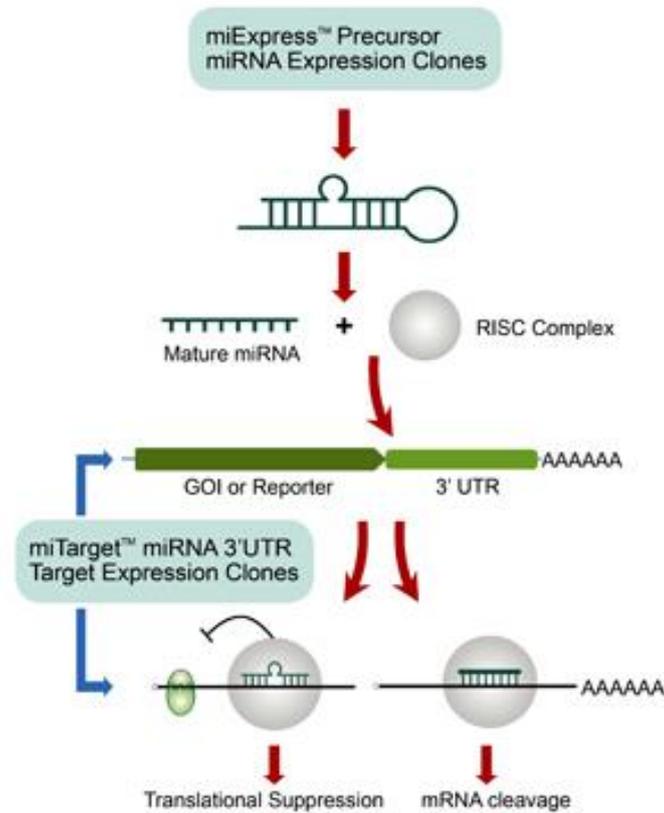


Figura 21. Esquema del sistema de precursores de las moléculas miExpress™ Precursor miRNA Expression. (<http://www.genecopoeia.com/product/mirna-precursor-clone/>)

## 11.2 Transformación, selección bacteriana y amplificación del ADN plasmídico:

La transformación es el proceso mediante el cual las bacterias captan ADN exógeno. De esta forma, la transformación se puede definir como la variación hereditaria de una célula bacteriana susceptible, originada por la captación de ADN desnudo libre en el medio.

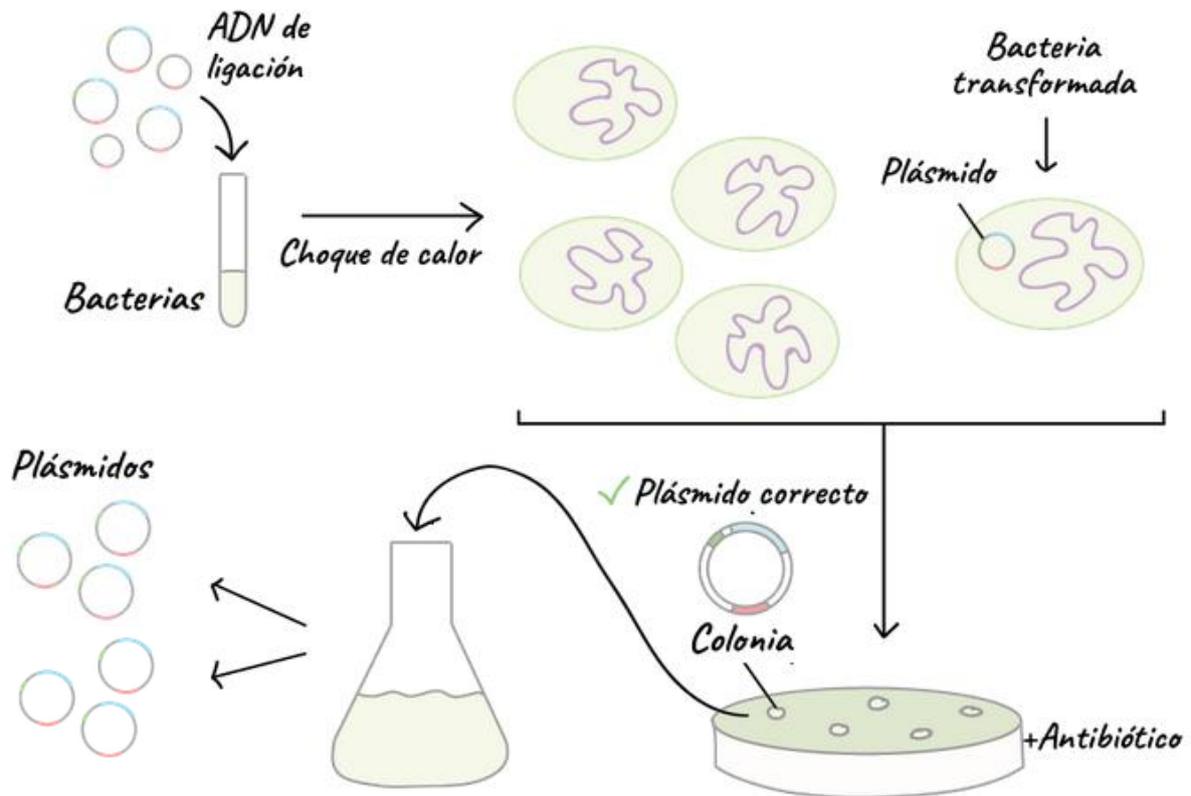
En este proyecto, la cepa de bacterias competentes *E. coli* XL1 fue utilizada para la transformación y amplificación de ADN plasmídico de los inhibidores y precursores de miRNA.

Realizamos la transformación y amplificación de ADN plasmídico siguiendo el protocolo de Murray de 1997. En resumen, por cada transformación a realizar se descongela un vial stock de 200µL de bacterias competentes *E. coli* XL1 (conservadas a

-80°C) y se dejan en hielo durante 30 minutos. Se añade a la suspensión de bacterias competentes la dilución de plásmido (50ng en un volumen no mayor a 10µL). Se mezcla bien y se deja en hielo 30 minutos. Se transfieren los viales a un baño de agua a 42°C y se mantienen sin agitar durante 45 segundos (Heat shock). Inmediatamente devolvemos los viales al hielo durante otros 2 minutos. Añadimos 250µL de medio Luria-Bertani (LB) sin ampicilina previamente atemperado a 37°C. Agitamos los viales durante 1 hora a 37°C a 200 rpm en agitador orbital.

Mientras tanto, preparamos placas de medio con Agar que contiene Ampicilina (100µg/mL) para la selección de aquellas colonias que contengan el plásmido, ya que las bacterias que hayan incorporado el ADN plasmídico serán resistentes al antibiótico y cada una formará una colonia, mientras que las bacterias sin plásmido mueren. Se esparce una alícuota de 50 µl sobre la superficie de una placa (con ampicilina) con la ayuda de una espátula empapada en etanol 70% y esterilizada al fuego (tras dejar enfriar un instante). Repetimos para cada muestra, incluyendo controles. Dejamos la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente boca arriba y a continuación las incubamos invertidas en la estufa a 37°C para que las colonias crezcan. Al día siguiente inoculamos 5mL de medio LB con ampicilina (100µg/mL) en un tubo Falcon con una colonia de células de *E. Coli* transformada mediante una espátula estéril. Los Falcon son incubados a 37°C y 200 rpm durante aproximadamente 10 horas en agitación orbital. Pasado ese tiempo de incubación, añadimos 1mL del cultivo en un Erlenmeyer de 1L estéril con 200 mL de medio LB con ampicilina (100µg/mL) durante aproximadamente 16h para seguir amplificando el ADN plasmídico de interés en las bacterias competentes.

Un resumen de los pasos realizados en el proceso de transformación y amplificación de ADN en bacterias competentes se puede visualizar en la Figura 22.



**Figura 22.** Resumen de los pasos en el proceso de transformación y amplificación de ADN plasmídico.

### 11.3 Aislamiento y purificación del ADN plasmídico (MaxiPrep).

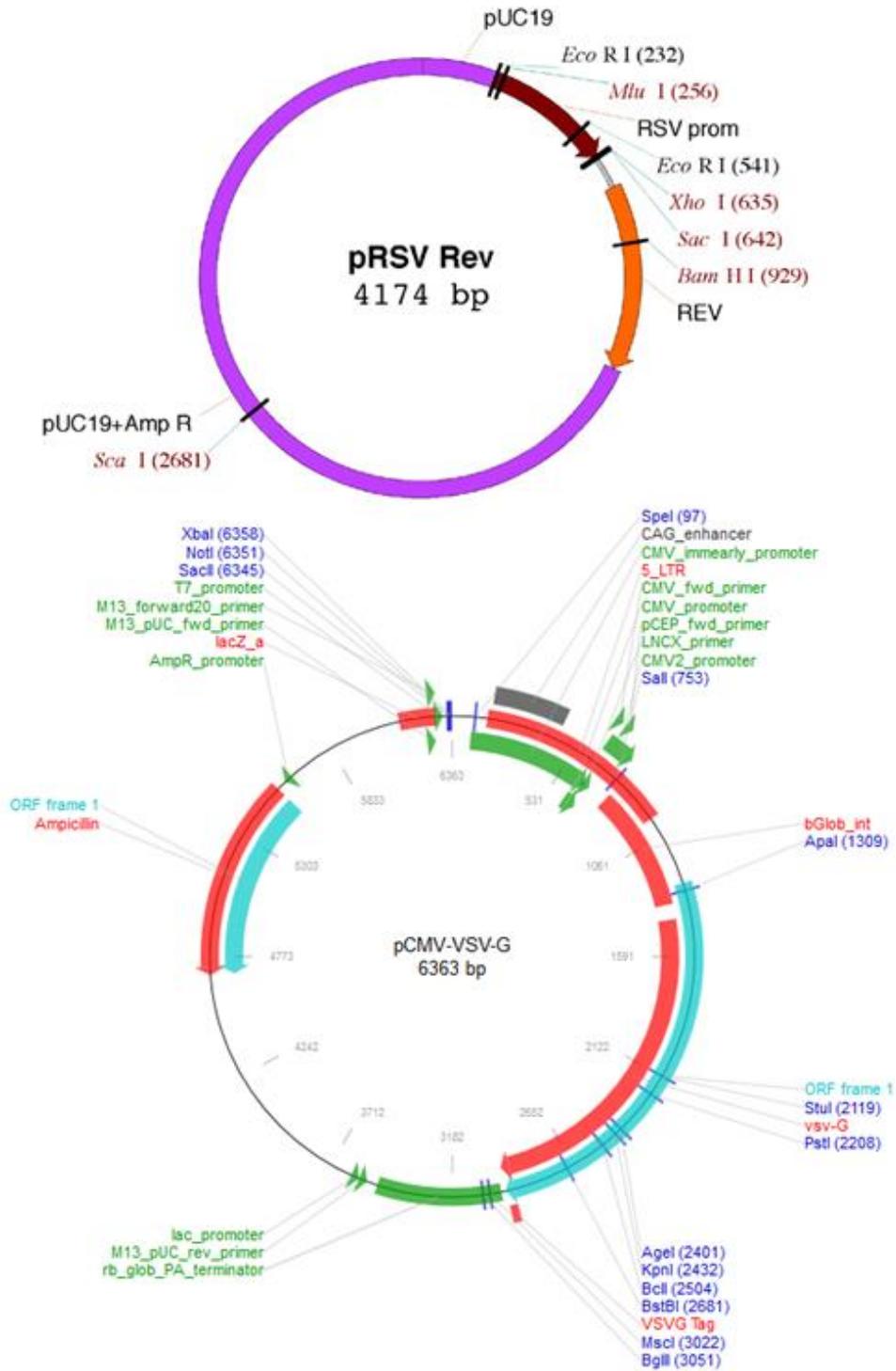
Los 200 mL de suspensión de bacterias transformadas con el plásmido de interés se centrifugan a 6000 x g a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente el precipitado obtenido es sometido a diferentes tratamientos para la obtención final de una solución de ADN plasmídico libre, aislado y purificado. Para ello seguimos el protocolo del *Plasmid DNA Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania). La cantidad y calidad del ADN plasmídico obtenido se determina con el espectrofotómetro Nano-Drop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.)

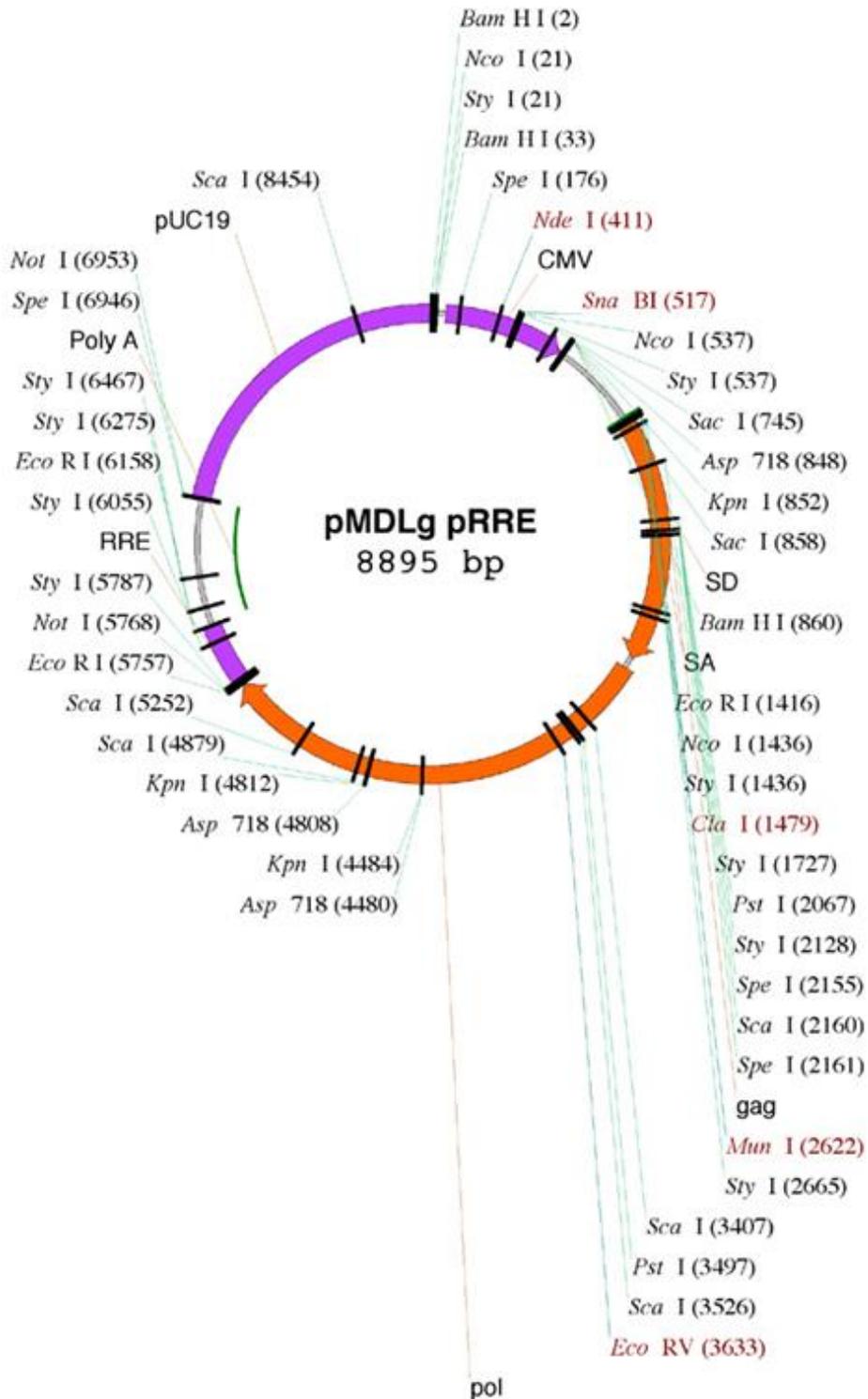
## **12. Generación lentivirus (LV) con moduladores de miRNAs**

Los lentivirus (LV), un subconjunto de retrovirus, son unos de los tipos de virus más comunes y útiles utilizados en la investigación. Los lentivirus pueden transducir una significativa cantidad de material genético viral (insertos de hasta 5 Kb) en el ADN de las células hospedadoras, y pueden infectar de manera eficiente tanto células en división como en reposo sin una respuesta inmune significativa. Estos virus se integran de forma estable en el genoma del huésped, permitiendo la expresión transgénica a largo plazo<sup>193</sup>.

Las partículas lentivirales moduladoras de miRNA fueron obtenidas cotransfectando los plásmidos moduladores de miRNAs (vectores virales), junto con los vectores empaquetadores pMDLg-pRRE, pRSV-REV y pCMV-VSV-G. Los vectores pRRE y pRSV contenían la cantidad mínima de genes víricos necesarios para la generación de la estructura proteica del virion y la adquisición de las funciones de ensamblaje<sup>194</sup>. El vector VSV-G mejora el tropismo del lentivirus (Figura 23). Estos vectores fueron cotransfectados en la línea celular HEK293T. Esta línea expresa de manera estable el antígeno T del virus SV40 que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados y que contienen el origen de replicación SV40 confiriéndole una mayor eficacia de transfección.

La co-transfección se llevó a cabo utilizando el agente de transfección TurboFect (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El *TurboFect* es un polímero que forma complejos cargados positivamente con el ADN plasmídico que son compactos y estables. Estos complejos protegen el ADN de la degradación y se unen a la superficie aniónica de la célula facilitando el suministro eficiente de los plásmidos a las células eucariotas vía endocitosis.





**Figura 23.** Mapas de los vectores empaquetadores pMDLg-pRRE, pRSV-REV y pCMV-VSV-G que son cotransfectados para generar vectores lentivirales.

Las células empaquetadoras HEK293T se cultivaron en placas de Petri de 100 mm de diámetro (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) en medio DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle's medium, Thermo Fisher) suplementado con 10% de FBS, 1% de L-glutamina 200 mM (Thermo Fisher) y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 10.000µg/ml, Thermo Fisher), a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/placa. Transcurridas 24 horas las células alcanzan un 60-70% de confluencia, momento en el que se cambia el medio de cultivo por medio fresco y se realiza la co-transfección de los cuatro plásmidos. El ADN añadido por placa fue de 11,25 µg totales, 5 µg de plásmido vector, 3,25 µg de plásmido pMDLg-pRRE, 1,25 µg de plásmido pRSV-REV y 1,75 µg de pCMV-VSV-G. Este ADN fue diluido en 1,2ml de DMEM (con 10% FBS inactivado, 4mM L-glutamina) con 24 µl de TurboFect, dejándose incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente para crear los complejos. A continuación, la mezcla de agente de transfección y ADNs plasmídicos se añade a la placa, y se deja incubando 16-18 horas a 37°C en una incubadora bajo una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire. Tras la incubación, se cambió el medio de las placas por 5 ml de medio fresco sin suero y se mantiene en cultivo hasta la recogida de los vectores. Se recoge el sobrenadante que contiene partículas lentivirales tras 24 y 48 horas de cotransfección y se eliminan los desechos celulares mediante jeringa acoplada a filtro con tamaño de poro de 0.45 µm (Millipore, Billerica, Massachusetts, EE.UU.). Posteriormente se concentran las partículas virales mediante centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos y a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, los virus sedimentados se resuspenden en medio sin suero y se realizan alícuotas del 500µL en tubos eppendorf estériles y se guardan a -80°C hasta su uso.

### **13. Generación virus adeno-asociados (AAVs) con moduladores de miRNAs**

Los AAVs son virus de pequeño tamaño con ADN de cadena sencilla de 4.7 Kb con capacidad para insertos de aproximadamente 2.5 Kb. Pueden mediar la expresión génica de un determinado transgen a largo plazo, hasta 12 meses a pesar de no integrarse en el genoma del huésped<sup>195</sup>. Tienen capacidad para infectar células que se encuentran tanto en división como en reposo. Son capaces de infectar varios tipos celulares, incluyendo sistema nervioso, hígado, músculo esquelético, riñón, pulmón y ojo. Los vectores virales basados en AAVs son ampliamente utilizados en el ámbito de la terapia génica. Poseen características que los convierten en valiosas herramientas para el

tratamiento de enfermedades genéticas; limitada respuesta inmune humoral y celular en el ser humano y que no se han asociado con ninguna enfermedad conocida a pesar de estar extendidos en la población humana.

En esta tesis, se generaron vectores ssAAV-KAnc80 con secuencias inhibitoras (anti-miR) o secuencias precursoras (miR-mimics) de miRNAs en colaboración con la Dra. González del CIMA (Pamplona, España). Los siguientes son todos los vectores generados:

- ssAAV-KAnc80-CmiR-0001 (*scramble* precursor)
- ssAAV-KAnc80-MmiR-3437 (precursor miR-142a-5p)
- ssAAV-KAnc80-CmiR-AN0001 (*scramble* inhibidor)
- ssAAV-KAnc80-MmiR-AN2804 (inhibidor miR-6240)
- ssAAV-KAnc80-MmiR-AN3970 (inhibidor miR-6937-5p)

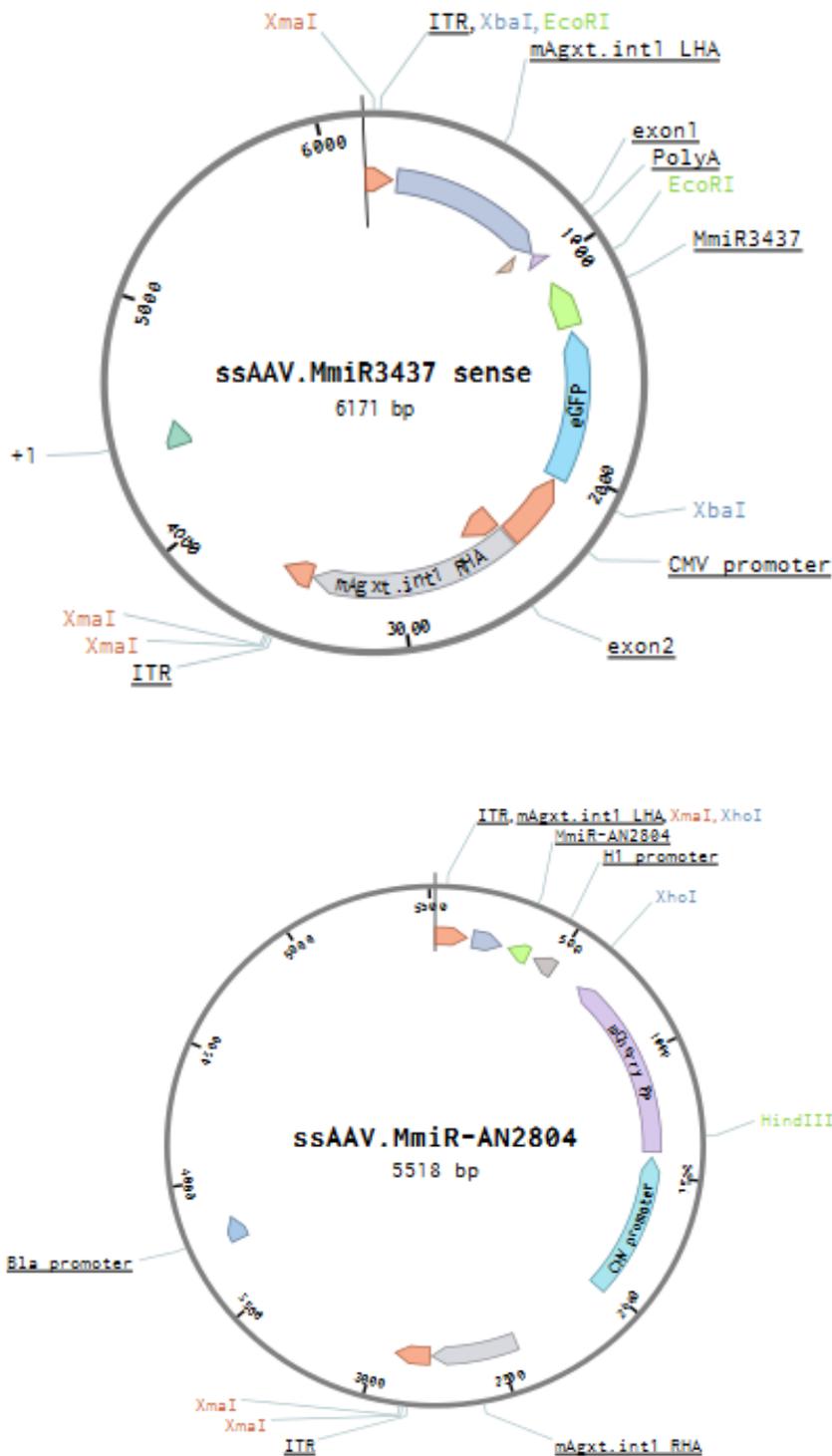
Para lograr generar estos vectores se utilizó la siguiente estrategia:

### 13.1 Clonación de los plásmidos

Se partió de los plásmidos moduladores de miRNAs adquiridos en GeneCopoeia (ver Tabla 2) para generar plásmidos moduladores de miRNAs con *backbone* de virus adeno-asociados. Para ello, mediante enzimas de restricción se aislaron de los plásmidos de GeneCopoeia las secuencias o fragmentos de ADN encargadas de la modulación de miRNAs, de la resistencia antibiótica, el gen reportero y el promotor, y éstos se clonaron en el vector *backbone* de AAVs (ssAAV-mΔGXT-int1\_donor 2AGFP). Los siguientes fueron los plásmidos generados mediante esta estrategia de clonación:

- ssAAV-CmiR-0001 (*scramble* precursor)
- ssAAV-MmiR-3437 (precursor miR-142a-5p)
- ssAAV-CmiR-AN0001 (*scramble* inhibidor)
- ssAAV-MmiR-AN2804 (inhibidor miR-6240)
- ssAAV-MmiR-AN3970 (inhibidor miR-6937-5p)

En la Figura 24 se observan dos ejemplos de los mapas definitivos de los plásmidos clonados y amplificados.



**Figura 24.** Dos ejemplos de mapas definitivos de los plásmidos. El de arriba corresponde al plásmido ssAAV-MmiR-3437 y es ejemplo de los plásmidos precursores de miRNAs, y el de abajo corresponde al plásmido ssAAV-MmiR-AN2804 y es ejemplo de los plásmidos inhibidores de miRNAs.

### 13.2 Producción y purificación de los ssAAV-KAnc80

Una vez generados los plásmidos, produjimos virus adenos-asociados con capsido viral Anc80 con los plásmidos incorporados en su interior. Brevemente, en cultivos de células HEK293T se realiza una cotransfección de tres plásmidos diferentes, plásmido p $\delta$ F6 (que contiene genes auxiliares de adenovirus), plásmido pKAnc80L65-AAP2 (que contiene los genes AA2 rep y de la cápside de AAV, Anc80) y los plásmidos moduladores de miRNAs con *backbone* de AAV. Como agente de transfección se utiliza una solución de polietilenimina (PEI) (Sigma-Aldrich).

Pasadas 72 h desde la transfección, se recogen el sobrenadante y las células (levantadas con *scraper*) y después de una serie de centrifugaciones, incubaciones con buffer de lisis, procesos de congelación y descongelación e incubación con DNasa y RNasa (DnaseI y RnaseA (Roche)), se obtiene un lisado que posteriormente es purificado. Esta purificación se realiza mediante gradiente de iodioxanol en el que la solución enriquecida de partículas virales se recoge de la interfase entre las fracciones del 40% y 57% de iodioxanol. Dicha solución se centrifuga junto con una solución del 5% de sacarosa en PBS para la obtención de los AAV ya purificados.

### 13.3 Titulación de la producción viral

Se realiza extracción del ADN viral siguiendo el protocolo del *High pure viral DNA kit* de Roche. Mediante qPCR se determina la concentración de virus (partículas virales/ml) (pv/ml) comparando diferentes diluciones seriadas ( $10^2 - 10^9$ ) de los ADNs virales extraídos con una curva estándar de concentración conocida, en este caso a partir de plásmido empleado en la generación de uno de los AAVs (pAAV-CMV-CmiR0001). Dado que los 5 AAVs producidos y purificados contienen el promotor CMV (Citomegalomavirus), empleamos los primers de dicho promotor para la titulación:

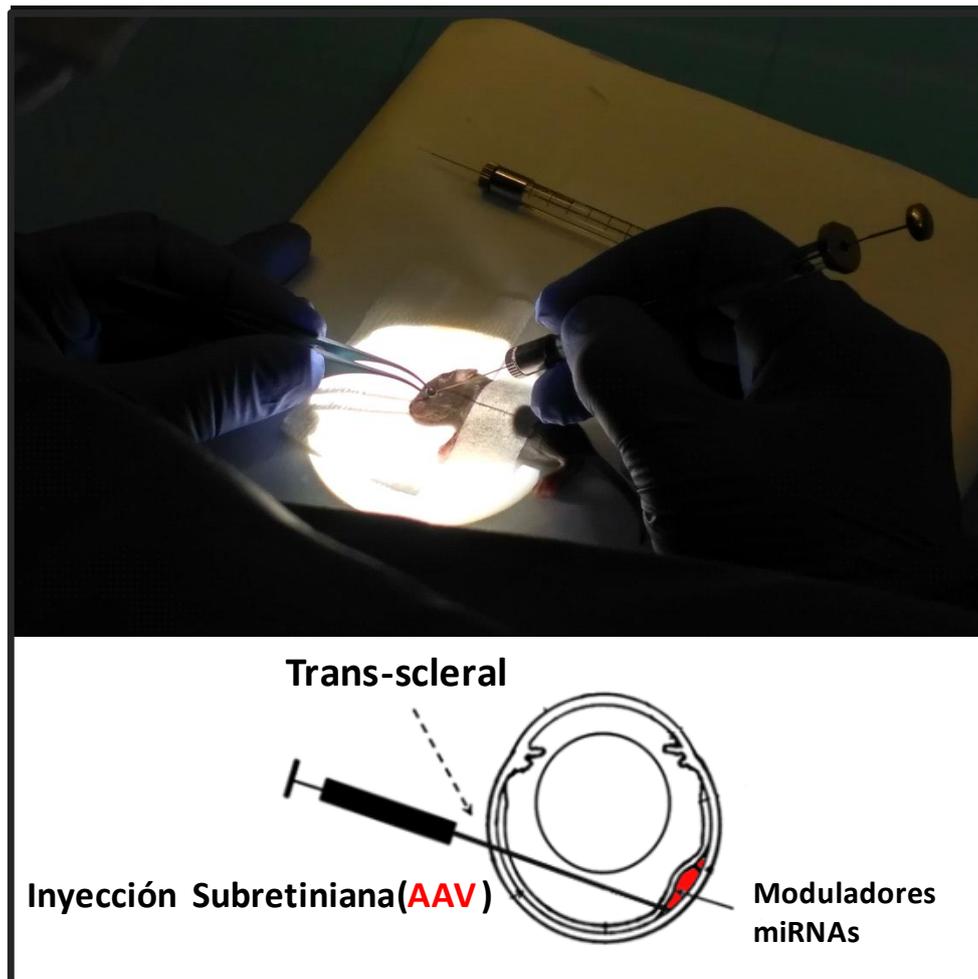
- Primer Forward CMV (AATGGGCGGTAGGCGTGTA)
- Primer Reverse CMV (AGGCGATCTGACGGTTCCTAA)

## **14. Inyecciones sub-retinianas**

Se realizaron inyecciones sub-retinianas (SR) en un total de 55 ratones (110 ojos), en 10 ratones WT y en 45 rd10. Las inyecciones SR se realizaron a los 10 días del nacimiento de los ratones (P10), indistintamente machos o hembras.

Primero se realizaron inyecciones SR en ratones WT para verificar la capacidad de los ssAAV-KAnc80 generados para infectar de manera eficaz y selectiva las células fotorreceptoras de la retina. Para ello se utilizaron 2 ratones (4 ojos) por cada uno de los 5 ssAAV-KAnc80. A continuación, se realizaron inyecciones SR en ratones rd10. Se utilizaron al menos 15 ratones por cada modulador de miRNA (miR-6937-5p, miR-6240 y miR-142a-5p). En cada ratón rd10 utilizado, se inyectó en el ojo derecho solución ssAAV-KAnc80 con secuencia moduladora de miRNA y en el ojo izquierdo solución ssAAV-KAnc80-scramble (ojo control del procedimiento experimental).

Para realizar las inyecciones SR, primero los ratones son anestesiados mediante inyección subcutánea con solución de ketamina (70mg/Kg) y xilacina (7mg/Kg). Una vez inducida la anestesia se instila una gota de tropicamida al 1% y otra de oxibuprocaina al 0,5% (Alcon Cusí S.A., El Masnou, Barcelona, Spain) en cada ojo para inducir midriasis y anestesia local, respectivamente. A continuación se procede a la realización de las inyecciones sub-retinianas en ambos ojos del animal de manera consecutiva. Con ayuda de jeringa WPI de 10uL (NanoFil Syringe, WPI, Sarasota, Florida, EE. UU) y aguja de 34G con punta biselada se realiza una incisión en el ojo del ratón en la zona próxima al limbo escleral. Inmediatamente después se introduce a través de la incisión generada otra jeringa WPI de 10uL con aguja de 33G con punta roma que se dirige hasta la cavidad sub-retiniana. Se inyecta 1µL de la solución *scramble* o moduladora en cada ojo, induciendo un pequeño desprendimiento de retina que generalmente se resuelve por sí solo en cuestión de pocos días. En la Figura 25 se pueden observar una fotografía del procedimiento de inyección sub-retiniana (arriba) y un esquema de la metodología utilizada para realizar las inyecciones con una aproximación trans-escleral (abajo).



**Figura 25. Metodología inyecciones sub-retinianas.** Fotografía del procedimiento de inyección sub-retiniana (arriba) y esquema de la metodología utilizada para realizar las inyecciones con una aproximación trans-escleral (abajo).

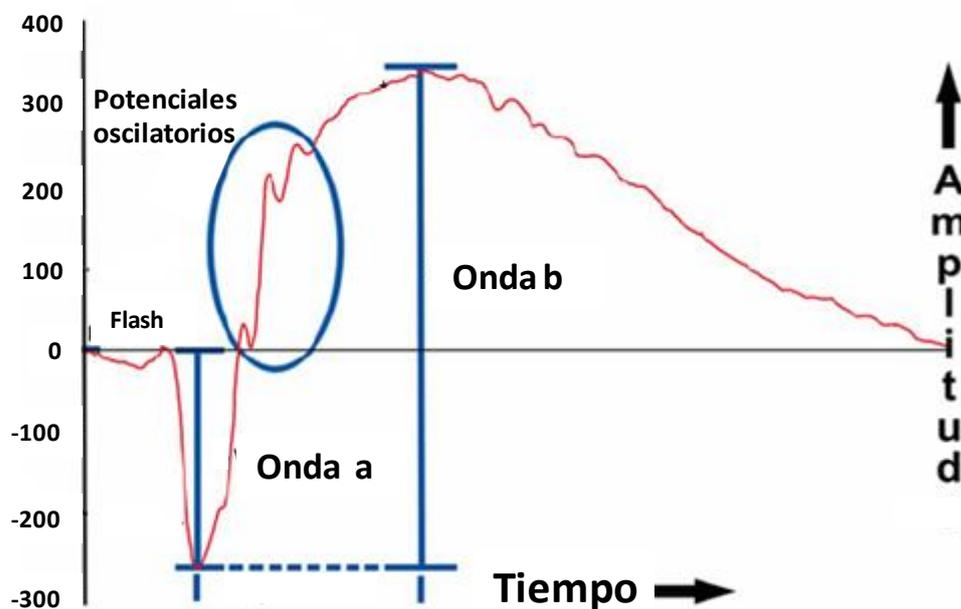
Terminadas las inyecciones, se aplica una gota de antibiótico (Dexametasona + neomicina + polimixina B, Maxitrol) y de metilcelulosa al 2% (Methocel) en las superficies oculares como medida antiséptica así como para preservar de la desecación. Se colocan los ratones sobre una manta térmica con control de temperatura a 37°C hasta completar la recuperación de la anestesia. En los días posteriores se realizan chequeos diarios para comprobar que el estado de los ojos es el correcto.

En el caso de los ratones WT utilizados para las pruebas de capacidad de infección de los AAVs, pasados 12 días post-inyecciones los animales fueron sacrificados y los ojos enucleados. Para su observación en microscopio de fluorescencia, las retinas fueron montadas en portaobjetos o cortadas en criostato en secciones de 7µm. En el caso de las

inyecciones SR en los ratones rd10, pasados 7 y 12 días post-inyecciones los ratones fueron sometidos a estudios electroretinográficos.

## **15. Registros electroretinográficos (ERGs)**

La electroretinografía (ERG) mide el conjunto de acontecimientos electrofisiológicos que se generan en la retina como consecuencia de una estimulación luminosa y es el reflejo del estado funcional de la misma. En respuesta a un destello de luz en la retina se genera un potencial en el que participan los diversos tipos celulares que la componen. Del ERG se obtienen dos respuestas fundamentales; las ondas a y b que reflejan la actividad funcional de capas externas y medias de la retina (Figura 26). La onda a se genera en respuesta al cierre de los canales de  $\text{Na}^+$  en los fotorreceptores, por lo que corresponde a la actividad de conos y bastones en condiciones fotópicas. Por otro lado, la onda b corresponde a la despolarización provocada por cambios en la concentración extracelular de iones  $\text{K}^+$  dependiente de células bipolares y de Müller. Los Potenciales Oscilatorios (OPs, por sus siglas en inglés) traducen actividad fotópica, especialmente relacionada con los colores. Corresponden a la actividad de las células amacrin.



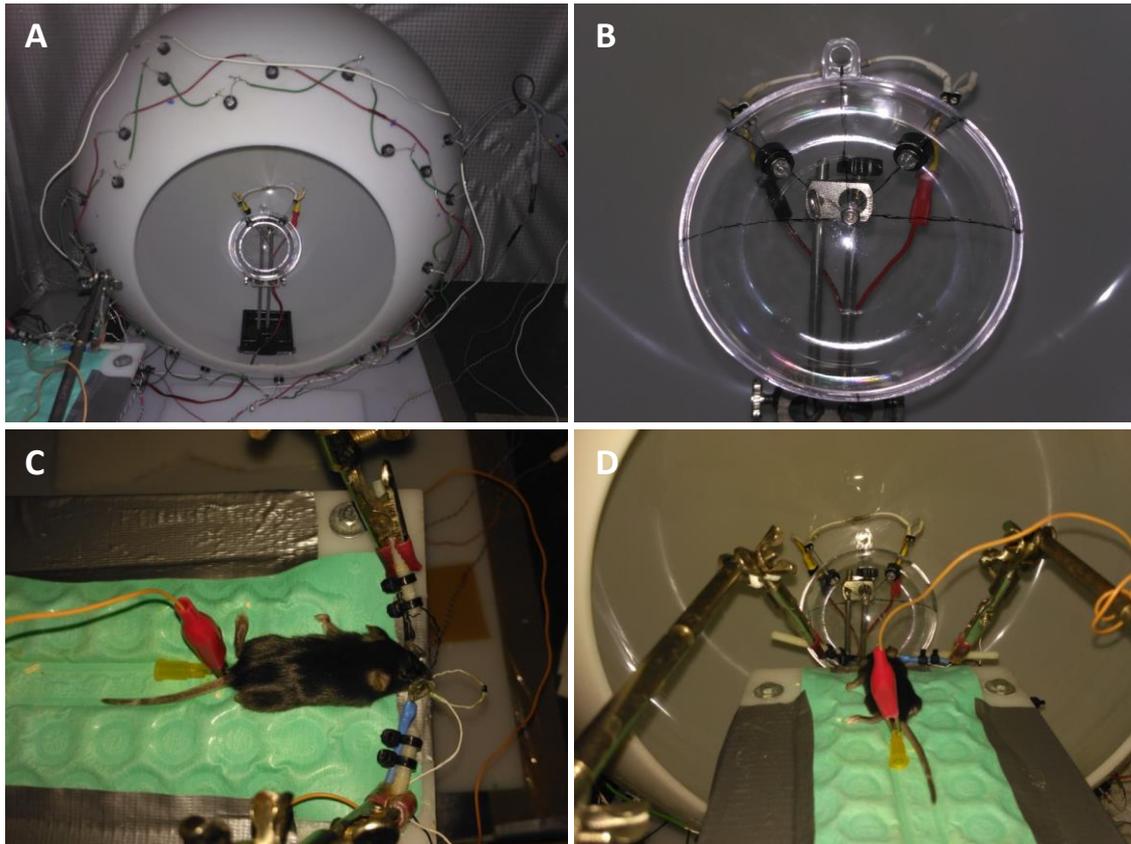
**Figura 26. Ejemplo de registro ERG.** Se aprecian las ondas a y b y los potenciales oscilatorios (OPs) generadas por la excitación de diferentes tipos celulares de la retina.

Los valores de ERG pueden variar en base a la metodología de estudio, el tipo de fotoestimulador, el tipo de electrodo, los parámetros de estímulo y el estado adaptativo del ratón (preadaptación a la luz o a la oscuridad). De esta manera los valores de ERG pueden atribuirse a las funciones individuales de cada una de las células de la retina. Por ejemplo, cuando los ratones están preadaptados a la oscuridad y la estimulación lumínica es de una intensidad baja ( $<-2 \log \text{ Cds/m}^2$ ) es posible detectar solamente la actividad de los fotorreceptores bastones, mientras que cuando dicha intensidad aumenta ( $>-2 \log \text{ Cds/m}^2$ ) la actividad detectada será correspondiente a ambos fotorreceptores y de otros tipos celulares como bipolares o amacrinas. Por el contrario, en animales adaptados a la luz al estimularles lumínicamente conseguimos respuesta aislada de conos.

En este proyecto de tesis doctoral, los ratones rd10 a los que se les hizo inyección subretiniana, 45 ratones en total, fueron sometidos a estudios de ERG. Los registros electroretinográficos se realizaron en el animalario de la Universidad de Alcalá de Henares, en colaboración con el Dr. Pedro de la Villa.

Previamente a realizar los ERGs, los ratones son adaptados a condiciones de total oscuridad por un periodo mínimo de 12 horas. A continuación, son anestesiados mediante inyección subcutánea de una solución de Ketamina (70mg/Kg) y xilacina (7mg/Kg). Una vez anestesiados se instila una gota de tropicamida al 1% (Alcon Cusí S.A., El Masnou, Barcelona, España) y otra de oxibuprocaina al 0,5% (Alcon Cusí S.A.) en cada ojo para inducir midriasis y anestesia local, respectivamente. También se aplicó en cada ojo del ratón una gota de metilcelulosa al 2% (Methocel, Ciba Vision, Hetlingen, Switzerland) para preservarlos de la desecación durante el procedimiento.

Se colocan 3 electrodos en los ratones, el positivo en contacto con la superficie corneal, el negativo o de referencia dentro de la boca y el de toma de tierra en la cola del ratón. Se corrobora una apertura máxima del iris (midriasis) que garantiza una correcta estimulación de toda la retina. Se introdujo el ratón en la campana de Ganzfeld, que asegura una iluminación homogénea de  $120^\circ$  en la retina central, donde se efectuaron los estímulos luminosos de baja intensidad ( $\log -6$  a  $\log -2 \text{ cd}\cdot\text{s/m}^2$ ).



**Figura 27. Instrumentación utilizada en los registros Electroretinográficos (ERGs).** (A) Campana Ganzfel y miniGanzfel. (B) Vista detallada de la campana miniGanzfel. (C) Detalle de la colocación de tres electrodos: de tierra en cola, de referencia en boca y positivos en contacto con la superficie corneal de cada ojo. (D) Vista general del posicionamiento del ratón para la toma de registros ERGs.

A continuación se procedió con el protocolo estándar de ERGs en los que los ratones son sometidos a estímulos luminosos de diferentes potencias, frecuencias y tiempos de exposición. En primer lugar, se registra la respuesta escotópica después de la adaptación a la oscuridad (12 horas). A continuación, se aplicaron una serie de estímulos de intensidad creciente para registrar secuencialmente respuestas de bastones, respuestas mixtas y potenciales oscilatorios. Finalmente, los ratones se adaptaron a una luz superior a 100 cd/m<sup>2</sup> durante 5-10 min, y luego se registraron las respuestas de los conos y la respuesta Flicker (de parpadeo). Los protocolos de estimulación han sido diseñados de acuerdo con la Sociedad Internacional de Electrofisiología Clínica de la Visión. A continuación se resume el protocolo aplicado en los ratones:

**A. Adaptación a la oscuridad (12 horas).**

- 1.) 1V; 2'0 ms; Ganzfeld (16LED); 10x10s.
- 2.) 1'5V; 6'0 ms; Ganzfeld (16LED); 10x20s.
- 3.) 5'0V; 6'0 ms; MiniGanzfeld; 6x30s.
- 4.) 5'0V; 30-10000Hz; 6'0ms; MiniGanzfeld; 6x30s; Potenciales oscilatorios.

**B. Adaptación a la luz.**

Adaptación previa a la luz de fondo durante al menos 5 minutos.

- 5.) 5'0V; 6'0ms; MiniGanzfeld; 45x1s.
- 6.) 5'0V; 6'0ms; 45x1s; MiniGanzfeld; Flicker 20Hz.

Las respuestas electrofisiológicas registradas son amplificadas y filtradas (amplificador de CP511 AC, Grass Instruments, Quincy, MA, EE.UU.) y digitalizadas (ADInstruments Ltd, Oxfordshire, UK). Todo el proceso es controlado por el software de Scope versión 6.4 (Power Lab, ADInstruments Ltd). Una vez terminado el protocolo de ERGs, los ratones se colocaron en manta eléctrica o sistema de calor a 37°C hasta la total recuperación de la anestesia.

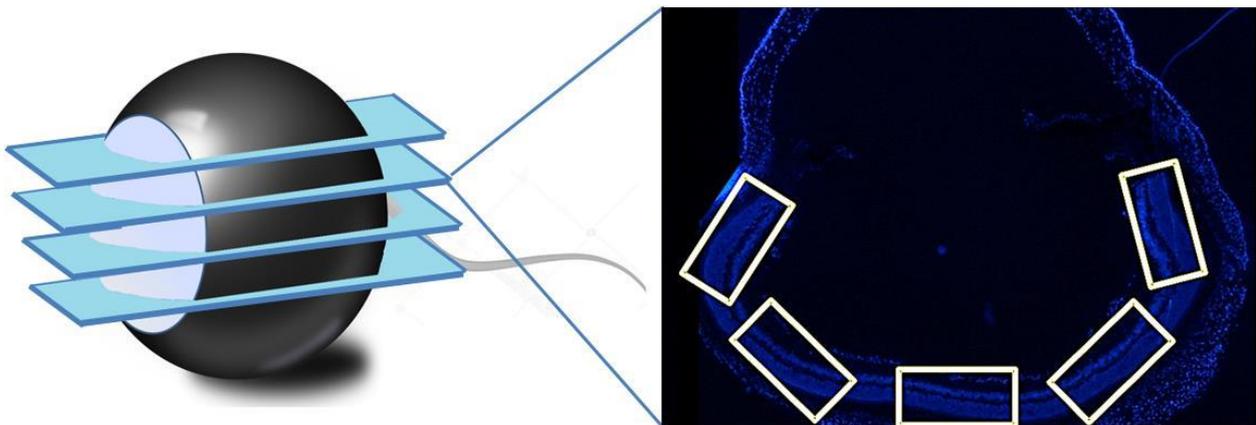
Esta prueba se realizó a los 17 y 22 días de vida del animal (una y dos semanas posteriores a la inyección de las soluciones moduladoras de la expresión de miRNAs). Posteriormente los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia inhalatoria (isoflurano), los ojos enucleados y fijados en paraformaldehído 4% en PBS para realizar análisis histológicos.

**16. Análisis histológicos de la modulación *in vivo* de los miRNAs**

Los ratones tratados con moduladores de miRNAs son sacrificados justo después de realizarles los últimos registros electroretinográficos, a P22. Los ojos son enucleados y se les realiza el mismo tratamiento que el descrito previamente en el sub-apartado 2.4.

Posteriormente, se realizaron cortes histológicos transversales (7  $\mu\text{m}$ ) en criostato, cogiendo muestras histológicas de 4 zonas diferentes del ojo.

Para el análisis del grosor de la capa de fotorreceptores, los núcleos se tiñeron con DAPI utilizando el medio de montaje Prolong gold with DAPI (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) y se visualizaron utilizando el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tokio, Japón) con una cámara digital Nikon DS-U2 (Nikon, Tokio, Japón) acoplada. Se analizaron un total de 30 ojos, 6 por tratamiento (moduladores-miRNAs y miRNAs-*scramble*). De cada ojo se analizaron cuatro zonas diferentes, y por cada zona se tomaron cinco imágenes; área central de la retina, áreas adyacentes izquierda y derecha a área central y áreas periféricas izquierda y derecha de la retina (Figura 28). Posteriormente por cada imagen se obtuvieron cinco medidas del grosor de la capa de fotorreceptores con la ayuda del programa ImageJ (NIH-Image) y la media del número de filas de células fotorreceptoras. Finalmente, se compararon los datos obtenidos de los ojos tratados con AAV moduladores de miRNAs con los obtenidos en sus ojos contralaterales tratados con AAV-*scramble*.



**Figura 28.** Esquema de la metodología utilizada para el estudio del grosor del ONL y número de filas de fotorreceptores. A la izquierda las 4 zonas diferentes del ojo analizadas, y en la derecha las áreas estudiadas en cada uno de los cortes histológicos analizados.

## **17. Análisis del transcriptoma con los arrays Clariom™ S de Affymetrix**

Se analiza el transcriptoma completo de las retinas de 3 ojos tratados con ssAAV-KAnc80-anti-miR-6937-5p y de sus 3 ojos contralaterales tratados con ssAAV-

KAnc80-*scramble*-inhibidor utilizando 6 arrays Clariom S PICO (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.). Para ello, se realizaron nuevas inyecciones SR en ratones rd10 a P10 y se obtuvieron las muestras retinianas a P22. En paralelo, se analizaron también 3 retinas de ratones rd10 a las que no se les aplicó ningún tratamiento ni se les realizó inyección SR alguna (controles).

La cantidad de RNA inicial utilizado para los arrays Clariom S PICO fue de 10 ng. Se realizó el procedimiento siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento es similar al detallado para los arrays de GeneChip 1.0 MTA con la salvedad de que estos arrays incorporan un paso de pre-amplificado de las muestras. Los datos brutos obtenidos del escaneado de los arrays los analizamos utilizando el Transcriptome Analysis Console (TAC) Software (Affymetrix, Santa Clara, California, EE.UU.).

A continuación comparamos los valores de expresión de los diferentes grupos analizados. Por una parte comparamos los ratones tratados con inhibidor del miR-6937-5p con los *scramble* y con los controles para la identificación de aquellos mRNAs diferencialmente expresados (D.E.) debido a la modulación del miRNA. Por otra parte, comparamos las retinas *scramble* y controles para identificar aquellos genes con alteración en su expresión debido a las inyecciones SR. Aquellos genes sin alteración entre los grupos *scramble* y control, pero D.E. entre los ratones tratados con inhibidor del miR-6937-5p y los *scramble* y también entre los tratados con inhibidor del miR-6937-5p y los controles, los consideramos para estudios posteriores. Dichos genes fueron sometidos a estudios de ontología genética (GO) y análisis de enriquecimiento de rutas biológicas y a estudios de redes de interacción miRNA-mRNA siguiendo el mismo procedimiento detallado anteriormente en los apartados 8 y 9.

## **18. Puesta a punto de las infecciones/transfecciones *in vitro* en células MU-PH1.**

Utilizamos la línea celular inmortalizada de retinas de ratón MU-PH1 cedidas amablemente por el profesor Nicolás Cuenca, de la Universidad de Murcia. Esta línea celular es derivada de cultivo de células de Müller de retinas de ratones adultos, con características de fotorreceptor, de célula glial y de células madre<sup>196</sup>.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con 250µL de medio DMEM/F12 con 2% de FBS y 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 10.000µg/ml) suplementado con 2% de complemento B27 y 20 ng/ml de factor FGF-2 humano a 37°C en una incubadora bajo una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>/95% de aire. Las células se siembran en una densidad inicial de aproximadamente 2x10<sup>4</sup> células por pocillo. Pasadas 24 horas después de ser sembradas, las células se infectan/transfectan con diferentes metodologías:

### **18.1 Infección *in vitro* con Lentivirus (LV):**

Utilizamos el lentivirus-*scramble* inhibidor (que expresa mCherry) previamente generado (ver *Generación Lentivirus (LV) con moduladores de miRNAs*). Se desecha el medio de cultivo anterior y se añaden en 12 pocillos volúmenes seriados de solución de LV (0, 10, 25 o 50µL, 3 pocillos por cada) sobre un volumen final de 100µL de DMEM/F12 con los mismos aditivos antes mencionados más Polybrene 4µL/mL. Se repite este procedimiento en otros 12 pocillos con medio DMEM/F12 al que añadimos además Polybrene 8µL/mL. Las células se incuban con los vectores durante 24 horas; al cabo de este tiempo se hace cambio de medio de cultivo para retirar los vectores y se añade nuevo medio sin Polybrene.

### **18.2 Infección *in vitro* con virus adeno-asociados (AAVs):**

Utilizamos el ssAAV-KAnc80-*scramble* inhibidor (que expresa mCherry) previamente generado (ver *Generación AAVs con moduladores de miRNAs*). Se desecha el medio de cultivo anterior y se añade en 12 pocillos volúmenes seriados de solución de AAVs (0, 5, 10 o 20 µL, 3 pocillos por cada) sobre un volumen final de 100µL de DMEM/F12 con los mismos reactivos antes mencionados. Las células se incuban con los vectores durante 24 horas; al cabo de este tiempo se hace cambio de medio de cultivo para retirar los vectores y se añade nuevo medio.

### **18.3 Transfección plásmidos *in vitro*:**

Tranfectamos las células MU-PH1 con plásmido *scramble*-inhibidor (que expresa mCherry) adquirido en GeneCopoeia utilizando para ello el agente de transfección Lipofectamine® 3000 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, por una parte se diluye el agente

Lipofectamine 3000 en medio Opti-MEM (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) (0.3  $\mu$ L en 10 $\mu$ l) y se reparte en dos tubos de 1.5 mL. Por otra parte se diluye el ADN plasmídico también en Opti-MEM (0.2  $\mu$ g ADN en 10 $\mu$ l). A continuación, se añade el ADN diluido a cada tubo con Lipofectamina 3000 diluido (proporción 1:1). Se incuba la mezcla durante 10-15 minutos. Se añaden 10 $\mu$ l de la mezcla (100ng ADN plasmídico) en cada pocillo.

#### **18.4 Transfección de miRIDIAN microRNA mimics *in vitro*:**

Tranfectamos las células MU-PH1 con el miRIDIAN microRNA Mimic Transfection Control (Dharmacon, Lafayette, CO, EE.UU.) el cual es un imitador de miRNA que está marcado con Dy547. Para ello, utilizamos el agente de transfección Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), con el cual generamos complejos lipídicos que contienen el modulador de miRNAs capaces de transfectar las células MU-PH1. Brevemente, por una parte se diluye el agente Lipofectamine RNAiMAX en medio Opti-MEM (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) (1.5  $\mu$ L en 25 $\mu$ l). Por otra parte se diluye el RNA también en Opti-MEM (10 $\mu$ M RNA en 25 $\mu$ l). A continuación, se añade el RNA diluido al tubo con Lipofectamina RNAiMAX diluido (proporción 1:1). Se incuba la mezcla durante 5 minutos y se añaden 10 $\mu$ l de la mezcla en cada pocillo. Pasadas 8 horas se añaden otros 600 $\mu$ L de medio de cultivo.

#### **18.5 Estudios de capacidad de infección/transfección:**

##### **Microscopía**

Se utiliza este método para ambos sistemas de infección, LV y AAVs, y para la transfección de plásmidos mediante complejos lipídicos.

En el caso de las infecciones, las células se mantienen en cultivo 96 horas post-infecciones y en el caso de la transfección de plásmidos 48 horas, tras los cuales se procede a la detección de la expresión de mCherry en microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-S (Nikon, Tokio, Japón) y determinamos la cantidad de células infectadas con respecto al total de células en cultivo, identificada mediante

microscopía de contraste de fases y utilizando el programa Nis-Elements (Nikon, Tokio, Japón).

### **Citometría de flujo**

Para determinar la capacidad de transfección del sistema miRIDIAN microRNA Mimics realizamos estudios de citometría de flujo. Esta técnica es capaz de discriminar partículas de diferente tamaño y fluorescencia, permitiendo por lo tanto diferenciar las células transfectadas de las no transfectadas mediante la detección de la emisión de Dy547 por las células transfectadas.

Es una técnica analítica que se basa en el análisis simultáneo de varios parámetros de naturaleza óptica, de una forma rápida y sobre gran número de partículas individualizadas. Este análisis se realiza sobre cada partícula en base a la dispersión de la luz y a la emisión de fluorescencia de las partículas iluminadas por una fuente de luz. El análisis se realiza a velocidades de miles de células/segundo, lo que permite obtener datos de elevada fiabilidad estadística, así como identificar poblaciones representadas en baja frecuencia dentro de la población global.

Utilizamos el sistema Guava® easyCyte 8HT Benchtop Flow Cytometer (Millipore, Billerica, Massachusetts, EE.UU.) para realizar nuestros estudios de citometría de flujo. Resumidamente, se lavan dos veces las células en cultivo con PBS, se homogenizan por acción mecánica en 200µL de PBS y se transfieren a placa de 96 pocillos de fondo redondo (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). A continuación se analizan mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del fabricante.

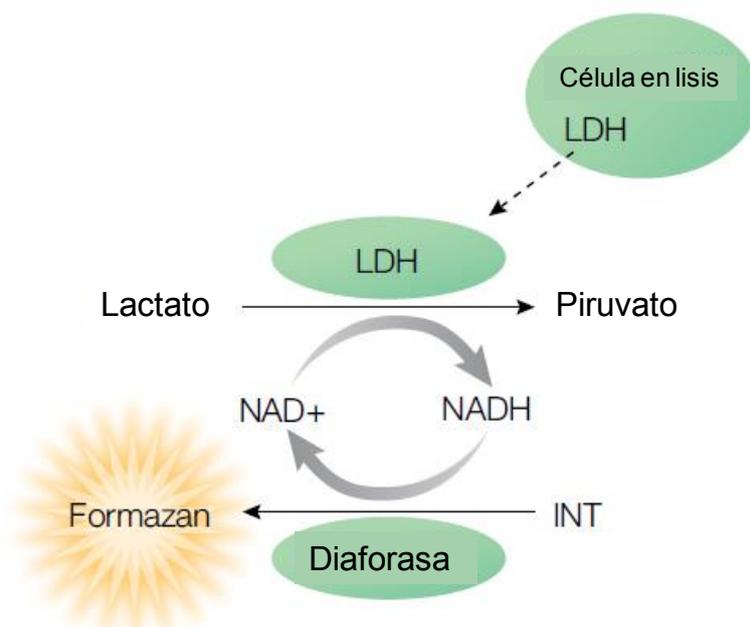
## **20. Aumento expresión miR-6937-5p *in vitro* y estudio de viabilidad celular y citotoxicidad**

Utilizamos los miRIDIAN microRNA mmu-miR-6937-5p mimic para aumentar la expresión del miR-6937-5p en la línea celular MU-PH1 y simular así la sobre-expresión detectada de este miRNA en los ratones rd10. Para ello, utilizamos el agente de transfección Lipofectamine® RNAiMAX, siguiendo el mismo protocolo utilizado en la puesta a punto de las transfecciones *in vitro*. Se realizó modulación de la expresión del miR-6937-5p en 6 pocillos y en 2 cultivos independientes. También se realizó

transfección en otros 6 pocillos con miRIDIAN microRNA Mimic Negative Control como control negativo del ensayo.

Posteriormente, realizamos estudios de viabilidad celular y citotoxicidad para determinar si el aumento de la expresión del miR-6937-5p tiene un efecto en la supervivencia celular. Para este propósito utilizamos el ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96® (Promega, Madison, WI, EE.UU.). En este ensayo se mide la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que se libera tras la lisis celular, con un ensayo enzimático de 30 minutos que da como resultado la conversión de una sal de tetrazolio (INT) en un producto rojo de formazano (Figura 29).

Para realizar este estudio se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, después de 48 horas se recogen 50µL de los sobrenadantes de los cultivos celulares. Se incuban con solución de reacción durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, se detiene la reacción y se mide la absorbancia a 492 nm utilizando un lector de placas estándar de 96 pocillos. La cantidad de color generado es proporcional al número de células lisadas. La absorbancia obtenida de cada sobrenadante se normaliza al contenido total de LDH en las células restantes, que se obtuvo incubando las células con 1x solución de lisis durante 30 minutos.



**Figura 29. Reacción ensayo de citotoxicidad.** La liberación de LDH de las células dañadas se mide suministrando lactato, NAD<sup>+</sup> e INT como sustratos en presencia de diaforasa. La generación de un producto de formazan rojo es proporcional a la cantidad de LDH liberada y, por lo tanto, a la cantidad de células lisadas.

Cuantificamos mediante qPCR la alteración en la expresión del miR-6937-5p en las células MU-PH1 provocada por esta metodología. El protocolo de qPCR utilizado fue el mismo que en los estudios de expresión de miRNAs.

## **21. Análisis estadísticos**

Los valores obtenidos están representados como la media  $\pm$  S.E.M. (error estándar de la media) de al menos tres experimentos independientes. Excepto cuando se indica lo contrario, la significancia estadística fue analizada con el test t-Student y con test de Mann-Whitney para distribuciones normales y no paramétricas, respectivamente, utilizando el software SPSS Statistics v22 (IBM, Nueva York, EE.UU.). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas las medidas con una probabilidad inferior a 0.05.



## ***RESULTADOS***



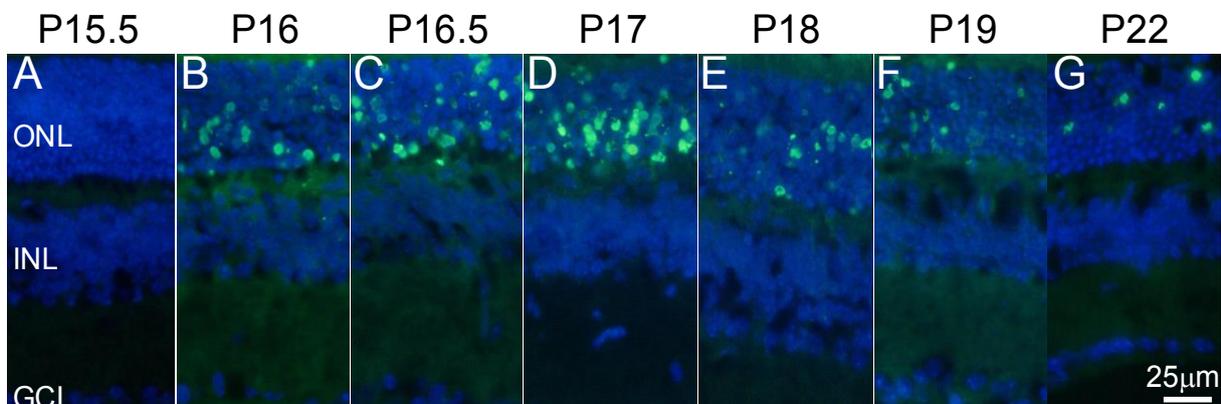
## RESULTADOS

### 1. Estudio del comienzo y evolución de la muerte celular de los fotorreceptores en retinas de ratones rd10

#### **1.1 La muerte de las células fotorreceptoras comienza a P16 en la zona central de la retina y avanza hacia la periferia.**

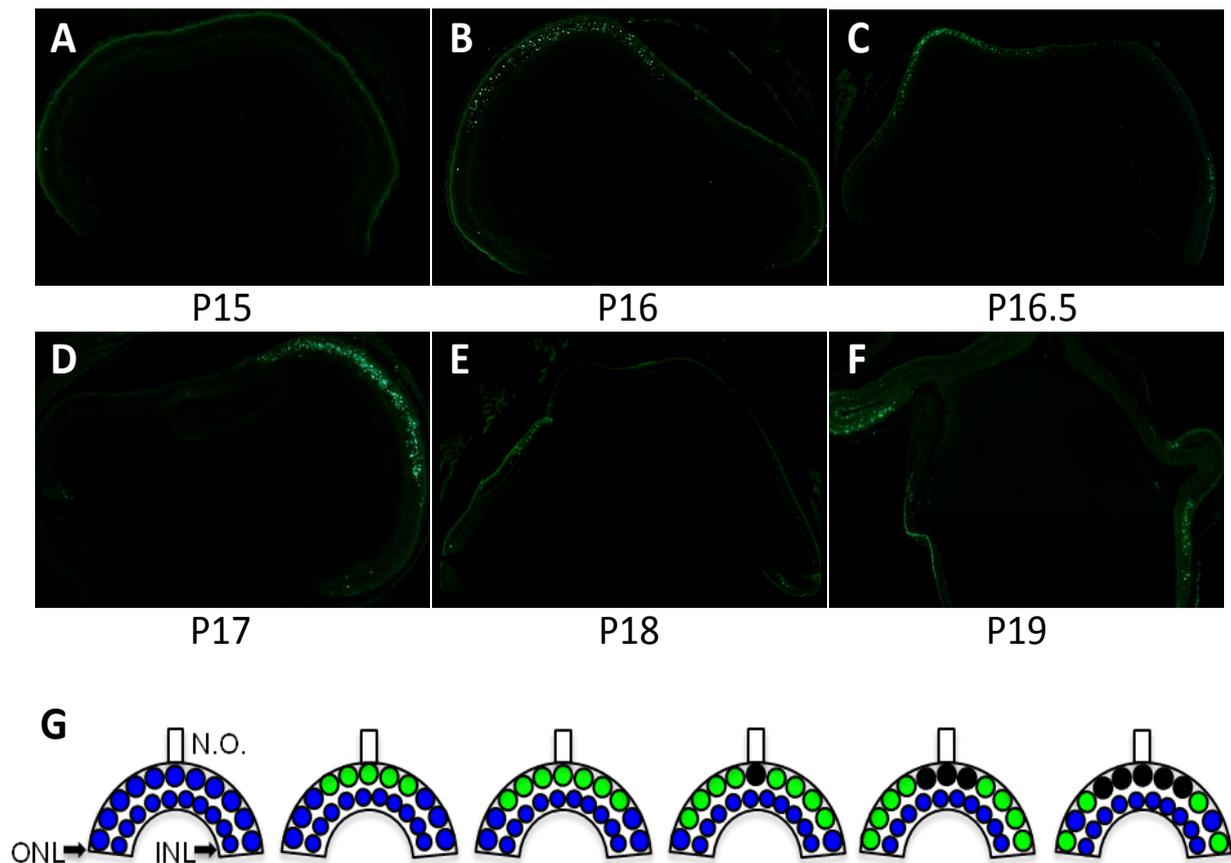
Realizamos un análisis detallado de la dinámica de la muerte de las células fotorreceptoras en secciones de retina de ratones desde el día postnatal 13 a día postnatal 22 a intervalos de 12 horas. Este ensayo lo realizamos con el fin de seleccionar los puntos temporales de interés para los estudios de expresión global de miRNA y mRNA. Para ello utilizamos el ensayo de TUNEL (TdT mediated dUTP Nick-End labeled assay).

La señal de TUNEL comenzó en la retina central en el día postnatal 16 (P16), limitándose principalmente a la capa nuclear externa (ONL), mientras que no se encontró ningún signo de señal apoptótica a P15.5 (Figura 30).



**Figura 30. Muerte de las células fotorreceptoras en la retina del ratón rd10 detectada por TUNEL.** (B-G) La muerte celular de los fotorreceptores detectado por TUNEL (verde) comienza abruptamente en el día postnatal 16 (P16) en la retina central, sin núcleos apoptóticos detectados a P15.5. (A). Los núcleos celulares (azul) están marcados con DAPI. Abreviaturas: GCL: capa de células ganglionares; INL: capa nuclear interna; ONL: capa nuclear externa.

Se observa también como la muerte de los fotorreceptores progresa desde la zona central hacia la retina periférica, resultados similares a los observados en estudios anteriores (Figura 31)<sup>61,62</sup>.



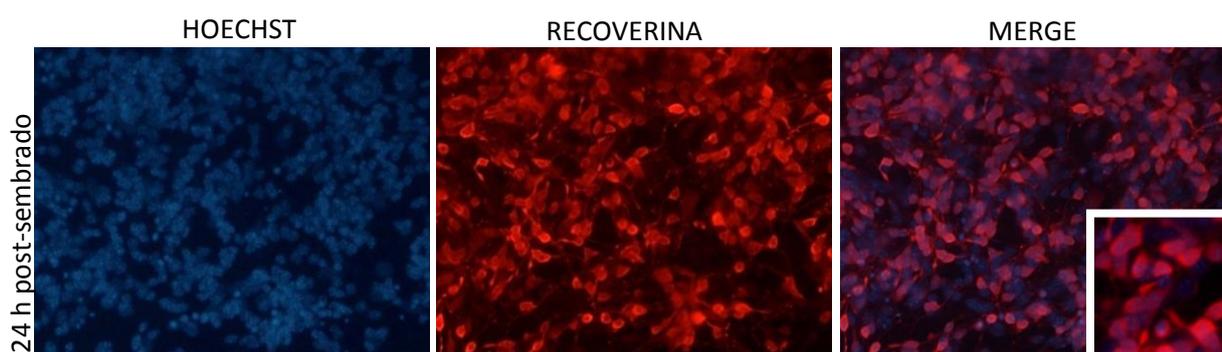
**Figura 31. Detección de células apoptóticas mediante TUNEL en ratones rd10.** La muerte celular avanza desde la zona central (B-C) hacia la periferia (E-F). A P15 no se detectan células apoptóticas (A). Nótese un marcaje verde suave correspondiente a la autofluorescencia producida por los pigmentos de los fotorreceptores (apreciable sobretodo en la imagen A y en la periferia de la imagen B). En el panel de abajo (G) se representa esquemáticamente el proceso de muerte celular de los fotorreceptores. Los núcleos pre-apoptóticos están representados por círculos azules, mientras que los núcleos apoptóticos están representados por círculos verdes. Abreviaturas: INL: capa nuclear interna; ONL: capa nuclear externa; N.O.: nervio óptico.

## 2. Estudio de riqueza de células fotorreceptoras en cultivos primarios

### **2.1 Los cultivos primarios de retinas de ratón están enriquecidos en células fotorreceptoras.**

Usando la metodología antes detallada de digestión, separación y cultivo de retinas de ratones WT a los 6 días post-natales (ver sección 4 del apartado Materiales y Métodos), conseguimos cultivos con una riqueza entorno al 86% de células fotorreceptoras.

Para determinar esta riqueza en fotorreceptores se analizaron 6 muestras diferentes de cultivos primarios a las 24 horas post-sembrado a los que posteriormente se les realizó estudio inmunocitoquímico con anticuerpo anti-recoverina, proteína específica de células fotorreceptoras. Se realizó conteo de células totales (núcleos teñidos con Hoechst) y se comparó con el número total de células recoverina positivas (Figura 32). Se observaron una media de  $86.42 \pm 5.67$  fotorreceptores por cada 100 células en las 6 muestras analizadas.



**Figura 32. Estudio riqueza en fotorreceptores de cultivos primarios.** Fotografías representativas de los ensayos inmunocitoquímicos con anti-recoverina (rojo) y Hoechst (azul) para determinar la riqueza en fotorreceptores de los cultivos primarios.

### **3. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para RP basadas en miRNAs**

Usando el ratón rd10, modelo murino de retinosis pigmentaria, y ratones WT, realizamos un estudio detallado de la expresión global de más de 1900 microRNAs y su correlación con el transcriptoma completo, constituido por más de 23.000 genes. De esta manera investigamos una posible diferencia en el perfil de expresión de miRNAs y mRNAs entre retinas de ratones rd10 y WT en estadios previos al comienzo de la muerte de los fotorreceptores y en muestras posteriores a ese comienzo. Este estudio nos permitió identificar un conjunto de miRNAs expresados diferencialmente entre ambas cepas de ratones y nos permitió también analizar el posible papel de estos miRNAs en las vías biológicas implicadas en la degeneración de la retina a través de sus genes diana predichos.

### 3.1 El estudio del perfil global de expresión de miRNAs permite el descubrimiento de 19 miRNAs diferencialmente expresados en retinas de ratones rd10.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de la dinámica de muerte de las células fotorreceptoras, analizamos la expresión global de miRNAs antes y después del inicio apoptótico, en los días posnatales 15 y 17, respectivamente, cuando la pérdida de fotorreceptores es imperceptible. También analizamos retinas tanto rd10 como WT a P13 con el fin de determinar la expresión de miRNAs en una etapa temprana, 3 días antes de la detección de fotorreceptores apoptóticos en los ratones rd10. Consideramos por tanto poco probable que en esta edad temprana, a P13, el perfil de expresión de miRNAs esté influenciado por procesos apoptóticos en nuestro modelo murino.

Los estudios realizados con los GeneChip miRNA 4.0 revelaron un gran número de miRNAs diferencialmente expresado (D.E.) entre ambas cepas con un *fold-change* de más de |1.5| y valor  $p < 0,05$ . De los más de 1900 miRNAs analizados, un total de 152 miRNAs se expresaron de forma diferencial en las retinas de ratones rd10 con respecto a las muestras control (Tabla 3), a partir de la cual compilamos una lista de 19 miRNAs candidatos para el análisis posterior basada principalmente en valores de *fold-change*. Otros criterios de exclusión fueron aquellos miRNAs con una desviación estándar igual o mayor al 10% en la triplica muestral y/o aquellos miRNAs con valores cercanos al ruido de fondo.

**Tabla 3. miRNAs diferencialmente expresados.** (F.C. >1.5 y valor  $p < 0,05$ ) detectados por los arrays GeneChip miRNA 4.0. En negrita aquellos valores que cumplen con dichos criterios.

Transcript ID	p15 vs. p13	p-value	p17 vs. p13	p-value
mmu-miR-135a-1-3p	<b>-1,86</b>	<b>0,0228</b>	<b>-1,42</b>	<b>0,0180</b>
mmu-miR-150-3p	<b>1,52</b>	<b>0,0415</b>	<b>1,81</b>	<b>0,0108</b>
mmu-miR-187-5p	<b>3,06</b>	<b>0,0317</b>	<b>3,36</b>	<b>0,0226</b>
mmu-miR-106a-5p	<b>-1,50</b>	<b>0,0227</b>	<b>-2,22</b>	<b>0,0120</b>
mmu-miR-20b-5p	<b>-1,85</b>	<b>0,0151</b>	<b>-2,55</b>	<b>0,0018</b>
mmu-miR-503-5p	<b>-3,06</b>	<b>0,0007</b>	<b>-2,07</b>	<b>0,0116</b>
mmu-miR-193b-5p	<b>1,77</b>	<b>0,0362</b>	<b>1,07</b>	<b>0,7644</b>
mmu-miR-664-5p	<b>1,91</b>	<b>0,0073</b>	<b>1,41</b>	<b>0,1123</b>
mmu-miR-3102-3p	<b>1,58</b>	<b>0,0395</b>	<b>1,50</b>	<b>0,0544</b>
mmu-miR-5132-5p	<b>1,52</b>	<b>0,0119</b>	<b>1,60</b>	<b>0,0062</b>
mmu-miR-6937-5p	<b>4,33</b>	<b>0,0031</b>	<b>20,40</b>	<b>0,0001</b>

<b>Transcript ID</b>	<b>p15 vs. p13</b>	<b>p-value</b>	<b>p17 vs. p13</b>	<b>p-value</b>
mmu-miR-7002-5p	<b>4,95</b>	<b>0,0076</b>	<b>33,58</b>	<b>1,54E-07</b>
mmu-miR-7115-5p	<b>1,65</b>	<b>0,0298</b>	<b>3,84</b>	<b>0,0038</b>
mmu-miR-7682-3p	<b>1,55</b>	<b>0,0099</b>	1,37	0,0305
mmu-miR-6240	<b>1,50</b>	<b>0,2283</b>	<b>6,21</b>	<b>0,0001</b>
mmu-miR-6970-5p	<b>1,56</b>	<b>0,0099</b>	<b>6,47</b>	<b>0,0002</b>
mmu-miR-15b-5p	-1,37	0,0533	<b>-2,01</b>	<b>0,0018</b>
mmu-miR-30b-3p	-1,01	0,8906	<b>-1,74</b>	<b>0,0008</b>
mmu-miR-124-5p	-1,12	0,3249	<b>-1,81</b>	<b>0,0046</b>
mmu-miR-9-3p	-1,26	0,1758	<b>-1,57</b>	<b>0,0323</b>
mmu-miR-146a-5p	-1,14	0,5813	<b>1,83</b>	<b>0,0387</b>
mmu-miR-149-3p	1,17	0,3606	<b>2,56</b>	<b>0,0001</b>
mmu-miR-181a-2-3p	-1,21	0,0375	<b>-1,64</b>	<b>0,0099</b>
mmu-miR-182-3p	-1,40	0,0596	<b>-3,42</b>	<b>0,0019</b>
mmu-miR-183-3p	-1,16	0,1310	<b>-1,68</b>	<b>0,0011</b>
mmu-miR-199a-3p	-1,92	0,0501	<b>-1,55</b>	<b>0,0346</b>
mmu-miR-30e-3p	-1,26	0,3502	<b>-1,83</b>	<b>0,0195</b>
mmu-miR-296-3p	-1,16	0,2023	<b>-2,18</b>	<b>0,0007</b>
mmu-miR-34c-3p	-1,19	0,3408	<b>-1,69</b>	<b>0,0248</b>
mmu-miR-34b-3p	-1,09	0,4136	<b>-1,92</b>	<b>0,0014</b>
mmu-miR-106b-5p	-1,25	0,0551	<b>-2,03</b>	<b>0,0001</b>
mmu-miR-106b-3p	-1,10	0,3212	<b>-1,91</b>	<b>0,0005</b>
mmu-miR-130b-3p	-1,13	0,1359	<b>-1,73</b>	<b>0,0007</b>
mmu-miR-19b-3p	-1,48	0,0776	<b>-2,51</b>	<b>0,0043</b>
mmu-miR-15a-5p	-1,21	0,4621	<b>-1,96</b>	<b>0,0447</b>
mmu-miR-18a-5p	-1,39	0,3300	<b>-3,05</b>	<b>0,0145</b>
mmu-miR-20a-5p	-1,47	0,0006	<b>-2,20</b>	<b>1,35E-05</b>
mmu-miR-29a-3p	1,51	0,1741	<b>2,11</b>	<b>0,0420</b>
mmu-miR-92a-2-5p	-1,05	0,8881	<b>2,88</b>	<b>0,0007</b>
mmu-miR-92a-3p	-1,17	0,0382	<b>-2,11</b>	<b>4,51E-06</b>
mmu-miR-93-5p	-1,35	0,0253	<b>-2,25</b>	<b>0,0004</b>
mmu-miR-93-3p	-1,29	0,1169	<b>-2,19</b>	<b>0,0010</b>
mmu-miR-96-3p	-1,33	0,3054	<b>-2,39</b>	<b>0,0262</b>
mmu-miR-325-5p	-1,04	0,6819	<b>-1,70</b>	<b>0,0002</b>
mmu-miR-346-3p	1,26	0,3833	<b>3,95</b>	<b>0,0014</b>
mmu-miR-350-3p	-1,37	0,1239	<b>-1,96</b>	<b>0,0292</b>
mmu-miR-351-5p	-1,36	0,0297	<b>-2,05</b>	<b>0,0025</b>
mmu-miR-17-5p	-1,38	0,0005	<b>-2,17</b>	<b>2,48E-05</b>
mmu-miR-17-3p	-1,04	0,7322	<b>-1,65</b>	<b>0,0058</b>
mmu-miR-25-3p	-1,35	0,0791	<b>-2,22</b>	<b>0,0044</b>
mmu-miR-28a-5p	-1,15	0,1140	<b>-1,75</b>	<b>0,0008</b>
mmu-miR-28a-3p	-1,28	0,0944	<b>-1,55</b>	<b>0,0199</b>
mmu-miR-181a-1-3p	-1,22	0,1793	<b>-1,81</b>	<b>0,0461</b>
mmu-miR-216a-5p	-1,09	0,4863	<b>-2,16</b>	<b>0,0006</b>
mmu-miR-218-5p	-1,30	0,3910	<b>-3,24</b>	<b>0,0103</b>
mmu-miR-199b-3p	-1,92	0,0501	<b>-1,55</b>	<b>0,0346</b>

<b>Transcript ID</b>	<b>p15 vs. p13</b>	<b>p-value</b>	<b>p17 vs. p13</b>	<b>p-value</b>
mmu-miR-181c-5p	-1,18	0,2795	<b>-1,54</b>	<b>0,0345</b>
mmu-miR-181c-3p	-1,09	0,5378	<b>-1,84</b>	<b>0,0143</b>
mmu-miR-7a-1-3p	-1,38	0,1176	<b>-1,71</b>	<b>0,0269</b>
mmu-miR-7a-2-3p	-1,11	0,3220	<b>-1,59</b>	<b>0,0026</b>
mmu-miR-217-5p	-1,16	0,1777	<b>-1,66</b>	<b>0,0041</b>
mmu-miR-378a-5p	1,03	0,6635	<b>-1,65</b>	<b>0,0039</b>
mmu-miR-378a-3p	-1,03	0,7194	<b>-1,62</b>	<b>0,0022</b>
mmu-miR-431-5p	-1,03	0,8297	<b>-1,54</b>	<b>0,0136</b>
mmu-miR-449a-5p	-1,62	0,1199	<b>-2,23</b>	<b>0,0353</b>
mmu-miR-466a-3p	-1,65	0,1290	<b>-2,38</b>	<b>0,0232</b>
mmu-miR-467a-5p	-1,22	0,2160	<b>-1,89</b>	<b>0,0048</b>
mmu-miR-532-3p	1,03	0,8243	<b>-1,64</b>	<b>0,0108</b>
mmu-miR-484	-1,07	0,4473	<b>-1,73</b>	<b>0,0063</b>
mmu-miR-494-3p	-1,20	0,1809	<b>-1,56</b>	<b>0,0066</b>
mmu-miR-216b-5p	-1,46	0,0848	<b>-2,04</b>	<b>0,0393</b>
mmu-miR-671-3p	1,17	0,2058	<b>-1,53</b>	<b>0,0063</b>
mmu-miR-762	1,08	0,5752	<b>3,48</b>	<b>0,0007</b>
mmu-miR-672-5p	-1,20	0,0431	<b>-1,65</b>	<b>0,0010</b>
mmu-miR-669a-5p	-1,13	0,5404	<b>-1,60</b>	<b>0,0327</b>
mmu-miR-677-3p	-1,21	0,1801	<b>-1,93</b>	<b>0,0045</b>
mmu-miR-423-3p	1,05	0,6603	<b>-1,62</b>	<b>0,0214</b>
mmu-miR-714	-1,14	0,4126	<b>3,78</b>	<b>0,0002</b>
mmu-miR-505-5p	1,01	0,9363	<b>-1,61</b>	<b>0,0097</b>
mmu-miR-676-3p	-1,16	0,0104	<b>-1,68</b>	<b>0,0001</b>
mmu-miR-181d-5p	-1,09	0,4286	<b>-1,55</b>	<b>0,0038</b>
mmu-miR-466e-3p	-1,65	0,1290	<b>-2,38</b>	<b>0,0232</b>
mmu-miR-92b-5p	1,05	0,7156	<b>1,76</b>	<b>0,0137</b>
mmu-miR-1934-3p	1,49	0,2549	<b>4,54</b>	<b>0,0041</b>
mmu-miR-2137	-1,10	0,4606	<b>3,29</b>	<b>0,0003</b>
mmu-miR-2861	1,22	0,2787	<b>2,48</b>	<b>0,0015</b>
mmu-miR-3074-1-3p	-1,15	0,5406	<b>-2,81</b>	<b>0,0040</b>
mmu-miR-3077-5p	1,17	0,3752	<b>2,32</b>	<b>0,0022</b>
mmu-miR-3078-5p	-1,22	0,0064	<b>-2,00</b>	<b>2,29E-05</b>
mmu-miR-669p-5p	-1,13	0,5404	<b>-1,60</b>	<b>0,0327</b>
mmu-miR-3090-5p	1,42	0,2509	<b>4,18</b>	<b>0,0006</b>
mmu-miR-3095-3p	-1,15	0,4495	<b>-1,97</b>	<b>0,0381</b>
mmu-miR-3102-5p	-1,08	0,7947	<b>2,37</b>	<b>0,0089</b>
mmu-miR-3473a	1,15	0,4477	<b>3,54</b>	<b>0,0001</b>
mmu-miR-3960	1,14	0,2307	<b>1,65</b>	<b>0,0027</b>
mmu-miR-3962	-1,68	0,0658	<b>-1,88</b>	<b>0,0119</b>
mmu-miR-378b	-1,11	0,1579	<b>-1,75</b>	<b>0,0005</b>
mmu-miR-3473b	1,16	0,3833	<b>5,58</b>	<b>0,0001</b>
mmu-miR-5121	-1,21	0,0471	<b>-1,68</b>	<b>0,0012</b>
mmu-miR-5122	-1,05	0,8694	<b>2,92</b>	<b>0,0085</b>
mmu-miR-3572-5p	1,11	0,2539	<b>1,66</b>	<b>0,0140</b>

<b>Transcript ID</b>	<b>p15 vs. p13</b>	<b>p-value</b>	<b>p17 vs. p13</b>	<b>p-value</b>
mmu-miR-5126	1,22	0,1290	<b>2,66</b>	<b>0,0001</b>
mmu-miR-5128	1,10	0,6094	<b>2,33</b>	<b>0,0050</b>
mmu-miR-5130	1,19	0,3204	<b>2,62</b>	<b>0,0014</b>
mmu-miR-6239	-1,33	0,1141	<b>-1,67</b>	<b>0,0492</b>
mmu-miR-6366	-1,18	0,3130	<b>2,50</b>	<b>0,0020</b>
mmu-miR-378c	-1,07	0,0664	<b>-1,71</b>	<b>3,58E-05</b>
mmu-miR-6394	1,18	0,2694	<b>1,90</b>	<b>0,0120</b>
mmu-miR-378d	-1,09	0,1544	<b>-1,81</b>	<b>0,0007</b>
mmu-miR-6540-5p	-1,10	0,2450	<b>-1,85</b>	<b>0,0016</b>
mmu-miR-3473e	1,13	0,4942	<b>5,73</b>	<b>0,0001</b>
mmu-miR-6909-5p	-1,07	0,5798	<b>2,22</b>	<b>0,0029</b>
mmu-miR-6910-5p	-1,14	0,5114	<b>3,36</b>	<b>0,0006</b>
mmu-miR-6914-5p	1,48	0,0603	<b>2,02</b>	<b>0,0098</b>
mmu-miR-6931-5p	1,23	0,2101	<b>2,15</b>	<b>0,0052</b>
mmu-miR-6944-5p	1,29	0,1685	<b>2,32</b>	<b>0,0035</b>
mmu-miR-6956-5p	1,29	0,3086	<b>1,83</b>	<b>0,0377</b>
mmu-miR-6965-5p	-1,05	0,7486	<b>-1,64</b>	<b>0,0346</b>
mmu-miR-3547-5p	1,21	0,2958	<b>3,97</b>	<b>4,54E-05</b>
mmu-miR-6968-5p	1,17	0,3451	<b>4,43</b>	<b>3,39E-05</b>
mmu-miR-6980-5p	1,04	0,8000	<b>1,76</b>	<b>0,0396</b>
mmu-miR-6984-5p	-1,15	0,4337	<b>-2,02</b>	<b>0,0150</b>
mmu-miR-7007-5p	-1,10	0,5994	<b>-1,86</b>	<b>0,0221</b>
mmu-miR-7009-5p	1,57	0,3318	<b>3,25</b>	<b>0,0436</b>
mmu-miR-7023-5p	1,29	0,2788	<b>2,55</b>	<b>0,0055</b>
mmu-miR-7035-5p	1,16	0,8146	<b>6,16</b>	<b>0,0183</b>
mmu-miR-7036-5p	1,42	0,1709	<b>4,41</b>	<b>0,0010</b>
mmu-miR-7047-5p	1,27	0,0405	<b>3,08</b>	<b>2,89E-05</b>
mmu-miR-6769b-5p	1,06	0,6857	<b>1,70</b>	<b>0,0037</b>
mmu-miR-7069-5p	1,09	0,7143	<b>2,19</b>	<b>0,0071</b>
mmu-miR-7081-5p	1,32	0,1995	<b>4,25</b>	<b>0,0004</b>
mmu-miR-7085-5p	-1,12	0,6279	<b>1,97</b>	<b>0,0036</b>
mmu-miR-7221-3p	1,68	0,1935	<b>6,94</b>	<b>0,0021</b>
mmu-miR-7648-3p	1,10	0,5639	<b>4,63</b>	<b>1,11E-05</b>
mmu-miR-7036b-3p	1,14	0,4144	<b>5,39</b>	<b>0,0002</b>
mmu-miR-7658-5p	1,41	0,1639	<b>3,03</b>	<b>0,0005</b>
mmu-miR-3620-5p	1,27	0,2966	<b>4,41</b>	<b>0,0013</b>
mmu-miR-7686-5p	1,13	0,7945	<b>3,42</b>	<b>0,0459</b>
mmu-miR-3473f	1,47	0,2324	<b>2,58</b>	<b>0,0156</b>
mmu-miR-8101	1,00	0,9812	<b>1,64</b>	<b>0,0038</b>
mmu-miR-8102	-1,33	0,4832	<b>2,67</b>	<b>0,0263</b>
mmu-mir-183	-1,10	0,2229	<b>-1,58</b>	<b>0,0015</b>
mmu-mir-93	-1,11	0,2630	<b>-1,81</b>	<b>0,0013</b>
mmu-mir-25	-1,15	0,1076	<b>-1,52</b>	<b>0,0116</b>
mmu-mir-1224	-1,12	0,4767	<b>-1,97</b>	<b>0,0044</b>
mmu-mir-677	-1,23	0,2669	<b>-1,54</b>	<b>0,0125</b>

Transcript ID	p15 vs. p13	p-value	p17 vs. p13	p-value
mmu-mir-2137	-1,06	0,6307	<b>1,51</b>	<b>0,0406</b>
mmu-mir-2861	1,10	0,2307	<b>1,98</b>	<b>0,0003</b>
mmu-mir-3473a	1,04	0,8052	<b>3,12</b>	<b>0,0097</b>
mmu-mir-3960	-1,10	0,1490	<b>1,55</b>	<b>0,0006</b>
mmu-mir-6984	-1,19	0,2306	<b>-1,58</b>	<b>0,0219</b>

Por otra parte, los arrays de miScript revelaron un total de 17 miRNAs con *fold-change* > 1.5 (Tabla 4) que se redujeron a 6 miRNAs candidatos siguiendo el mismo criterio de filtrado utilizado para los miRNAs de los arrays GeneChip, es decir, en base a los valores de *fold-change*, predicción de sus mRNA diana y por exclusión de los miRNAs con valores cercanos al ruido de fondo o con una desviación estándar alta de la tríplica muestral. Por lo tanto, nuestra lista de miRNAs candidato aumentó a 25, de los cuales 19 estaban sobre-expresados y 6 infra-expresados.

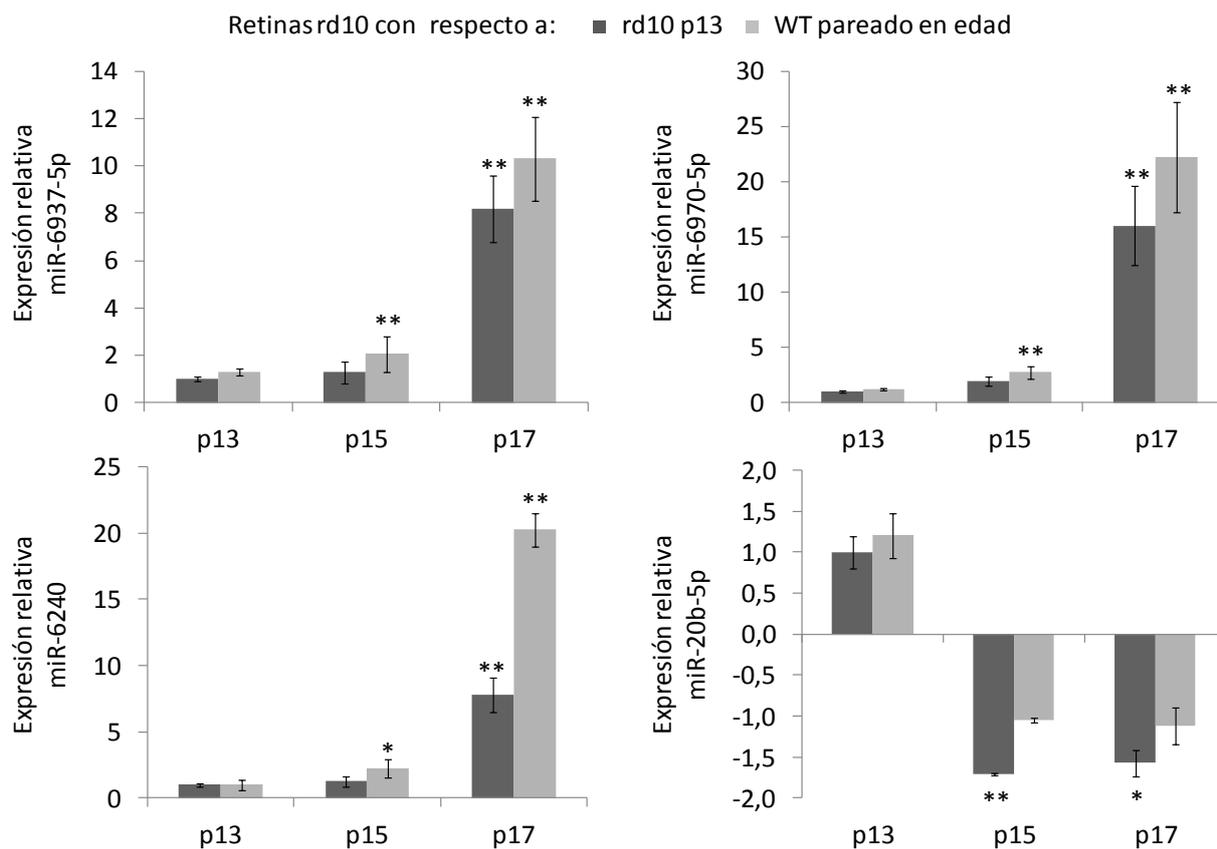
**Tabla 4. miRNAs diferencialmente expresados (F.C. >1.5) detectados por los arrays miScript miRNA PCR.** En negrita aquellos valores que cumplen con dichos criterios.

ID	p15 (rd10 vs. WT)	p17 (rd10 vs. WT)
mmu-let-7b-5p	<b>-1,66</b>	-1,07
mmu-let-7c-5p	<b>-1,85</b>	-1,26
mmu-miR-101a-3p	<b>1,68</b>	1,20
mmu-miR-142a-5p	<b>2,09</b>	<b>1,62</b>
mmu-miR-19b-3p	<b>1,67</b>	-1,18
mmu-miR-1a-3p	-1,66	<b>1,58</b>
mmu-miR-18a-5p	<b>2,01</b>	-1,06
mmu-miR-17-5p	<b>1,64</b>	1,24
mmu-miR-20a-5p	<b>1,52</b>	1,17
mmu-miR-29a-3p	<b>1,81</b>	<b>2,94</b>
mmu-miR-146a-5p	<b>1,15</b>	<b>2,50</b>
mmu-miR-96-5p	<b>1,97</b>	1,23
mmu-miR-155-5p	1,19	<b>1,77</b>
mmu-miR-183-5p	-1,29	<b>-1,55</b>
mmu-miR-22-3p	1,44	<b>1,58</b>
mmu-miR-29b-3p	-1,14	<b>1,91</b>
mmu-miR-92a-3p	1,24	<b>-1,65</b>

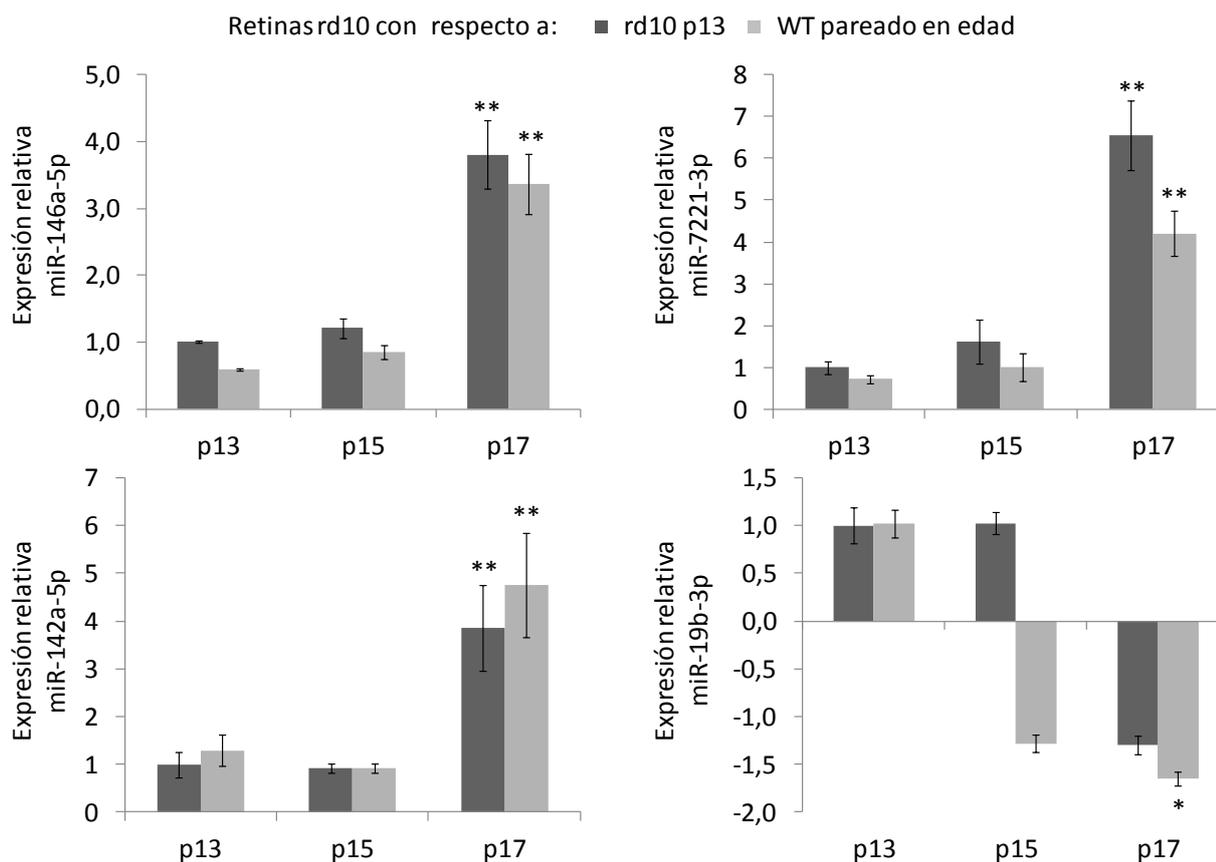
A continuación los niveles de expresión de los miRNAs candidatos D.E. detectados tanto por los arrays GeneChip de Affymetrix como por los miScript PCR arrays fueron validados mediante una segunda técnica, la PCR a tiempo real (qPCR), la cual es la técnica más extendida para este menester.

De los 25 miRNAs testados, 19 miRNAs fueron validados (Tabla 5). La mayoría de los miRNAs validados estaban sobre-expresados (17 de 19 miRNAs), mientras que sólo 2 de 6 miRNAs infra-expresados pudieron ser validados por qRT-PCR. Entre los miRNAs validados, los más sobre-expresados fueron miR-6240 y miR-6970 (22 veces y 21 veces a P17, respectivamente), mientras que miR-20b-5p y miR-19b-3p fueron los únicos miRNAs infra-expresados (-1,76 veces y -1,73 veces a P17, respectivamente) aunque en el caso del miR-20b-5p solamente comparado con muestras rd10 p13. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 33 y Figura 34.

A continuación se realizó una sub-clasificación de los miRNAs validados agrupándolos en base al momento en el que sufren la desregulación: anterior o posterior al inicio de la apoptosis de los fotorreceptores. Se incorporaron 8 miRNAs en el grupo-A (desregulación pre-apoptótica) y 11 miRNAs en el grupo-B (desregulación post-apoptótica). Los miRNAs de cada grupo se pueden observar en la Tabla 5.



**Figura 33. Expresión relativa de cuatro miRNAs del grupo-A medida por qPCR.** Se muestra la expresión relativa de muestras de ratones rd10 a diferentes puntos temporales, P13, P15 y P17, con respecto a muestras rd10 P13 (gris oscuro) o con muestras WT pareadas en edad (gris claro). Los valores que difieren significativamente se indican con asterisco/s (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ , Student's t-test y Mann-Whitney). Los datos se muestran como media  $\pm$  S.E.M.



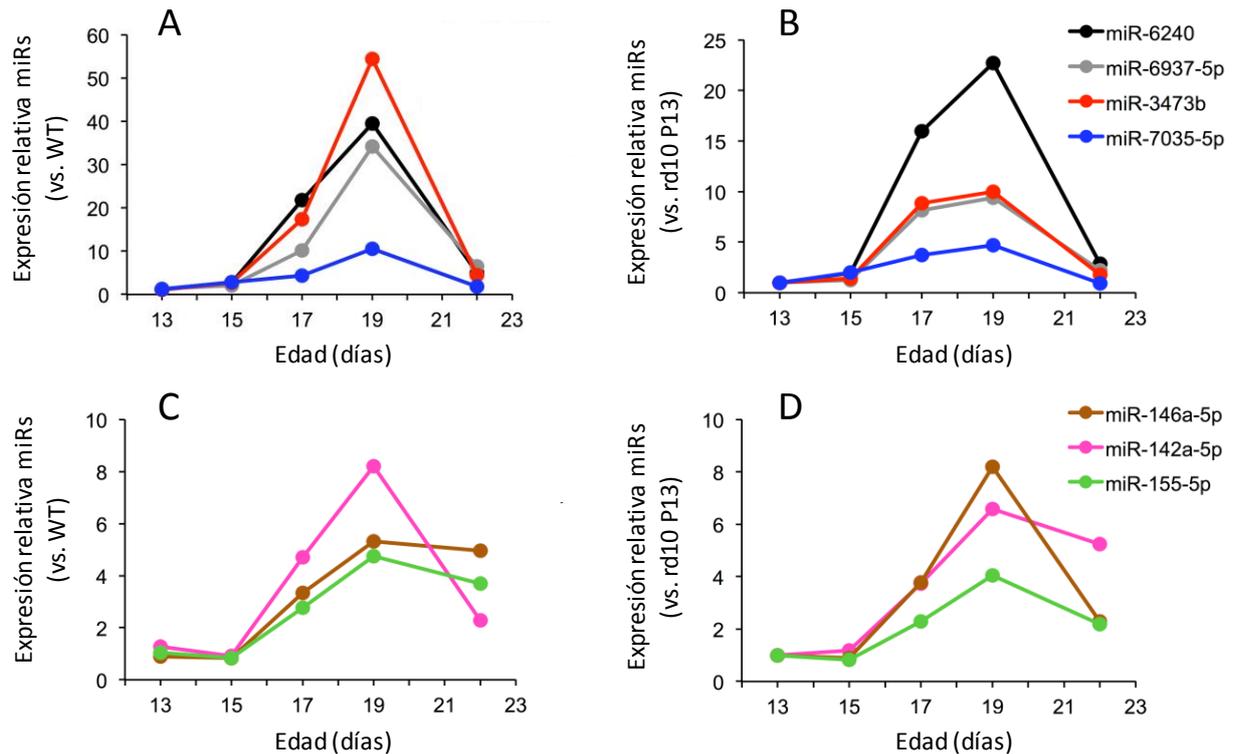
**Figura 34. Expresión relativa de cuatro miRNAs del grupo-B medida por qPCR.** Se muestra la expresión relativa de muestras de ratones rd10 a diferentes puntos temporales, P13, P15 y P17, con respecto a muestras rd10 P13 (gris oscuro) o con muestras WT pareadas en edad (gris claro). Los valores que difieren significativamente se indican con asterisco/s (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ). Los datos se muestran como media  $\pm$  SEM.

### 3.2 La expresión de un grupo de 7 miRNAs se ve aumentada al menos hasta P19

El análisis de los niveles de expresión de un grupo de 7 miRNAs se extendió hasta los días posnatales 19 y 22 por qPCR para evaluar su perfil de expresión en una retina con la degeneración más avanzada. Este grupo de miRNAs fue seleccionado para este estudio por sus elevados niveles de expresión o por su previa vinculación con procesos degenerativos de la retina. La expresión de este grupo de miRNAs se mantuvo aumentado hasta P19, con una caída de los valores de *fold-change* a P22 para la mayoría de los miRNAs analizados con la excepción de dos miRNAs incluidos en el grupo-B (miRs 155-5p y 146a-5p), con niveles de expresión similares a los observados a P19 (ver Tabla 5 y Figura 35).

**Tabla 5. Lista de miRNAs D.E. validados por qPCR.** Todos los valores de *fold-change* se calculan con respecto a las muestras WT del mismo día post-natal, excepto los indicados por asterisco en el que se calculó con respecto a muestras rd10 en el día 13 postnatal. Los miRNAs están agrupados en dos grupos en función de cuando sufren expresión diferencial (A: desregulación antes del comienzo de apoptosis; y B: desregulación posterior a comienzo apoptosis). Nótese que en la lista de miRNAs no validados, los valores entre paréntesis corresponden al F.C. calculado usando los datos de los arrays de miRNA 4.0.

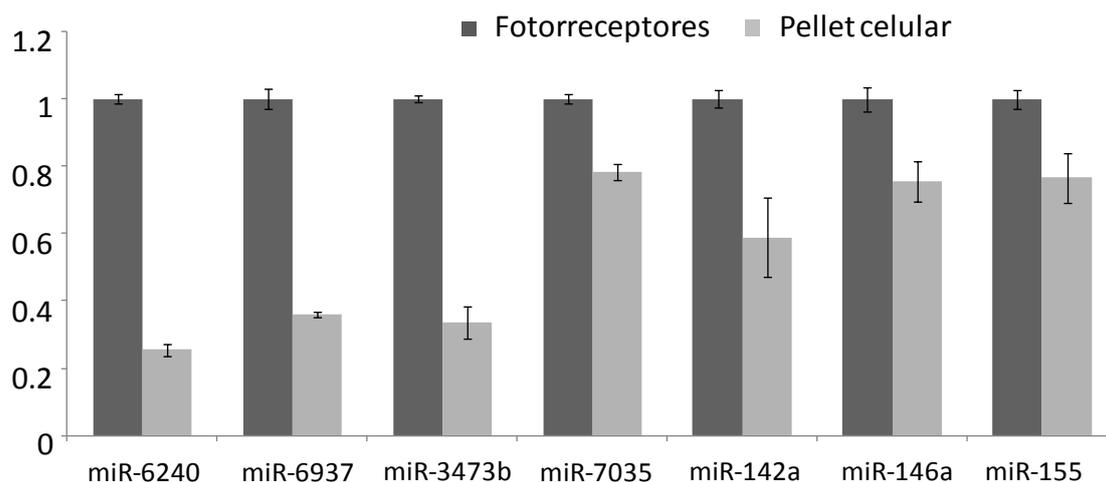
		<b>F.C. (rd10 vs. WT)</b>			
		<b>P15</b>	<b>P17</b>	<b>P19</b>	<b>P22</b>
<b>Grupo-A</b>	<b>miRNA</b>				
	miR-6240	2,72	22,21	39,52	5,03
	miR-6937-5p	2,05	10,22	34,2	6,48
	miR-6970-5p	2,32	21,83	-	-
	miR-7035-5p	2,81	4,37	10,58	1,81
	miR-7115-5p	2,16	5,02	-	-
	miR-7081-5p	1,94	2,88	-	-
	miR-3473b	2,75	17,41	54,44	4,42
miR-20b-5p*	-1,76	-1,58	-	-	
<b>Grupo-B</b>	miR-133a-3p	-1,17	2,22	-	-
	miR-146a-5p	-1,19	3,32	5,31	4,96
	miR-762	1,17	2,41	-	-
	miR-7036b-3p	1,21	2,63	-	-
	miR-29b-3p	-1,79	2,03	-	-
	miR-7221-3p	1,02	4,22	-	-
	miR-142a-5p	-1,09	4,71	12,67	3,1
	miR-17-5p	1,31	2,01	-	-
	miR-155-5p	-1,18	2,76	4,74	3,71
	miR-1a-3p*	-1,36	2,83	-	-
miR-19b-3p	-1,31	-1,73	-	-	
<b>No Validados</b>	miR-7002-5p	1,08 (4,95)	1,12 (33,58)	-	-
	miR-346-3p	1,2 (1,26)	-1,1 (3,95)	-	-
	miR-216a-5p	1,04 (-1,08)	1,08 (-2,17)	-	-
	miR-3074-1-3p	1,32 (-1,15)	-1,05 (-2,77)	-	-
	miR-15b-5p	-1,2 (-1,36)	-1,59 (-2,01)	-	-
	miR-106a-5p	1 (-1,50)	-1,17 (-2,22)	-	-



**Figura 35. Niveles de expresión de miRNAs en retinas de ratón rd10.** La expresión diferencial de 7 miRNAs candidatos en los días post-natales 13, 15, 17, 19 y 22 se miden como *fold-change* comparados con muestras WT de la misma edad (paneles izquierdos) y con rd10 a P13 (paneles de derecha). (A-B) muestran los 4 miRNAs del grupo-A. (C-D) muestran los 3 miRNAs del grupo-B. Ver la sección de materiales y métodos para una descripción de los grupos A y B.

### 3.3 El nivel de expresión de un grupo de 7 miRNAs D.E. es mayor en células fotorreceptoras que en el resto celular de la retina

Por otra parte, se comprobó también mediante qPCR que la expresión de estos 7 miRNAs en ratones rd10 a P17 es mayor, pero no exclusivo, en muestras de fotorreceptores aislados que en el resto celular de las retinas (pellet, ver *Obtención de muestras de fotorreceptores aislados* en Materiales & Métodos) (Figura 36).



**Figura 36. Expresión medida por qPCR de un grupo de miRNAs en fotorreceptores aislados (gris oscuro) comparado con la expresión en el pellet celular (gris claro) de las mismas retinas.**

Como se observa en la Figura 36, la expresión de los miR-6240, miR-6937 y miR-3473b es hasta dos y tres veces mayor en fotorreceptores aislados que en el resto celular de las retinas. En los miRNAs restantes, aunque también se observa mayor expresión en fotorreceptores que en los pellets, esta diferencia en la expresión no es tan acusada, siendo el miR-7035 el que menos diferencias muestra con una expresión similar en ambas fracciones celulares.

### **3.4 Los estudios del transcriptoma completo revelan 2115 mRNAs D.E.**

Los estudios realizados con los arrays GeneChip 1.0 MTA de Affymetrix revelaron un gran número de mRNAs diferencialmente expresados (D.E.) con un *fold-change* mayor a  $\pm 1.5$  y valor  $p < 0,05$ . Se identificaron un total de 2115 mRNAs expresados de forma diferencial en las retinas de ratones rd10 con respecto a las muestras control. Estos genes fueron posteriormente subclasificados siguiendo los mismos criterios utilizados para los miRNAs D.E.

**Tabla 6. Número de mRNAs clasificados en cada uno de los grupos.** Entre paréntesis se indica el grupo al que pertenece el número de mRNAs D.E.

Desregulación	# de mRNAs D.E.	
	P15	P17
Sobre-expresión	197 (A1)	1508 (B1)
Infa-expresión	32 (A2)	378 (B2)

Como se puede observar en la Tabla 6, el número de mRNAs D.E. posterior al comienzo de los procesos apoptóticos, a P17, es mayor que previo a este evento, del orden de hasta 10 veces más. Esto ocurre tanto en la sobre-expresión como en la infra-expresión de los genes.

Los genes más altamente sobre-expresados fueron *Serpina3n*, *Mt2* y *A2m*, expresándose 220, 47 y 24 veces más, respectivamente. Mientras que los genes *Fabp7*, *Lrp4* y *Duxbl3* fueron los mRNAs con mayor infra-expresión detectada (8, 3.8 y 3 veces menos en muestras rd10 a P17 que en las muestras control, respectivamente). Los 2115 mRNAs D.E. fueron sometidos a estudios de ontología genética y de rutas biológicas. En la Tabla 7 se resume información sobre los niveles de expresión de los mRNAs con un mayor grado de expresión diferencial y sus rutas biológicas asociadas.

**Tabla 7. Resumen de los principales hallazgos de los niveles de expresión de los mRNAs y de sus rutas biológicas asociadas.** Todos los valores de *fold-change* se calculan con respecto a la media de los valores de las muestras WT y rd10 a P13 obtenidos en los arrays MTA.

mRNA	F.C		Pathway
	P15	P17	
<i>Serpina3n</i>	1,82	220,37	Inflammatory response / Response to elevated platelet cytosolic Ca <sup>2+</sup>
<i>Mt2</i>	3,22	47,61	Negative regulation of growth
<i>A2m</i>	1,34	24,55	Negative regulation of complement activation
<i>Lcn2</i>	1,16	24,44	Immune system process / apoptotic process
<i>Gbp2</i>	1,29	24,35	Cellular response to interferon-beta
<i>Serping1</i>	1,12	23,58	Immune system process
<i>Gfap</i>	1,47	23,30	Negative regulation of neuron projection development / astrocyte development / extracellular matrix organization
<i>Gbp10</i>	1,25	21,69	GTP catabolic process / immune response
<i>Ifitm3</i>	1,31	19,87	immune system process / negative regulation of cell proliferation
<i>Lrrc2</i>	1,93	14,27	Tumor suppressor
<i>Ifit1</i>	0,98	13,62	innate immune response
<i>Steap4</i>	1,09	13,09	Ion transport / oxidation-reduction process / fat cell differentiation
<i>C3</i>	1,06	12,99	Immune system process / inflammatory response / complement activation
<i>Osmr</i>	1,81	12,85	Response to cytokine
<i>Cebpd</i>	1,32	12,31	Regulation of transcription, DNA-templated / regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
<i>Tgfbi</i>	0,93	11,83	Cell adhesion / extracellular matrix organization / angiogenesis
<i>B2m</i>	1,19	11,53	Positive regulation of T cell mediated cytotoxicity / immune system process
<i>Lgals3bp</i>	1,13	11,51	Receptor-mediated endocytosis / cell adhesion
<i>Lyz2</i>	0,82	11,40	Cytolysis / metabolic process
<i>Fgf2</i>	1,40	11,32	Regulation of retinal cell programmed cell death
<i>I830012O16Rik</i>	1,08	11,04	Negative regulation of apoptotic process / innate immune response
<i>Clec7a</i>	0,93	10,37	immune response / cell surface pattern recognition receptor signaling pathway / phagocytosis, recognition
<i>Oasl2</i>	1,10	10,26	immune system process

Resultados

---

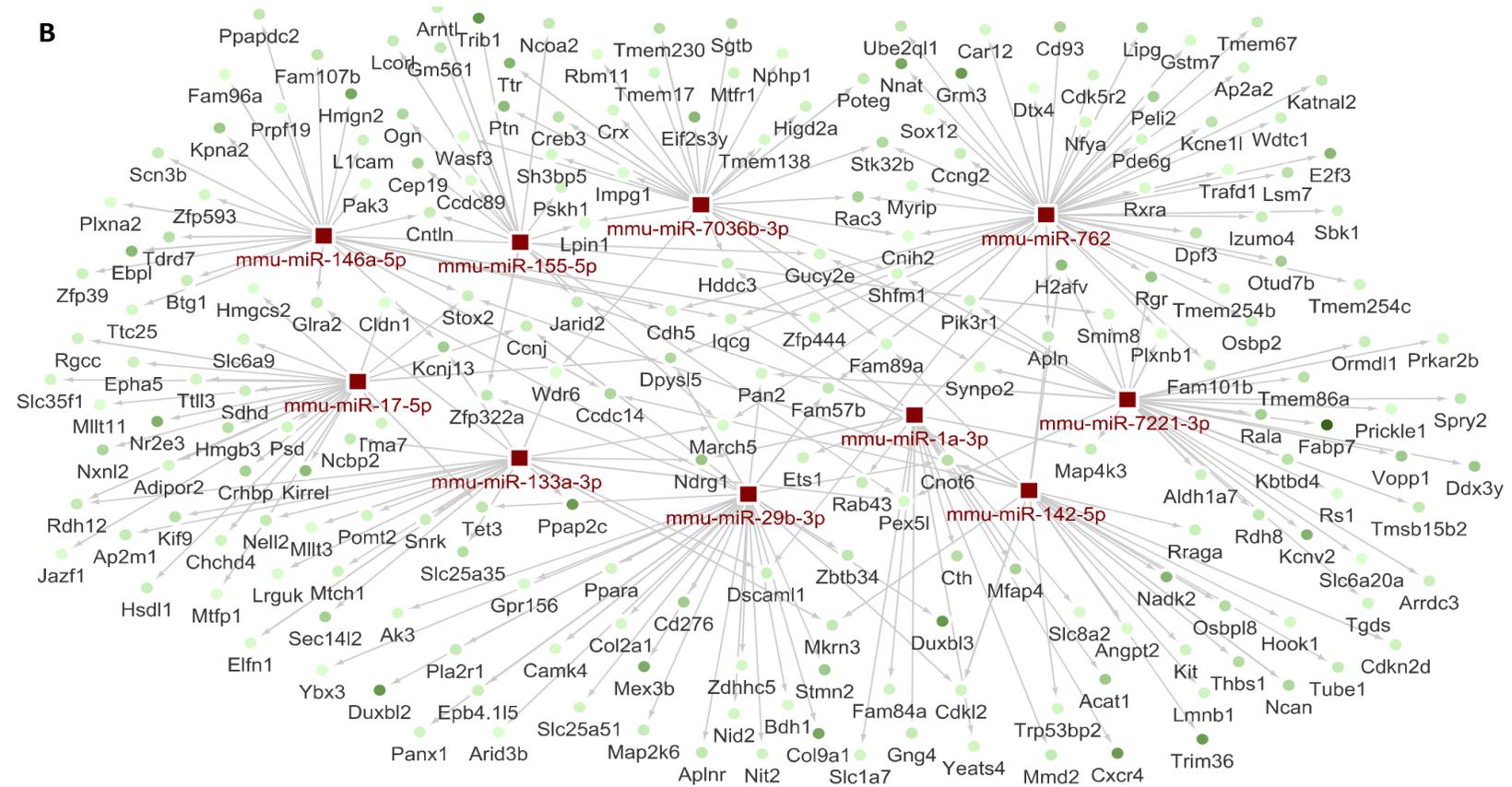
<i>Rsad2</i>	1,09	10,23	immune system process / positive regulation of toll-like receptor 7 signaling pathway
<i>Gm3893</i>	-1,98	-2,98	Immune response / cell chemotaxis
<i>Ppap2c</i>	-1,07	-3,09	Dephosphorylation / metabolic process
<i>Gm16494</i>	-1,42	-3,17	Nucleosomal DNA binding
<i>Prdm1</i>	-1,70	-3,28	Eye photoreceptor cell development / Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
<i>Duxbl2</i>	-1,29	-3,23	Regulation of transcription, DNA-templated / regulation of T cell differentiation
<i>Duxbl3</i>	-1,30	-3,23	Regulation of transcription, DNA-templated / regulation of T cell differentiation
<i>Lrp4</i>	-2,52	-3,86	Cell differentiation / negative regulation of Wnt signaling
<i>Fabp7</i>	-2,37	-8,06	Cell proliferation in forebrain / neurogenesis / associated with optic nerve glioma

### **3.5 Las redes de interacción miRNA-mRNA revelan un gran número de relaciones inversas en expresión entre los miRNA D.E. y sus mRNA diana.**

Se realizó un estudio *in silico* de predicción de los mRNA diana de los miRNAs candidatos D.E utilizando algoritmos de cuatro bases de datos diferentes, incluyendo miRWalk 2.0, TargetScan, Miranda y RNA22. Sólo los genes predichos por al menos dos algoritmos se consideraron para el análisis posterior. Identificamos un promedio de 900 genes diana para cada miRNA. La información de estos análisis para la identificación de genes diana se combinaron con los datos de los arrays de expresión de miRNAs para construir redes de regulación/interacción miRNA-mRNA utilizando para ello el software Cytoscape de acceso libre.

Posteriormente, filtramos estas redes incorporando los datos de nuestros arrays GeneChip 1.0 MTA (Affymetrix) con el fin de identificar las relaciones de expresión inversa entre miRNAs y mRNAs (Figura 37). Como resultado, pudimos detectar un total de 554 interacciones o genes expresados inversamente con sus miRNA reguladores, 212 interacciones en el grupo-A y 342 en el grupo-B. En la Figura 37 se pueden observar las redes de interacción miRNA-mRNA de los dos grupos diferentes de miRNAs, grupo-A y grupo-B. En rojo se observan los miRNAs diferencialmente expresados y en verde sus genes diana con expresión inversa. Las flechas indican interacciones directas entre un miRNA y sus genes diana. Como se puede observar en la figura, cada miRNA tiene interacciones con más de un mRNA, y a su vez, cada mRNA puede interactuar con más de un miRNA en paralelo. Nótese que el gradiente de color verde en los nodos de mRNA representa la variación en *fold-change*, comenzando desde 1.3 veces (verde claro) hasta 4,33 veces en el grupo-A y hasta 7,65 veces en el grupo-B (verde oscuro), es decir a mayor desregulación del mRNAs se ha asignado mayor intensidad de color verde.





**Figura 37. Redes de interacción miRNA-mRNA.** miRNAs diferencialmente expresados (cuadrados rojos) y sus genes diana con relación de expresión inversa (círculos verdes). (A) Red de interacción miRNA-mRNA de los miRNAs diferencialmente expresado antes del inicio de la apoptosis (grupo-A) y (B) justo después del inicio apoptótico (grupo-B). Las flechas indican interacciones directas entre un miRNA y sus genes diana. El gradiente de color verde en los nodos de mRNA representa una variación en F.C., comenzando desde 1.3 veces (verde claro) hasta 4,33 veces en el grupo-A y hasta 7,65 veces en el grupo-B (verde oscuro).

### **3.6 Los estudios de ontología de genes y el análisis de rutas biológicas revelan genes inversamente expresados con los miRNA D.E. que podrían estar implicados en los procesos degenerativos de la retina o en mecanismos de compensación a este evento.**

Posteriormente, los genes inversamente expresados fueron sometidos a estudios de ontología genética (GO) y análisis de vías o rutas biológicas para comprender mejor los mecanismos por los cuales los miRNA candidatos podrían afectar al fenotipo de los ratones rd10. Para eso, utilizamos los servidores web DAVID y WikiPathways, y la aplicación ClueGO (versión 2.2.3) de Cytoscape.

Estos estudios revelaron que un gran número de genes diana expresados inversamente codifican para proteínas que juegan un papel esencial en la supervivencia y en los procesos fisiológicos normales de la retina. También se detectaron genes que codifican para proteínas probablemente relacionadas con procesos patogénicos de la degeneración retiniana y/o en mecanismos compensatorios destinados a paliar los daños en la retina.

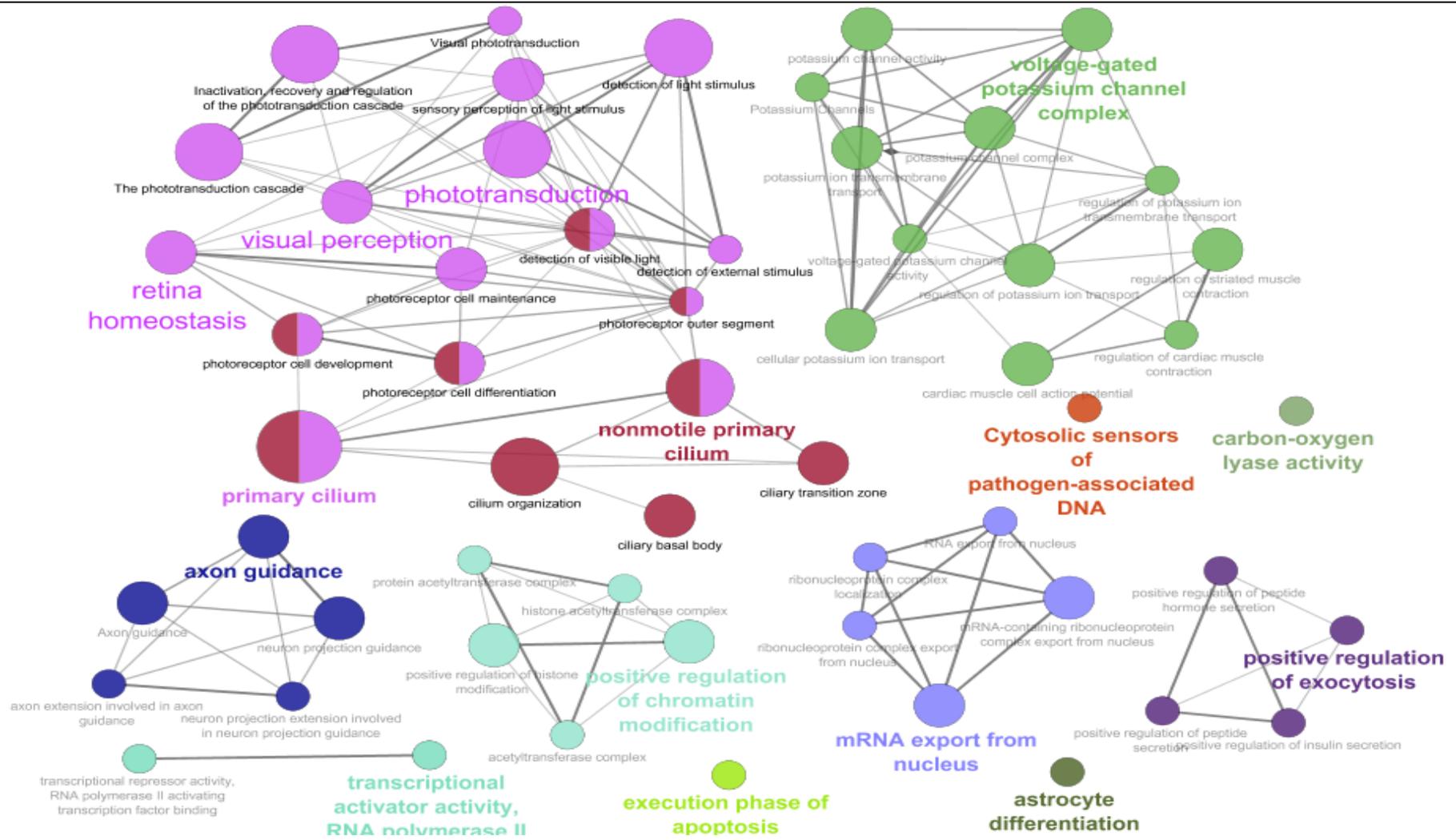
Se identificaron un total de 123 términos GO, 56 términos en los mRNAs diana del grupo-A (Figura 38) y 67 en los del grupo-B. En el caso de los mRNA inversamente expresados con los miRNAs del grupo-A (miRNAs D.E. previo al comienzo de la apoptosis), los estudios GO y los análisis de rutas biológicas revelaron que en un porcentaje alto las vías biológicas afectadas por la interacción miRNA-mRNA del grupo-A están relacionados con procesos fisiológicos normales de la retina, por ejemplo, la cascada de fototransducción, la homeostasis de la retina, el desarrollo celular de los fotorreceptores, la inactivación, recuperación y regulación de la cascada de fototransducción y el transporte intraciliar, entre otros (Figura 38 y Tabla 8). Además, también se detectaron genes previamente relacionados con enfermedades de la retina como *Klhl23* o *Nr2e3*, involucrados en distrofias cono-bastón o retinosis pigmentaria, respectivamente. También, entre las vías afectadas por los mRNA inversamente relacionados con los miRNAs del grupo-A se encuentran vías no fisiológicas de la retina como la vía extrínseca de la apoptosis o las respuestas inflamatorias, entre otras.

En cuanto a las vías biológicas afectadas por los mRNA inversamente relacionados con los miRNAs del grupo-B (diferencialmente expresado justo después del inicio apoptótico) son muchas y muy diversas las vías identificadas, algunas de las cuales

posiblemente estén jugando un papel en la degeneración retiniana como por ejemplo la secreción y producción de citoquinas o la regulación de la migración linfocítica, pero también vías que en principio no tendrían relación con la patología de los ratones rd10, como el desarrollo de la aorta o el metabolismo del alcohol.

A continuación, basándonos en los datos obtenidos en los estudios GO y de las vías biológicas y teniendo en consideración también los datos de *fold-change* obtenidos de los arrays MTA, confeccionamos una lista de mRNAs para someterlos a validación por una segunda técnica, por qPCR. A la hora de seleccionar los mRNA, prestamos especial atención a aquellas vías con mayor potencial para jugar un papel clave en la fisiopatología de los ratones rd10, como por ejemplo aquellas implicadas en la apoptosis, respuesta inflamatoria, activación de citoquinas y quimiocinas, señalización del calcio, percepción visual y fototransducción visual entre otras. Además, también se seleccionaron genes con altos valores de *fold-change*, a pesar de no tener una implicación obvia en la degeneración de la retina. En total, se seleccionaron 49 genes para análisis posterior, 45 infra-expresados y 4 sobre-expresados (Anexo 2).

Los niveles de expresión de estos 49 genes fueron testados por qPCR y se confirmó que 41 (83%) mostraban diferencias de expresión entre las muestras de ratones rd10 y WT; 38 (84%) con regulación negativa y 3 (75%) con regulación positiva. La Tabla 8 resume información sobre los niveles de expresión de los mRNAs diana validados de los miRNA candidatos y de sus rutas biológicas asociadas que podrían estar implicadas en la degeneración de la retina. La Figura 39 y la Figura 40 ilustran gráficamente algunos ejemplos de los resultados obtenidos en la validación por qPCR de los mRNAs candidatos.



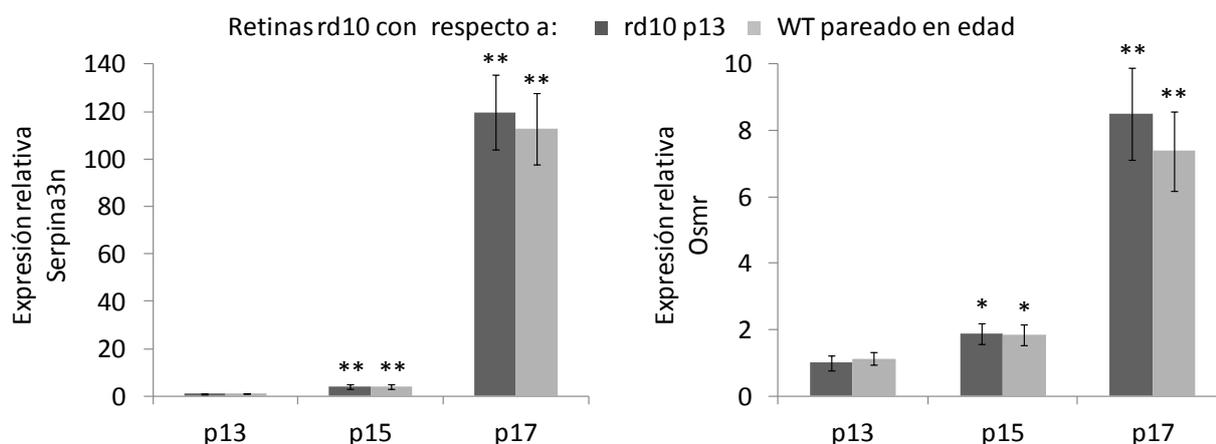
**Figura 38.** Estudios con ClueGO de rutas biológicas y términos GO correspondientes a los mRNAs con expresión inversa del grupo-A. Los nodos en la red representan un término GO específico. Los datos se integran a partir de las bases de datos KEGG, Wikipathways y DAVID. Cada grupo del mismo color de nodo corresponden a los clústeres de términos GO determinados por ClueGO.

**Tabla 8. Resumen de los niveles de expresión de los miRNA candidatos, sus mRNAs diana y las rutas biológicas asociadas a éstos que podrían estar implicadas en la degeneración retiniana.** Los Valores de F.C. son calculados respecto a muestras WT pareadas en edad excepto las señaladas con (\*) calculadas con respecto a rd10 P13. En esta tabla solamente se muestran mRNAs validados, es decir, con F.C.>|1.3| en al menos uno de los puntos temporales.

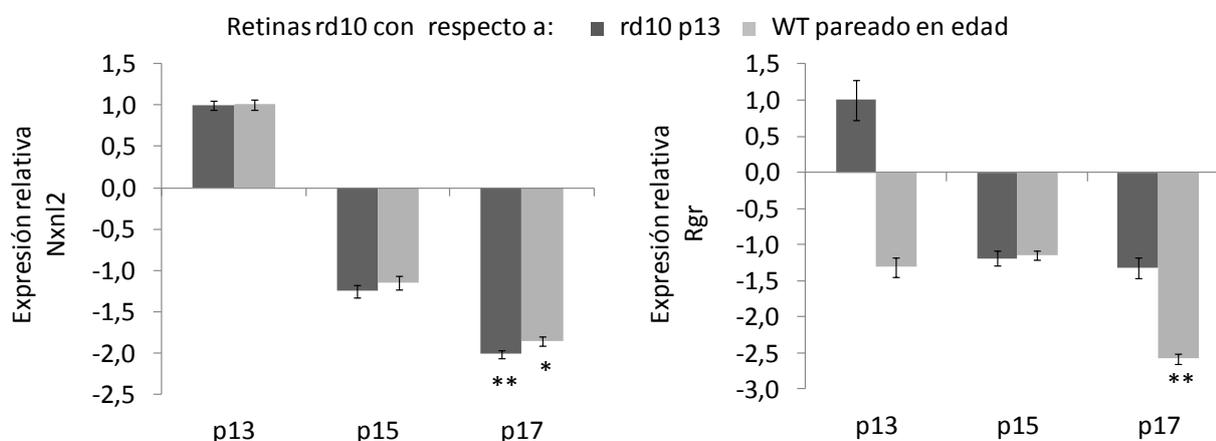
	miRNA		mRNA- diana	F.C.		Pathway
	ID	Regulación		P15	P17	
Group A	miR-6240	↑	<i>Klhl23</i>	-1,09	-1,85	Cone-rod dystrophy/Vitamin B6 metabolism
			<i>Nr2e3</i>	-1,01	-2,05	Retinitis pigmentosa/regulation of transcription
			<i>Nxnl2</i>	-1,15	-1,72	Visual perception
			<i>Rsl</i>	-1,29	-2,19	Retina layer formation/adaptation of rhodopsin mediated signaling/Retinoschisis
	miR-6937-5p	↑	<i>Doc2b</i>	-1,09	-2,11	Positive regulation of calcium ion-dependent endocytosis of neurotransmitter
			<i>Lca5</i>	-1,43	-1,59	Leber Congenital Amaurosis/Intraciliary transport/photoreceptor maintenance
			<i>Peli3</i>	1,01	-1,46	Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway
	miR-6970-5p	↑	<i>Eif2s3y</i>	1,29	-1,89	GTP catabolic process
	miR-7035-5p	↑	<i>Cngb1</i>	-1,05	-1,52	Phototransduction
			<i>Sema7a</i>	1,03	-1,57	Inflammatory response
			<i>Voppl</i>	-1,04	-1,81	Signal transduction/Transcription, DNA-templated
			<i>Nnat</i>	-1,08	-1,36	Neuron differentiation/maintenance of structure of nervous system
			<i>Pde6g</i>	-2,02	-3,86	Retinitis pigmentosa/Visual perception
	miR-7115-5p	↑	<i>Peli3</i>	1,01	-1,46	Negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway
			<i>Nnat</i>	-1,08	-1,36	Neuron differentiation/maintenance of structure of nervous system
	miR-7081-5p	↑	<i>Prdm1</i>	1,21	-1,49	Eye photoreceptor cell development / Negative regulation of transcription
			<i>Nr2e3</i>	-1,01	-2,05	Retinitis pigmentosa/regulation of transcription
			<i>Psd2</i>	1,25	-1,33	Positive regulation of GTPase activity/Neuron differentiation
	miR-3473b	↑	<i>Cryaa</i>	1,01	-1,61	Negative regulation of apoptotic process/Eye development/Visual perception
<i>Pde6g</i>			-2,02	-3,86	Retinitis pigmentosa/Visual perception	
<i>Rgr</i>			-1,19	-2,56	Visual perception/phototransduction	
<i>Traf7d1</i>			-1,25	-1,72	Negative regulation of innate immune response	
miR-20b-5p*	↓	<i>Serpina3n</i>	3,98	112,8	Inflammatory response / Response to elevated platelet cytosolic Ca <sup>2+</sup>	
		<i>Xaf1</i>	1,38	6,91	Apoptotic process	
		<i>Osmr</i>	1,82	7,43	Response to cytokine	

## Resultados

<b>Group B</b>	miR-29b-3p	↑	<i>Duxbl2</i>	1,17	-1,74	Regulation of T-cell differentiation
			<i>Pan2</i>	1,38	-1,31	Inflammatory response
			<i>Pla2r1</i>	1,28	-1,67	Inflammatory response
	miR-133a-3p	↑	<i>Rdh12</i>	1,02	-1,59	Visual perception
	miR-146a-5p	↑	<i>Tdrd7</i>	1,23	-1,83	Associated with Cataract
	miR-762	↑	<i>Rgr</i>	-1,19	-2,56	Visual perception/phototransduction
			<i>Pde6g</i>	-2,02	-3,86	Retinitis pigmentosa/Visual perception
			<i>Traf7d1</i>	-1,25	-1,72	Negative regulation of innate immune response
			<i>Nnat</i>	-1,08	-1,36	Neuron differentiation/maintenance of structure of nervous system
			<i>E2f3</i>	1,24	-1,63	Regulation of transcription, DNA-templated
	miR-7036b-3p	↑	<i>Otud7b</i>	1,01	-1,58	Immune system process
			<i>Eif2s3y</i>	1,29	-1,89	GTP catabolic process
			<i>Crx</i>	1,14	-1,50	Visual perception/retina development in camera-type eye
			<i>Ptn</i>	1,24	-1,50	Negative regulation of neuron apoptosis
	miR-7221-3p	↑	<i>Ttr</i>	1,31	-1,94	Retinol metabolic process
<i>Rdh8</i>			1,07	-1,37	Visual perception/retinol metabolic process/AMD	
<i>Pan2</i>			1,38	-1,31	Inflammatory response	
<i>Rgr</i>			-1,19	-2,56	Visual perception/phototransduction	
<i>Rsl</i>			-1,29	-2,19	Retina layer formation/adaptation of rhodopsin mediated signaling/Retinoschisis	
<i>Lca5</i>			-1,43	-1,59	Intraciliary transport/photoreceptor maintenance	
miR-142a-5p	↑	<i>Vopp1</i>	-1,04	-1,81	Signal transduction/Transcription, DNA-templated	
		<i>Fabp7</i>	1,46	-1,93	Cell proliferation in forebrain / neurogenesis / associated with optic nerve glioma	
		<i>Trp53bp2</i>	1,27	-1,59	Apoptotic process	
		<i>Trim36</i>	-1,26	-1,96	Immune System/ Ubiquitination of antigen and Proteasome degradation	
miR-17-5p	↑	<i>Thbs1</i>	1,21	-1,57	Inflammatory response/positive regulation of macrophage chemotaxis	
		<i>Rraga</i>	-1,07	-1,49	Apoptotic process/cell death	
		<i>Dpysl5</i>	1,29	-1,35	Nervous system development	
miR-155-5p	↑	<i>Mtfp1</i>	1,18	-1,43	Positive regulation of apoptotic process	
		<i>Mllt11</i>	1,43	-1,33	Positive regulation of apoptotic process	
		<i>Arhgap18</i>	-1,25	-1,32	Signal transduction/positive regulation of GTPase activity	
		<i>Zfp322a</i>	-1,16	-1,61	Regulation of transcription, DNA-templated	



**Figura 39. Expresión relativa medida por qPCR de dos genes sobre-expresados, *Serpina3n* y *Osmr* inversamente expresados con el miR-20b-5p.** Se muestra la expresión relativa de muestras de ratones rd10 a diferentes puntos temporales, P13, P15 y P17, con respecto a muestras rd10 P13 (gris oscuro) o con muestras WT pareadas por edad (gris claro). Los valores que difieren significativamente se indican con asterisco/s (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ , Student's t-test y Mann-Whitney). Los datos se muestran como media  $\pm$  S.E.M.



**Figura 40. Expresión relativa de dos genes infra-expresados, *Nxn12* y *Rgr*, medida por qPCR.** Se muestra la expresión relativa de muestras de ratones rd10 a diferentes puntos temporales, P13, P15 y P17, con respecto a muestras rd10 P13 (gris oscuro) o con muestras WT pareadas por edad (gris claro). Los valores que difieren significativamente se indican con asterisco/s (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ , Student's t-test y Mann-Whitney). Los datos se muestran como media  $\pm$  S.E.M.

Es interesante el hecho de que algunos de estos genes tienen interacciones predichas con más de uno de los miRNAs candidatos. Por ejemplo el gen *Pde6g* que codifica la

subunidad gamma de la fosfodiesterasa 6 específica de los bastones, componente clave de la cascada de fototransducción, es un gen diana para el miR-3473b, el miR-7035-5p y el miR-762. Otro ejemplo es el gen *Peli3*, regulador negativo de la apoptosis, que es un gen diana para el miR-6937-5p y para el miR-7115-5p.

#### **4. Modulación *in vivo* de miRNAs en ratones rd10 y evaluación funcional de dicha modulación.**

Realizamos un estudio con 45 ratones que fueron tratados con moduladores de los microRNAs 142a-5p, 6937-5p y 6240 aplicados vía inyecciones sub-retinianas (SR) mediante el uso de vectores AAV. En concreto se utilizaron los siguientes vectores: ssAAV-KAnc80-anti-miR-6937-5p, ssAAV-KAnc80-anti-miR-6240, ssAAV-KAnc80-*scramble*-inhibidor, ssAAV-KAnc80-precursor-miR-142a-5p y ssAAV-KAnc80-*scramble*-precursor.

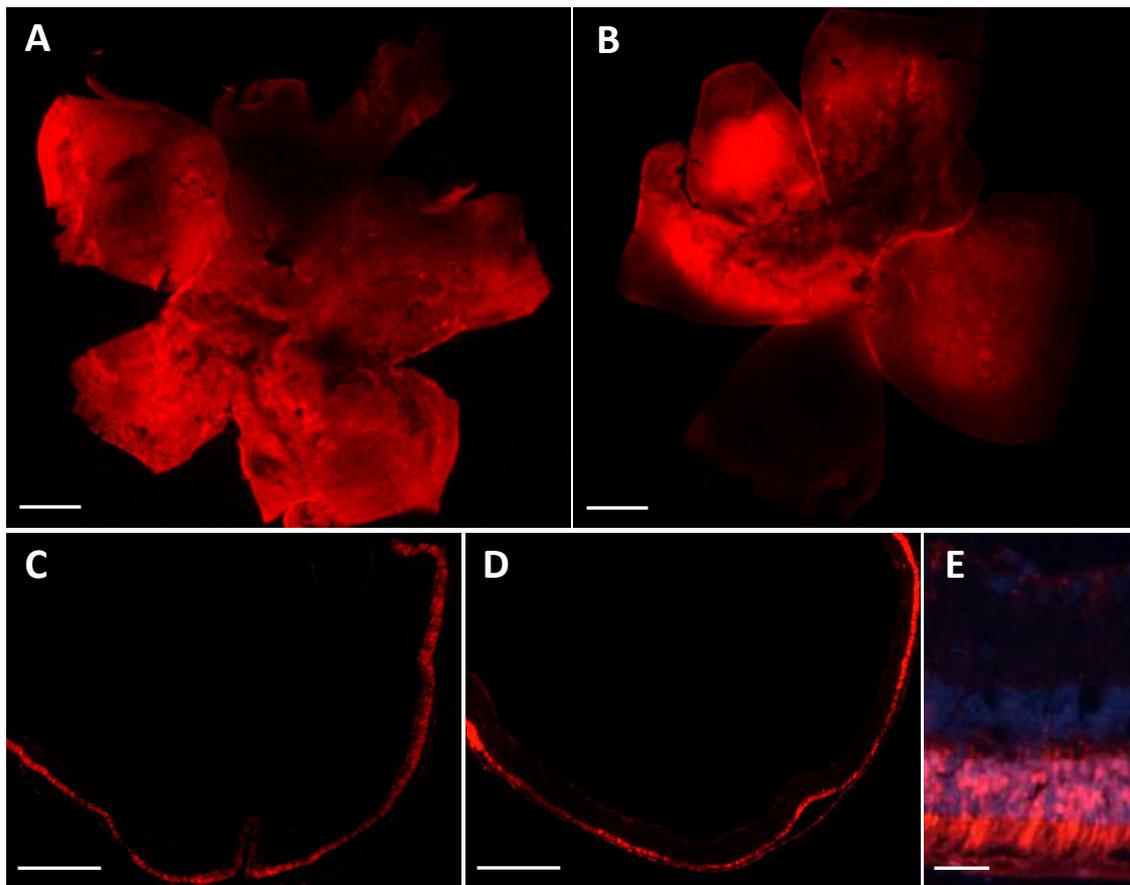
Los AAVs se generaron mediante la metodología anteriormente explicada (ver Materiales y Métodos apartado 12) en colaboración con la Dra. Gloria González Aseguinolaza del CIMA (Pamplona, España). Los títulos obtenidos de los diferentes ssAAV-KAnc80 generados fueron (medidos por qPCR):

	<u>Promedio</u>
<u>ssAAV-Anc-CmiR0001 (<i>scramble</i> precursor)</u>	2,35E+12 pv/ml
<u>ssAAV-Anc-MmiR3437 (precursor miR-142a-5p)</u>	6,96E+11 pv/ml
<u>ssAAV-Anc-CmiRAN0001 (<i>scramble</i> inhibidor)</u>	9,41E+11 pv/ml
<u>ssAAV-Anc-MmiRAN2804 (inhibidor miR-6240)</u>	7,90E+11 pv/ml
<u>ssAAV-Anc-MmiRAN3970 (inhibidor miR-6937-5p)</u>	1,11E+12 pv/ml

#### **4.1 Testado de la capacidad de infección de los ssAAV-KAnc80-moduladores miRNAs *in vivo* en ratones WT**

Previamente a realizar modulación de miRNAs en los ratones rd10 hicimos pruebas *in vivo* en ratones WT para verificar la capacidad de los AAVs generados para infectar las

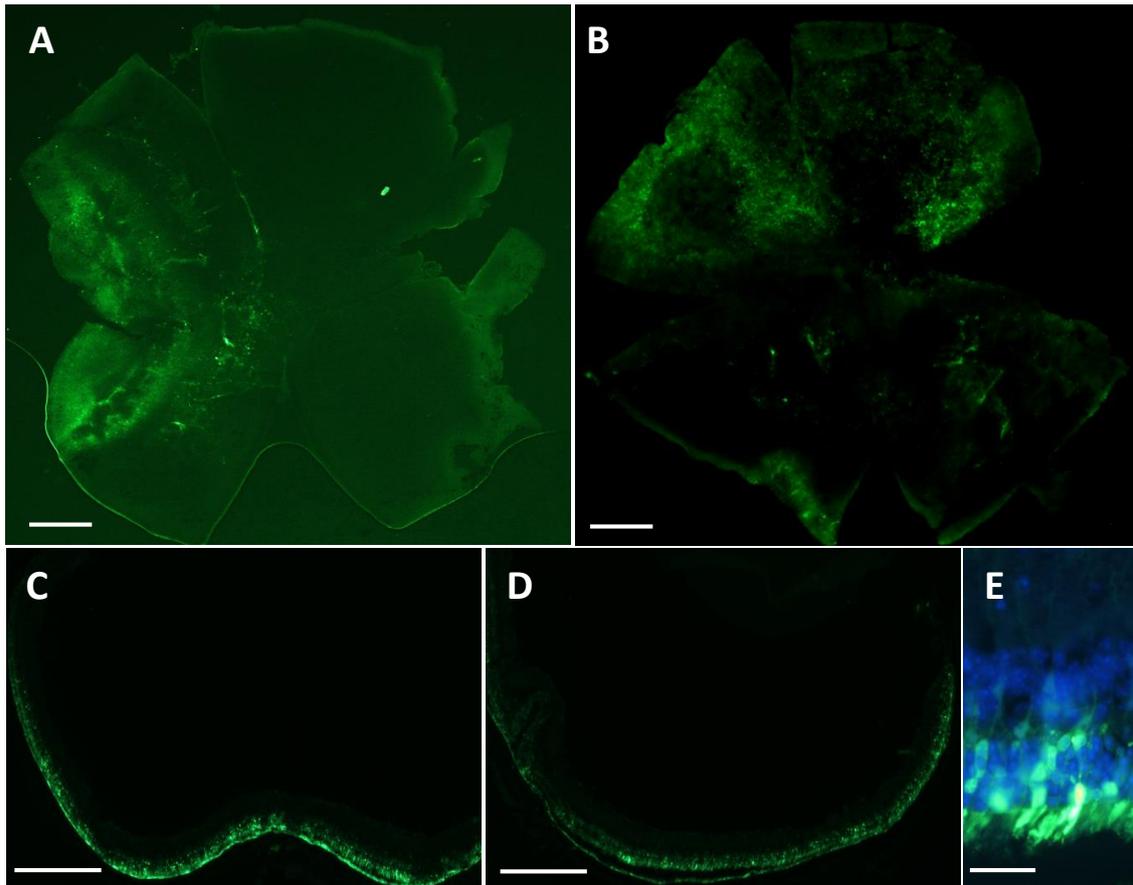
células fotorreceptoras de la retina. Para ello, realizamos inyecciones sub-retinianas (SR) en 10 ratones WT, 2 ratones (4 ojos) por cada uno de los 5 ssAAV-KAnc80 generados. Comprobamos que todos los tipos diferentes de AAVs, tanto los AAVs inhibidores como precursores de miRNAs, tienen capacidad de infectar de forma selectiva las células fotorreceptoras como se puede observar en las Figura 41 y Figura 42. Se observó que aquellas células mCherry y eGFP positivas estaban en la ONL, mientras que en las capas internas de la retina no se observan células fluorescentes.



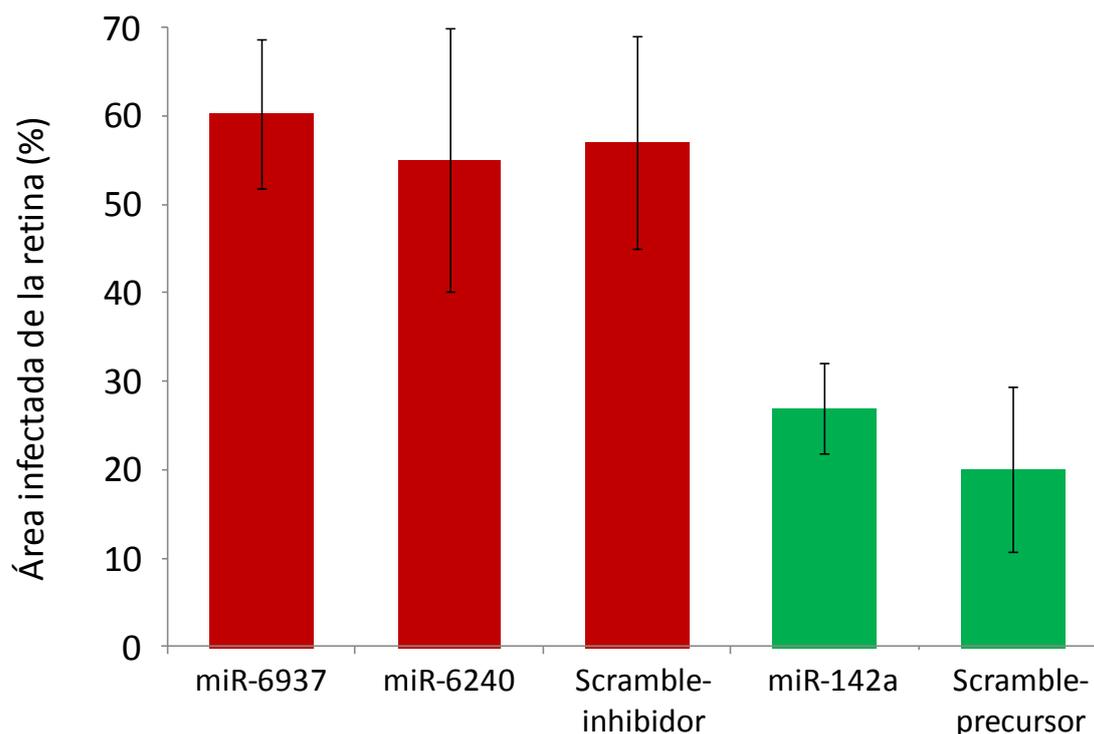
**Figura 41. Expresión de mCherry (rojo) mediada por inyecciones sub-retinianas con solución ssAAV-KAnc80.** A) y C) *Whole-mount* y corte histológico de retinas tratadas con ssAAV-KAnc80-anti-miR-6937-5p, respectivamente. B) y D) *Whole-mount* y corte histológico de retinas tratadas con ssAAV-KAnc80-*scramble*-inhibidor, respectivamente. E) corte histológico de retina tratada con ssAAV-KAnc80-anti-miR-6937-5p con los núcleos celulares marcados en azul (DAPI). Se observa la expresión de mCherry específica en células fotorreceptoras. Barras de escala: A-D 400 $\mu$ m, E 50 $\mu$ m.

Detectamos diferencias en la capacidad de infección de los diferentes tipos de AAVs. Los virus con secuencias inhibidores de la expresión de los miRNAs tienen mayor

capacidad de infección que los AAVs con secuencias precursoras de miRNAs. Como podemos observar en la Figura 43 los ssAAV-KAnc80-anti-miR-6937-5p, ssAAV-KAnc80-anti-miR-6240 y ssAAV-KAnc80-*scramble*-inhibidor consiguen infectar un área de la retina mayor que los ssAAV-KAnc80-precursor-miR-142a-5p y ssAAV-KAnc80-*scramble*-precursor. Mientras que los AAVs inhibidores de miRNA logran infectar de media aproximadamente el 50-60% de la retina, los AAVs precursores de miRNA solamente logran infectar el 20-30% de la retina.



**Figura 42. Expresión de eGFP (verde) mediada por inyecciones sub-retinianas con solución ssAAV-KAnc80.** *Whole-mounts* A) y C) *Whole-mount* y corte histológico de retinas tratadas con ssAAV-KAnc80-pre-miR-142a-5p, respectivamente. B) y D) *Whole-mount* y corte histológico de retinas tratadas con ssAAV-KAnc80-*scramble*-precursor, respectivamente. E) corte histológico de retina tratada con ssAAV-KAnc80- pre-miR-142a-5p con los núcleos celulares marcados en azul (DAPI). Se observa la expresión de eGFP específica en células fotorreceptoras. Barras de escala: A-D 400µm, E 25µm.



**Figura 43. Área de la retina infectada con inyecciones SR de AAVs.** Los ojos tratados con AAVs inhibidores de la expresión de miRNAs (barras rojas, expresan mCherry) logran infectar entre el 50 y el 60% de la retina, mientras que los AAVs precursores de miRNAs (barras verdes, expresan eGFP) logran infectar entre el 20 y el 30% de la retina.

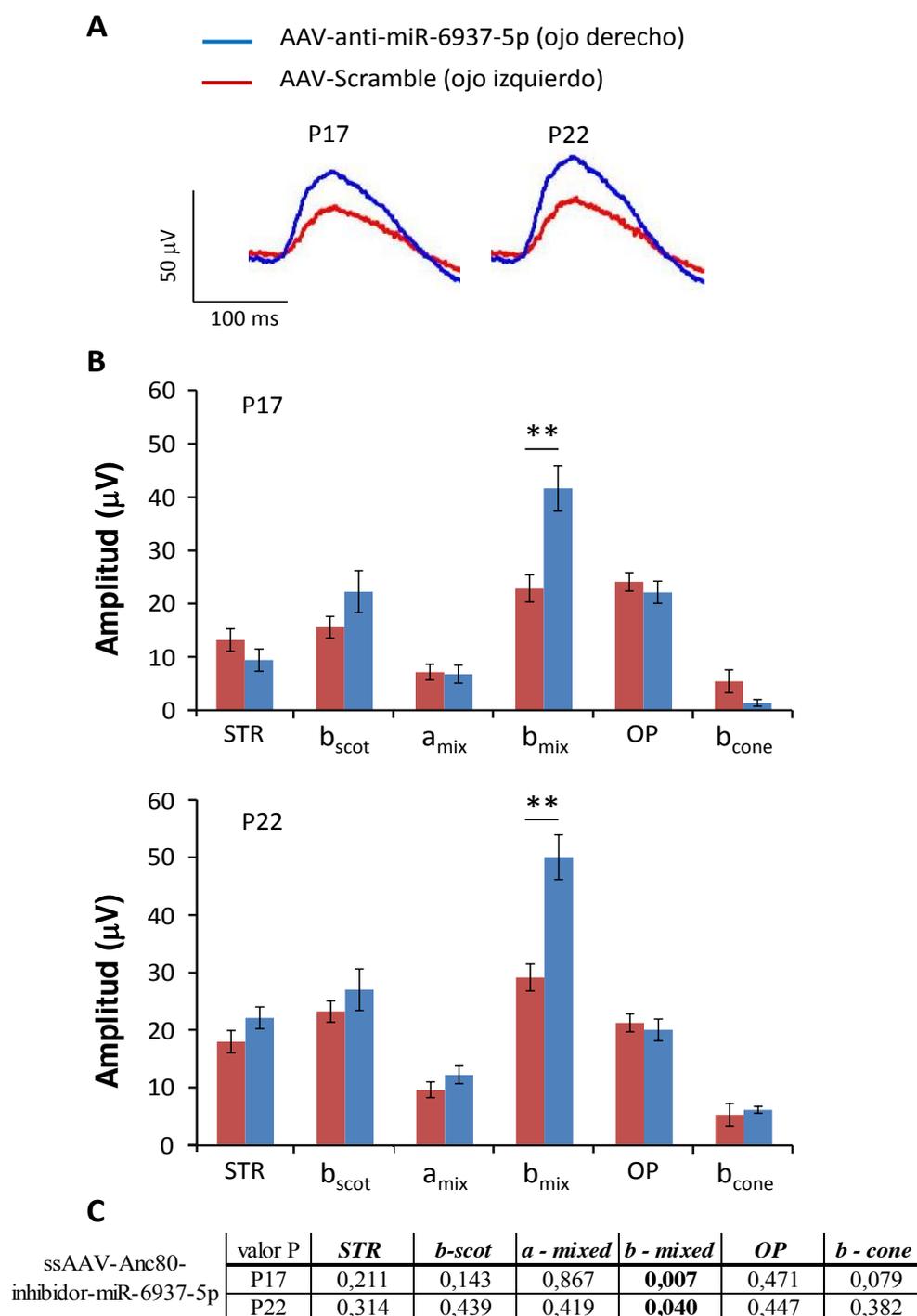
#### **4.2 El tratamiento con solución inhibidor miR-6937-5p ralentiza significativamente el deterioro visual de los ratones rd10.**

La electroretinografía es la técnica de referencia para medir la respuesta eléctrica de las células en la retina ante una estimulación luminosa y nos permite determinar el estado funcional de la retina. Las respuestas de los registros electroretinográficos corresponden principalmente a la actividad de las células ganglionares, las células amacrinas, las células bipolares de cono y bastón y de las células fotorreceptoras. La respuesta mixta puede separarse en la onda a (respuesta descendente inicial) que corresponde a la actividad de los conos y bastones, seguida de la respuesta ascendente de las células retinales internas (onda b). La onda b puede filtrarse para obtener los potenciales oscilatorios (OPs) que reflejan la actividad de las células ganglionares y las células amacrinas.

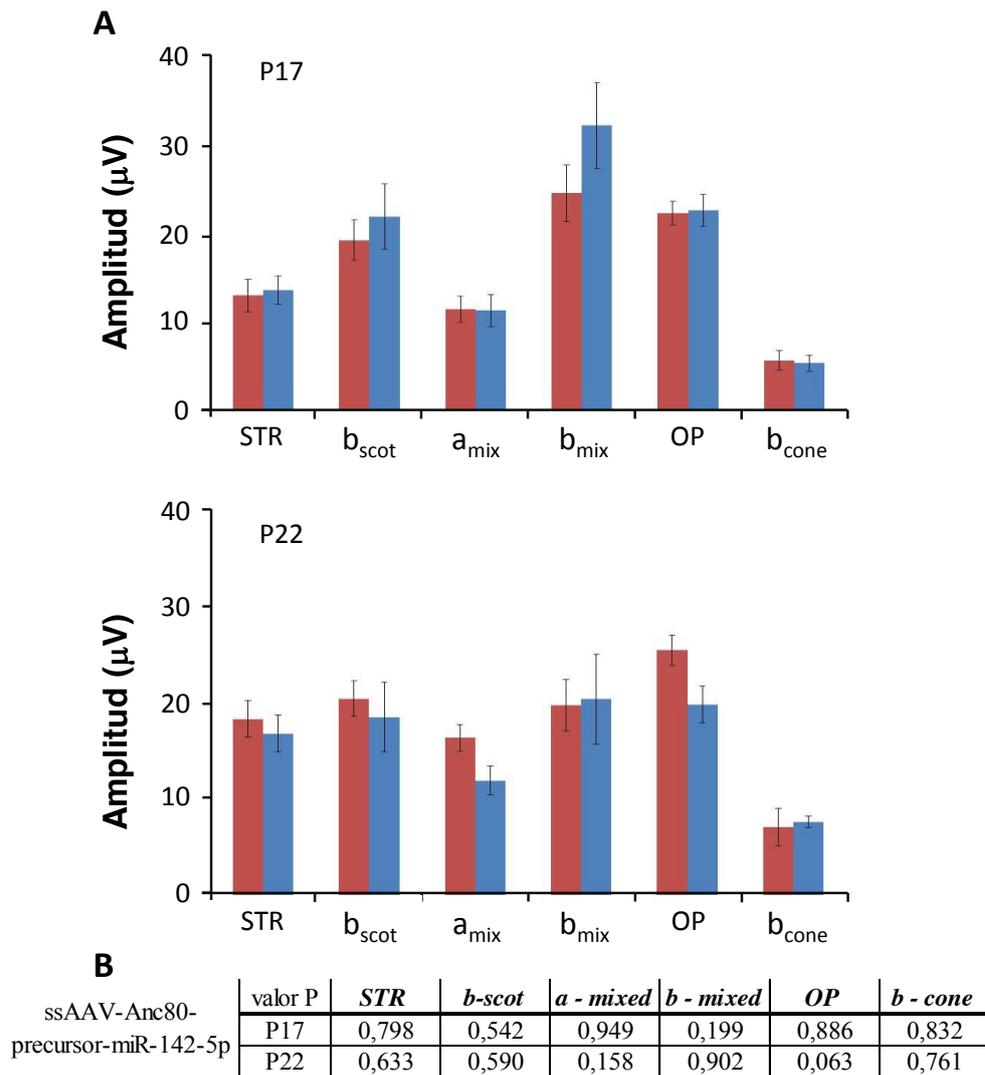
Para determinar el efecto de la modulación de la expresión de los miR-6240, miR-6937-5p y miR-142a-5p en la respuesta visual, realizamos registros ERG. Obtuvimos respuestas ERG de ratones rd10 tratados con AAVs-moduladores de miRNAs (ojo derecho) y AAVs-*scrambles* (ojo izquierdo) utilizados como controles negativos. Por cada tratamiento se analizaron al menos 15 ojos diferentes tanto a P17 como a P22 y se calcularon las medias para realizar comparaciones entre ellos.

Observamos que los ERGs de los ojos inyectados con inhibidor del miR-6937-5p mostraron amplitudes en las ondas b-mixta en condiciones escotópicas significativamente mayores que las registradas en los ojos contralaterales *scramble*. Este aumento de la amplitud fue significativa tanto a P17, aumento de  $15 \pm 1.3 \mu\text{V}$ , como a P22, aumento de  $18 \pm 2.3 \mu\text{V}$  ( $p < 0.05$ ) (Figura 44). En cambio, las amplitudes de los demás parámetros medidos en los ERGs, como la onda a y los OPs, no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

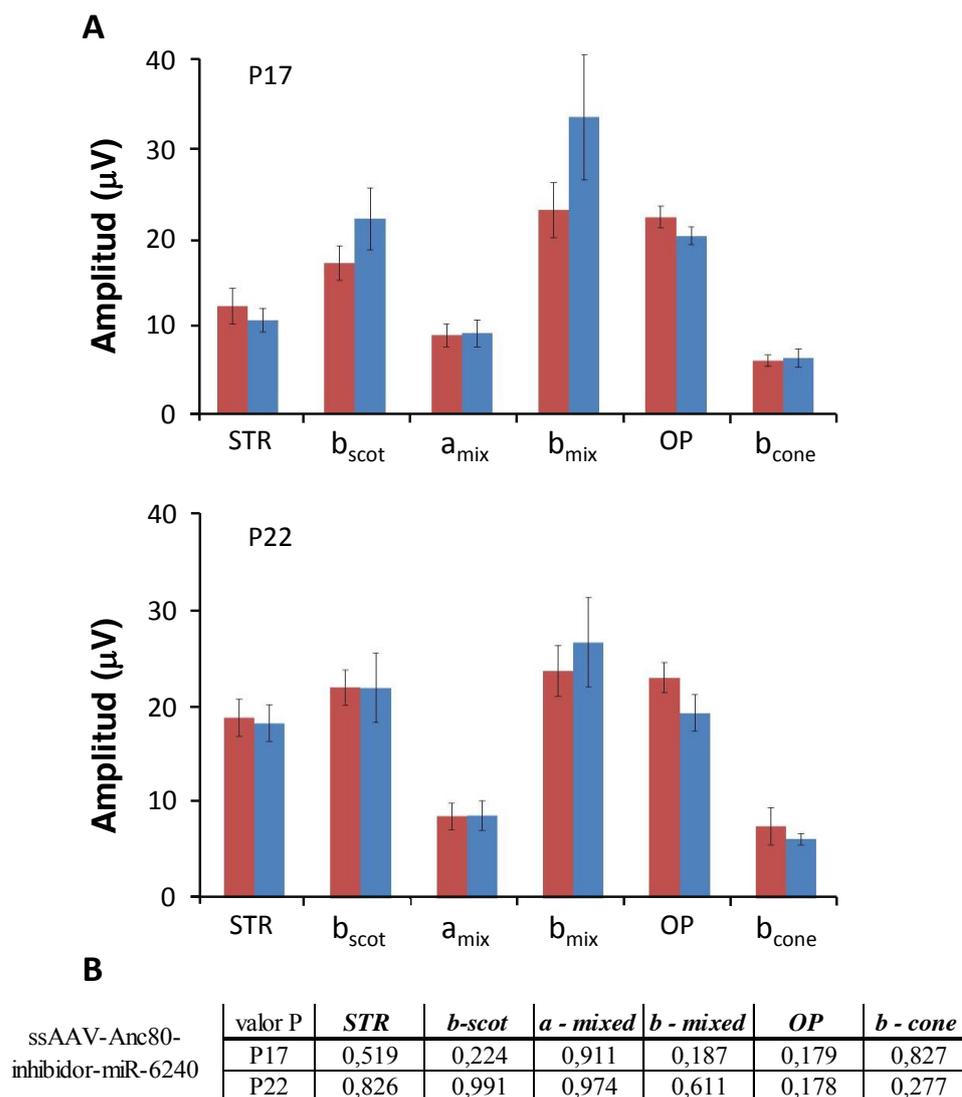
En el caso de los ratones con soluciones moduladoras de los miR-6240 y miR-142a-5p, no se detectaron diferencias significativas entre los ojos tratados y los *scramble*, en ninguno de los parámetros medidos en los registros electroretinográficos, ni tan siquiera en las ondas b-mixta (Figura 45 y Figura 46).



**Figura 44. Los ERGs muestran una mejora significativa de la capacidad visual en los ojos tratados con inhibidores de miR-6937-5p en comparación con los controles.** Se observan diferencias significativas entre los ojos tratados con solución inhibidor miR-6937-5p (azul) y los tratados con solución *scramble* (rojo) en (A) registros ERGs que reflejan la estimulación de conos y bastones bajo condiciones escotópicas. (B) Histograma representativo de las respuestas de los registros ERG. Se observan diferencias significativas en la onda b-mixta en condiciones escotópicas. (C) Tabla resumen de los valores-P obtenidos en cada parámetro analizado. Estos resultados se promedian de un total de 15 ratones por cada tratamiento. Abreviaturas: STR: Scotopic threshold response;  $b_{scot}$ : b-escotópica; OP: Oscillatory Potentials. Los datos se muestran como media  $\pm$  S.E.M. \*\* $P < 0.005$  (Student's t-test).



**Figura 45. Los ERGs no muestran una mejora significativa de la capacidad visual en los ojos tratados con precursores de miR-142a-5p en comparación con los controles.** (A) Histograma representativo de las respuestas de los registros ERG. Respuestas de ojos con solución precursor de miR-142a-5p (azul) y los tratados con solución *scramble* (rojo). (B) Tabla resumen de los valores-P obtenidos en cada parámetro analizado. Estos resultados se promedian de un total de 15 ratones por cada tratamiento. Abreviaturas: STR: Scotopic threshold response; b-scot: b-escotópica; OP: Oscillatory Potentials. Los datos se muestran como media  $\pm$  S.E.M. \*\*P < 0.005 (Student's t-test).



**Figura 46. Los ERGs no muestran una mejora significativa de la capacidad visual en los ojos tratados con inhibidores de miR-6240 en comparación con los controles. (A)** Histograma representativo de las respuestas de los registros ERG. Respuestas de ojos con solución inhibitoria de miR-6240 (azul) y los tratados con solución *scramble* (rojo). **(B)** Tabla resumen de los valores-P obtenidos en cada parámetro analizado. Estos resultados se promedian de un total de 15 ratones por cada tratamiento. Abreviaturas: STR: Scotopic threshold response; b-scot: b-escotópica; OP: Oscillatory Potentials. Los datos se muestran como media  $\pm$  S.E.M. **\*\*P < 0.005** (Student's t-test).

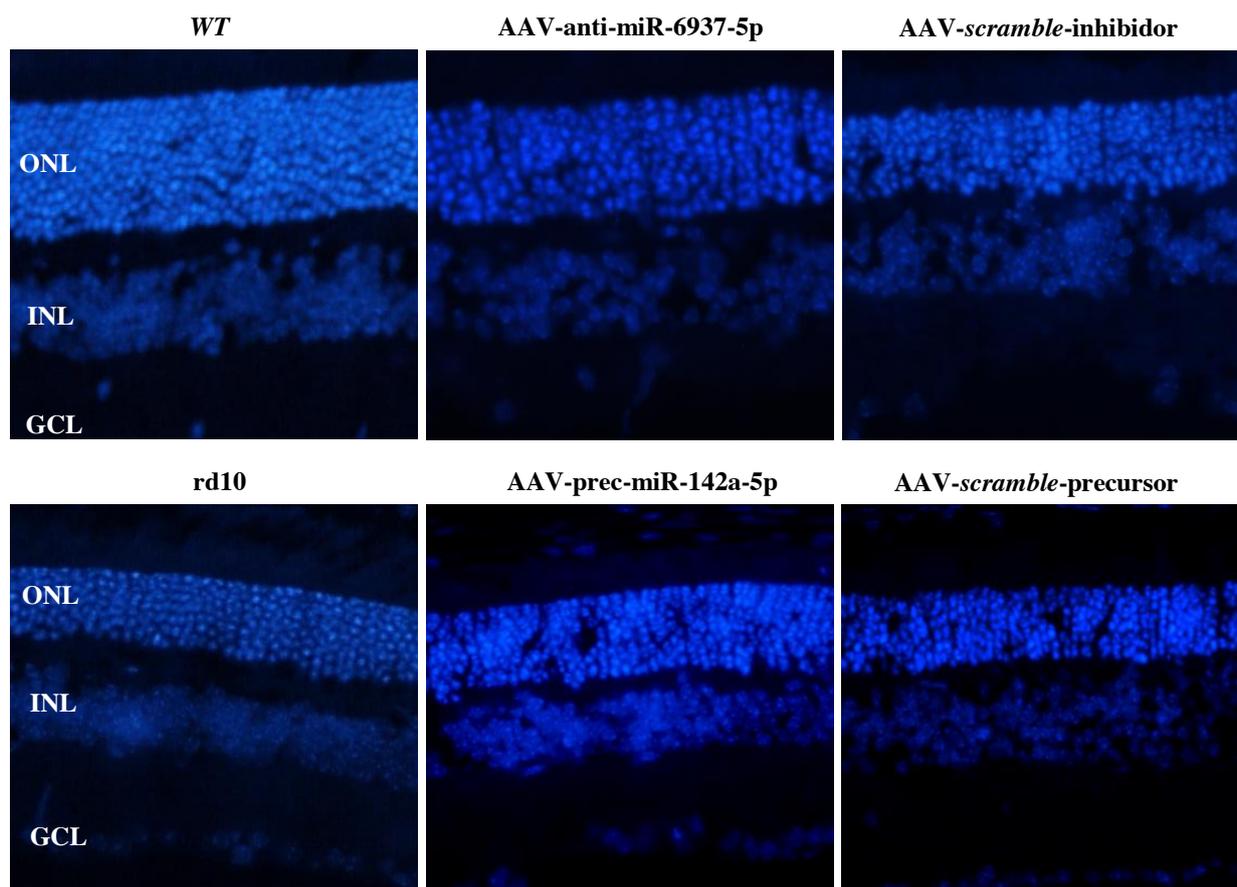
### **4.3 La inhibición *in vivo* de la expresión del miR-6937-5p logra retrasar la degeneración de las células fotorreceptoras**

Para evaluar el posible efecto protector de la administración *in vivo* de moduladores de miRNAs, medimos el número de filas de fotorreceptores y el grosor de la capa de fotorreceptores (ONL) en cortes histológicos a P22 utilizando DAPI para teñir los núcleos celulares.

La Figura 47 (arriba) muestra secciones retinales de ratones rd10 tratados con ssAAV-KAnc80-anti-miR-6937-5p y con ssAAV-KAnc80-*scramble*-inhibidor. Debido a que la degeneración no fue homogénea en toda la retina de los ratones rd10, se evaluaron los efectos de los dos tratamientos en diferentes áreas de la retina, desde el área nasal a los márgenes temporales. Posteriormente se calculó la media de los registros obtenidos para cada tratamiento para las posteriores comparaciones.

Encontramos que el número de filas de fotorreceptores y el grosor del ONL fue significativamente mayor en las retinas inyectadas con ssAAV-KAnc80-anti-miR-6937-5p que en las inyectadas con ssAAV-KAnc80-*scramble*-inhibidor (Tabla 9 y Figura 48). Se observaron  $5,55 \pm 0,23$  filas de células fotorreceptoras en las retinas *scramble* a P22, mientras que en las retinas de los ojos contralaterales con tratamiento anti miR-6937-5p se observaron  $7,48 \pm 0,13$  filas. En cuanto al grosor, el ONL de las retinas tratadas con inhibidor de miR-6937-5p medían una media de  $40,72 \pm 1,27 \mu\text{m}$ , mientras que las retinas *scramble* medían  $29,42 \pm 1,53 \mu\text{m}$ . También se encontraron diferencias significativas en el número de filas y en el grosor del ONL entre las retinas de ratones rd10 sin inyecciones y las tratadas con inhibidor de miRNA (Tabla 9 y Figura 48). El tratamiento logra enlentecer el ritmo de degeneración de las células fotorreceptoras en un 28,91% si lo medimos en relación el número de filas de células fotorreceptoras y en un 36,42% en relación al grosor del ONL.

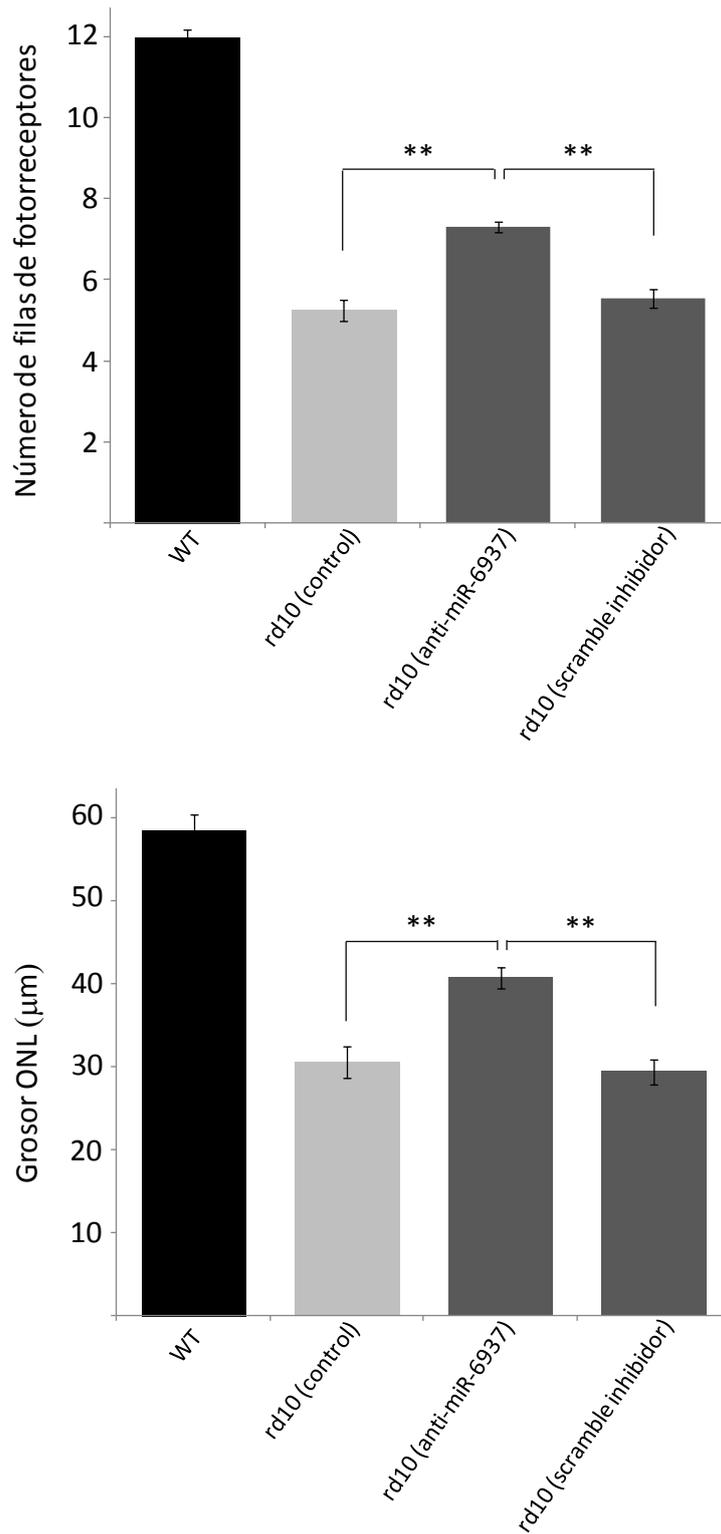
En cuanto a los ratones tratados con los moduladores de la expresión de los miR-6240 y miR-142a-5p, no se detectaron diferencias significativas ni en el grosor de la ONL ni en el número de filas de fotorreceptores entre los ratones *scramble* y anti-miRNAs o entre los ratones control sin inyección y anti-miRNAs (Tabla 9, Figura 47 (abajo) y Figura 49).



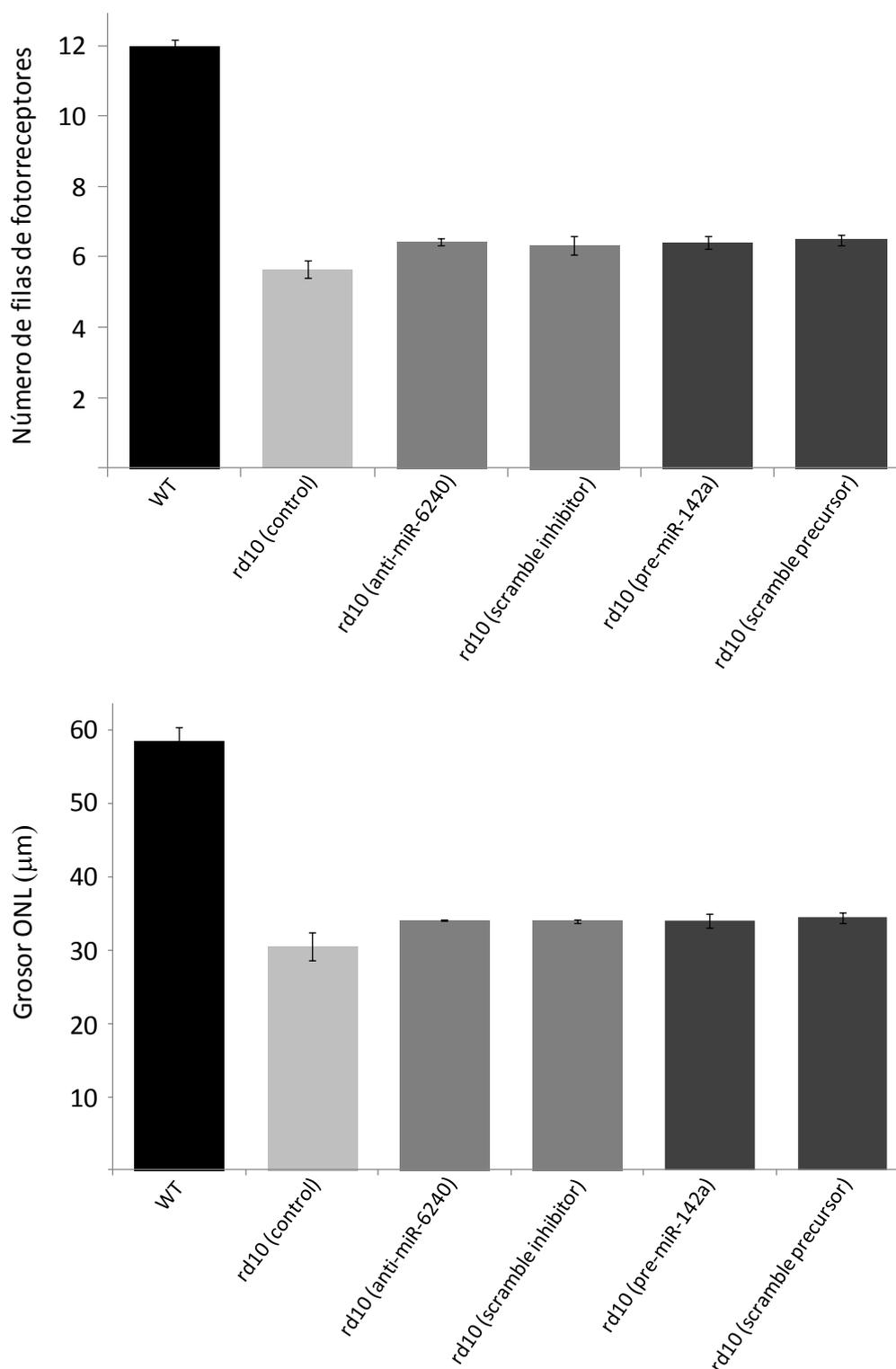
**Figura 47.** Secciones de retina de ratones rd10 con diferentes soluciones moduladoras de miRNAs analizadas el día 22 posnatal. Se aprecia diferencia en el grosor del ONL (núcleos con DAPI) entre los ratones con solución anti-miR-6937-5p y *scramble*-inhibidor (arriba), pero no entre ratones con solución precursora de miR-142a-5p y *scramble*-precursor (abajo). Abreviaturas: GCL: capa de células ganglionares; INL: capa nuclear interna; ONL: capa nuclear externa.

**Tabla 9.** Resumen de los resultados en los estudios histológicos de número de filas de FR y grosor de ONL en ratones rd10 con diferentes soluciones moduladoras de miRNAs. Los resultados se muestran como valor  $\pm$  S.E.M.

	# filas Fotorreceptores	Grosor ONL (mm)
c57bl/6J (WT)	11,98 $\pm$ 0,18	58,54 $\pm$ 1,94
rd10	5,65 $\pm$ 0,25	30,53 $\pm$ 1,93
rd10-AAV-anti-miR-6937-5p	7,48 $\pm$ 0,13	40,72 $\pm$ 1,27
rd10-AAV-anti-miR-6240	6,33 $\pm$ 0,23	33,26 $\pm$ 1,53
rd10-AAV-scramble-inhibidor	5,74 $\pm$ 0,22	30,41 $\pm$ 1,51
rd10-AAV-prec.-miR-142a-5p	6,4 $\pm$ 0,18	34,07 $\pm$ 0,99
rd10-AAV-scramble-precursor	6,48 $\pm$ 0,15	34,45 $\pm$ 0,77

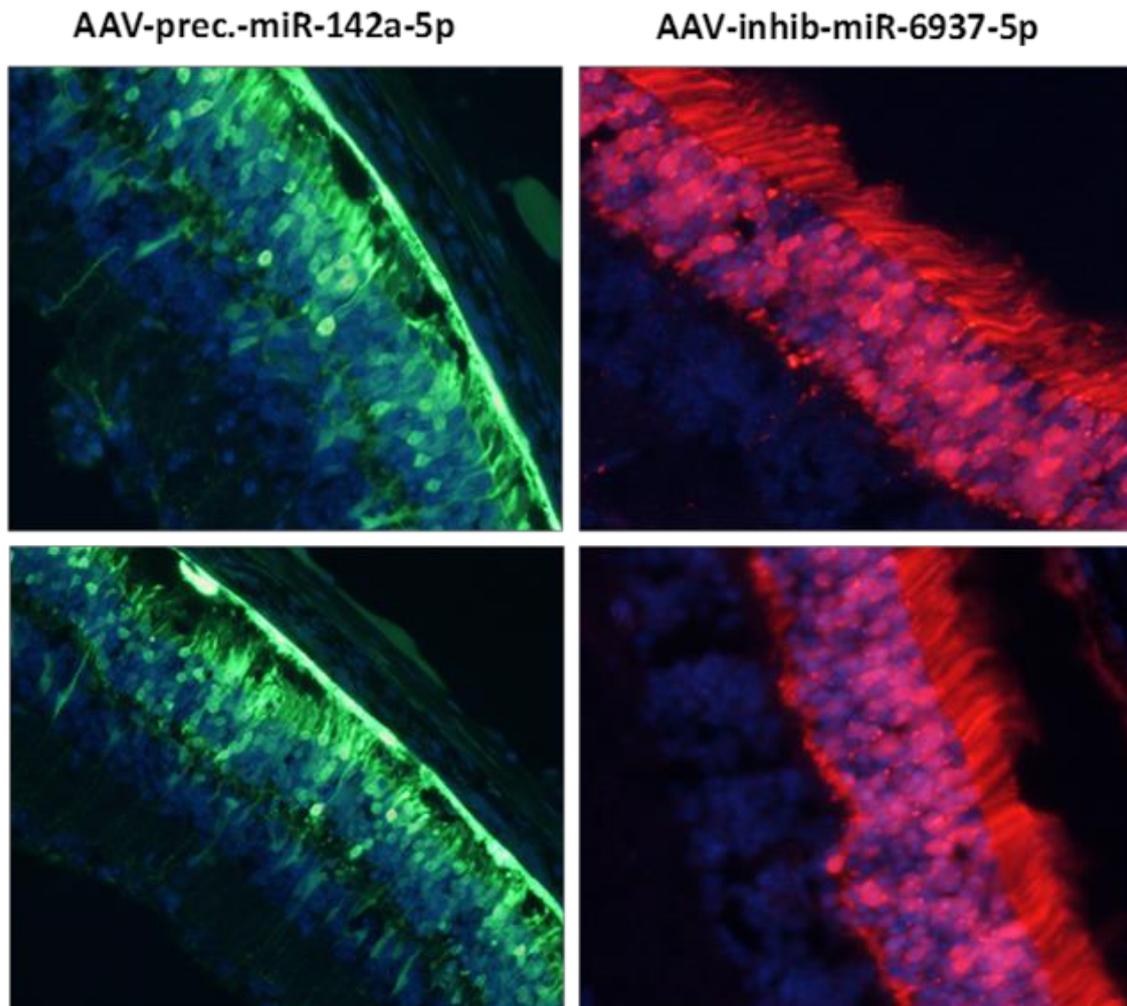


**Figura 48.** Gráfica de barras del número de filas de fotorreceptores (arriba) y del grosor de la capa de fotorreceptores (ONL) (abajo) en las retinas de ratones WT y rd10 con modulación de la expresión del miR-6937-5p. Se observan diferencias significativas entre los ojos tratados con inhibidor miR-6937-5p con respecto a ojos tratados con *scramble* inhibidor y ratones rd10 control. Los datos se muestran como media  $\pm$  S.E.M. **\*\*P < 0.005** (Student's t-test).



**Figura 49.** Gráfica de barras del número de filas de fotorreceptores (arriba) y del grosor de la capa de fotorreceptores (ONL) (abajo) en las retinas de ratones WT y rd10 con modulación de la expresión del miR-6240 y miR142a-5p. No se observan diferencias significativas entre los ojos tratados con moduladores de los miR-6240 y miR-142a-5p con respecto a ojos tratados con *scramble* y ratones rd10 control. Los datos se muestran como media  $\pm$  S.E.M. **\*\*P < 0.005** (Student's t-test).

En paralelo comprobamos que, al igual que en las pruebas previas realizadas en ratones WT, la expresión tanto de eGFP como de mCherry está limitada a capa de fotorreceptores de la retina, mientras que no se observan células infectadas en capas internas de la retina (Figura 50). Por lo tanto, los resultados obtenidos en los estudios tanto de ERG como histológicos son producidos por las alteraciones en las células fotorreceptoras y no en otros tipos celulares de la retina.



**Figura 50. Confirmación mediante histología de la especificidad de la infección en fotorreceptores.** Los estudios histológicos confirman la infección específica de las células fotorreceptoras de la retina de ratones rd10 mediante inyecciones sub-retinianas con los AAVs moduladores de miRNAs y sus correspondientes AAV-*scramble*.

#### 4.4 La inhibición *in vivo* del miR-6937-5p en ratones rd10 modula la expresión de 101 genes

El análisis del transcriptoma completo con los arrays Clariom™ S de Affymetrix nos permitió identificar un conjunto de 101 mRNAs con expresión aumentada (F.C. >1.5) entre ratones tratados con inhibidores del miR-6937-5p y los tratados con solución *scramble* y controles. Los estudios de ontología genética (GO) y el análisis de vías o rutas biológicas revelaron que entre este conjunto de mRNAs se encuentran genes relacionados con rutas que podrían estar jugando un papel importante en el rescate funcional detectado mediante los ERGs y el análisis histológico. Entre ellos destacan por ejemplo genes relacionados con procesos anti-apoptóticos –*Bcl2a1d*, *Mapk1*, *Itch*, *Arell1*-, reguladores del sistema inmune –*Angptl1*, *Trim21*-, de procesos inflamatorios –*Jak3* - y relacionados con los procesos fisiológicos de la retina –*Cryba1*, *Gucy2f*, *Crygc*-. Otros mRNA D.E. destacados fueron los relacionados con la homeostasis o regulación del calcio - *Atp2c1*, *Cpne8*, *Cldn5*, *Ramp3* -, con la regulación de la transcripción - *Atxn2l*, *Tle2*, *Rps6ka5* -, o con el transporte intracelular - *Klc1*, *Slc6a9*, *Cog2* - entre otros. En la Tabla 10 se resumen los datos de *fold-change* de todos los mRNA D.E. y sus rutas biológicas asociadas.

A continuación, realizamos un análisis de interacción miRNA-mRNA para identificar de entre los mRNAs con expresión aumentada, aquellos que además fueran genes diana predichos para el miR-6937-5p. De esta manera identificamos 3 genes, *Angptl1*, *Bcl2a1d* y *Exosc6*. Mientras que el gen *Angptl1* está asociado a la ruta de señalización *Akt* la cual promueve la supervivencia y el crecimiento en respuesta a estímulos extracelulares, los genes *Bcl2a1d* y *Exosc6* están asociados a la regulación negativa de la apoptosis (Tabla 10).

**Tabla 10. Niveles de expresión de los mRNA diferencialmente expresados después de modulación *in vivo* del miR-6937-5p y las rutas biológicas asociadas a éstos.** (\*) mRNAs diana predichos para el miR-6937-5p con expresión diferencial. SC: *Scramble*; C: Control.

Gene Symbol	Fold-change			Pathways
	6937 vs. SC	6937 vs. C	SC vs.C	
* <i>Angptl1</i>	1,5	1,67	-1,12	Akt signaling / Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway
* <i>Bcl2a1d</i>	1,6	1,5	1,22	Negative regulation of apoptotic process / T cell receptor signaling pathway
* <i>Exosc6</i>	1,62	1,58	1,02	Negative regulation of neuron apoptotic process / rRNA processing
<i>Ntng2</i>	2,31	1,69	1,36	Nervous system development / axonogenesis / cell differentiation
<i>Cpne8</i>	2,25	1,78	1,26	Calcium-dependent membrane-binding
<i>Cryba1</i>	2,16	2,14	1,01	Visual perception / camera-type eye development / lens development in camera-type eye
<i>1600002K03Rik</i>	2,1	1,73	1,22	---
<i>Atxn2l</i>	2,06	1,78	1,16	Regulation of cytoplasmic mRNA processing body assembly / stress granule assembly
<i>Cldn5</i>	2,03	2,39	-1,18	Single organismal cell-cell adhesion / myelination / calcium-independent cell-cell adhesion
<i>Cog2</i>	2,01	1,78	1,13	Protein transport // intra-Golgi vesicle-mediated transport
<i>Mapk1</i>	2	1,65	1,21	Apoptotic process / cellular response to DNA damage stimulus
<i>Lmln</i>	1,98	1,57	1,26	Proteolysis / cell cycle / mitotic nuclear division
<i>Tle2</i>	1,93	1,68	1,15	Regulation of transcription, DNA-templated / Wnt signaling pathway
<i>Fancc</i>	1,92	1,59	1,2	Myeloid cell homeostasis / DNA repair / cellular response to DNA damage stimulus
<i>Ipo9</i>	1,91	1,51	1,26	Protein import into nucleus / ribosomal protein import into nucleus / transport
<i>Hnrnp3</i>	1,9	1,54	1,24	Nucleic acid binding / RNA binding
<i>Tmem242</i>	1,9	1,71	1,11	Transmembrane Protein
<i>Defb110</i>	1,89	1,8	1,05	Innate Immune System / Defense response
<i>Defb41</i>	1,89	1,8	1,05	---
<i>Csnk1g2</i>	1,87	1,71	1,1	Protein phosphorylation / Wnt signaling pathway
<i>Gm2027</i>	1,87	1,52	1,23	---
<i>Pnpla8</i>	1,87	1,52	1,23	Cell death / lipid metabolic process / fatty acid metabolic process
<i>Tmem182a</i>	1,85	1,5	1,23	Toxic substance binding / pathogenesis

<i>Gene Symbol</i>	<i>Fold-change</i>			<i>Pathways</i>
	<i>6937 vs. SC</i>	<i>6937 vs. C</i>	<i>SC vs C</i>	
<i>Blvra</i>	1,83	1,69	1,08	Heme catabolic process / oxidation-reduction process
<i>Slc6a9</i>	1,83	1,75	1,04	Neurotransmitter transport / amino acid transport / glycine transport /
<i>Clip1</i>	1,81	1,66	1,09	Transport / positive regulation of microtubule polymerization / microtubule bundle formation
<i>Ipo13</i>	1,79	2,18	-1,22	Protein import into nucleus / transport / intracellular protein transport
<i>Dot1l</i>	1,79	1,68	1,07	Chromatin modification / histone methylation / peptidyl-lysine methylation
<i>Ckmt2</i>	1,77	1,55	1,14	Phosphocreatine metabolic process / phosphorylation
<i>Spc25</i>	1,76	1,91	-1,08	Cell cycle / chromosome segregation / mitotic nuclear division
<i>Tma16</i>	1,76	1,6	1,1	Biological process
<i>Heatr5a</i>	1,76	1,78	-1,01	Binding
<i>Sars</i>	1,75	1,88	-1,08	Translation / tRNA aminoacylation for protein translation / seryl-tRNA aminoacylation
<i>Slc7a8</i>	1,73	1,72	1	Amino acid transmembrane transport / peptide antigen binding
<i>Slc7a5</i>	1,71	1,5	1,14	Amino acid transmembrane transport / transport
<i>Nt5c2</i>	1,71	1,52	1,12	IMP metabolic process / adenosine metabolic process
<i>Scfd1</i>	1,7	1,71	-1,01	Retrograde vesicle-mediated transport, Golgi to ER / vesicle docking involved in exocytosis
<i>Syf2</i>	1,67	2,01	-1,21	mRNA processing / mitotic G2 DNA damage checkpoint / RNA splicing
<i>Frmd4b</i>	1,67	1,86	-1,11	Establishment of epithelial cell polarity
<i>Jmy</i>	1,67	2,37	-1,42	Regulation of apoptotic process / intrinsic apoptotic signaling pathway by p53 class mediator
<i>Crygc</i>	1,66	1,5	1,18	Eye development / visual perception / camera-type eye development
<i>Rps6ka5</i>	1,66	1,96	-1,18	Regulation of transcription, DNA-templated
<i>G6pc3</i>	1,65	1,57	1,05	Gluconeogenesis / phosphate-containing compound metabolic process
<i>Slc6a8</i>	1,64	1,61	1,02	Transport / ion transport / sodium ion transport / neurotransmitter transport
<i>Mettl16</i>	1,64	1,95	-1,18	Methylation
<i>U2af1</i>	1,64	1,6	1,03	mRNA processing / RNA splicing
<i>Tspan31</i>	1,63	2,09	-1,29	Regulation of cell development, activation, growth and motility
<i>Tmem181b-ps</i>	1,63	1,82	-1,12	pathogenesis
<i>Tmem181a</i>	1,63	1,82	-1,12	pathogenesis

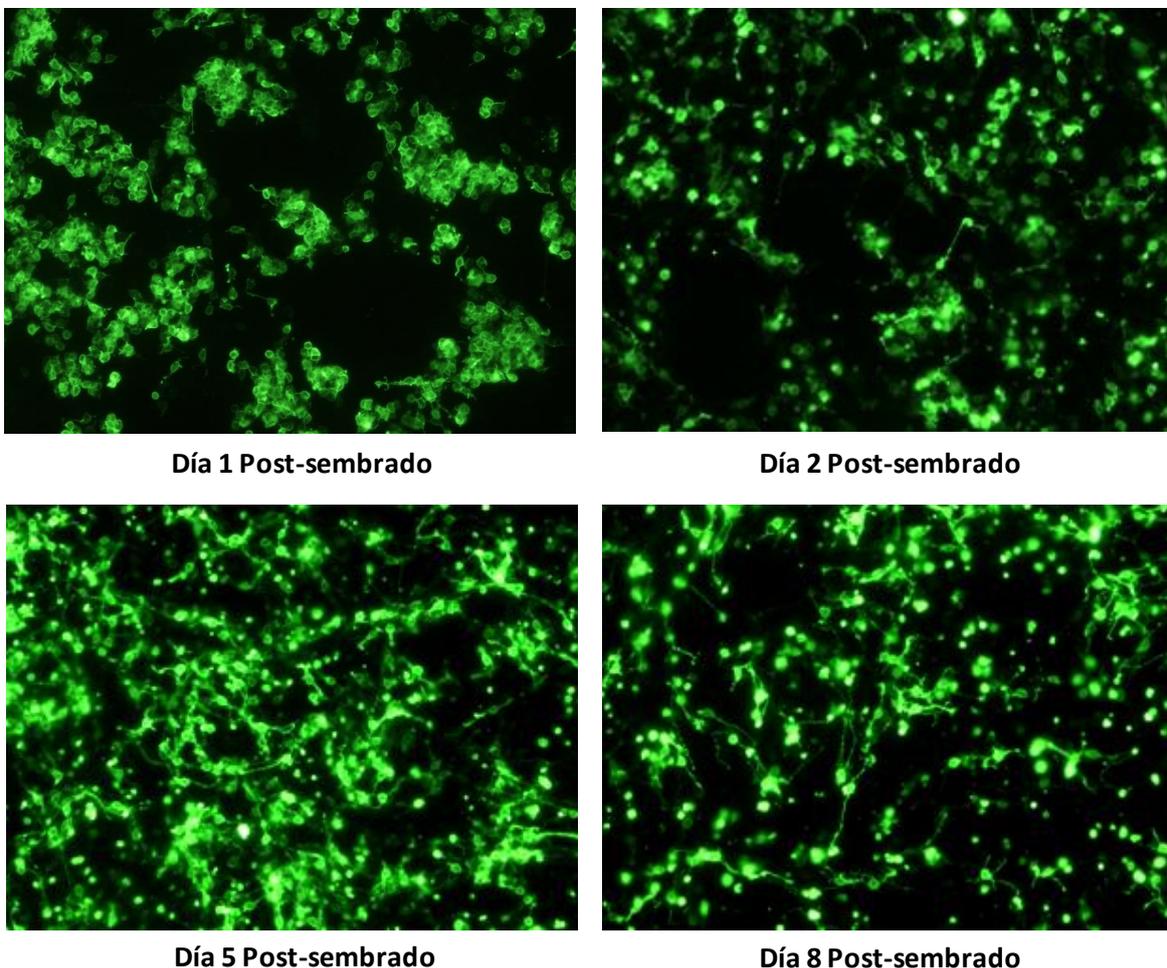
<i>Gene Symbol</i>	<i>Fold-change</i>			<b>Pathways</b>
	<b>6937 vs. SC</b>	<b>6937 vs. C</b>	<b>SC vs C</b>	
<i>Aars</i>	1,62	1,58	1,02	tRNA Aminoacylation
<i>Atp2c1</i>	1,62	1,86	-1,14	Cellular calcium ion homeostasis / signal transduction / ATP catabolic process / transport
<i>Ankrd60</i>	1,61	1,5	1,08	---
<i>Pfdn2</i>	1,59	1,58	1	Protein folding
<i>Tm4sf1</i>	1,59	1,84	-1,16	---
<i>Slc25a44</i>	1,59	1,78	-1,12	Transport / transmembrane transport
<i>Afg3l1</i>	1,59	1,57	1,01	Proteolysis / mitochondrial protein processin
<i>Gucy2f</i>	1,59	1,95	-1,22	Visual perception / cGMP biosynthetic process / phototransduction
<i>R3hdm4</i>	1,59	1,53	1,04	nucleic acid binding
<i>Dcaf12</i>	1,58	1,83	-1,15	Protein ubiquitination
<i>Ireb2</i>	1,58	1,79	-1,14	Regulation of translation / cellular iron ion homeostasis
<i>Gm10477</i>	1,58	1,77	-1,12	---
<i>Thg1l</i>	1,58	1,67	-1,06	tRNA modification / tRNA processing / protein homotetramerization
<i>Rhot2</i>	1,58	1,88	-1,19	cellular homeostasis / mitochondrion transport along microtubule
<i>Gm16503</i>	1,57	1,53	1,02	---
<i>Enkd1</i>	1,57	1,66	-1,06	---
<i>Tm2d1</i>	1,57	1,65	-1,06	Apoptotic process / G-protein coupled receptor signaling pathway
<i>Ramp3</i>	1,57	1,5	1,05	Calcium ion transport / intracellular protein transport / signal transduction
<i>Arell</i>	1,57	1,69	-1,08	Negative regulation of apoptotic process / Protein ubiquitination
<i>Gm12689</i>	1,56	1,62	-1,04	---
<i>Svall</i>	1,55	1,54	1,01	---
<i>Sael</i>	1,55	1,62	-1,05	Cellular protein modification process / protein sumoylation / regulation of mitotic cell cycle
<i>Gm14525</i>	1,55	1,66	-1,07	---
<i>Trim21</i>	1,55	1,58	1,12	Regulation of Innate immune response / positive regulation of cell cycle / protein polyubiquitination
<i>Klc1</i>	1,55	1,6	-1,03	Intracellular protein transport / microtubule-based movement
<i>Wdr27</i>	1,55	1,5	1,03	Protein-protein interaction / cell signalling

<i>Gene Symbol</i>	<i>Fold-change</i>			<i>Pathways</i>
	<i>6937 vs. SC</i>	<i>6937 vs. C</i>	<i>SC vs C</i>	
<i>Kcnd1</i>	1,54	1,74	-1,13	Transport / ion transport / potassium ion transport / regulation of ion transmembrane transport
<i>Mtrf1</i>	1,54	1,61	-1,04	Translational termination / Nucleotide binding and translation release factor activity
<i>Dolk</i>	1,53	1,69	-1,11	Phosphorylation / dolichyl monophosphate biosynthetic process
<i>Rragd</i>	1,53	1,59	-1,04	RET signaling / Translational Control
<i>Abcb1a</i>	1,53	2,04	-1,34	G2/M transition of mitotic cell cycle / ATP catabolic process / drug transmembrane transport
<i>Gpn3</i>	1,53	1,53	1	Nucleotide binding / hydrolase activity
<i>Tfpt</i>	1,53	1,69	-1,1	DNA repair / apoptotic proces / DNA recombination / regulation of transcription, DNA-templated
<i>Hnrnpu</i>	1,52	1,7	-1,12	mRNA processing / RNA splicing / osteoblast differentiation
<i>Itch</i>	1,52	1,65	-1,09	Negative regulation of apoptotic process / Immune system process / positive regulation of T cell anergy
<i>Slc30a7</i>	1,52	1,53	-1,01	Transport / transmembrane transport / ion transport / cation transport / zinc ion transport
<i>Slc17a5</i>	1,52	1,61	-1,06	Transport / amino acid transport / sialic acid transport / ion transmembrane transport
<i>Jak3</i>	1,52	1,61	-1,06	Negative regulation of cytokine production / regulation of cytosolic calcium concentration
<i>Dhx16</i>	1,52	1,61	-1,06	ATP catabolic process
<i>Ifi44</i>	1,51	1,95	-1,29	Heart Block, Congenital
<i>Vps13d</i>	1,51	1,5	1,01	Choreoacanthocytosis
<i>Wdr54</i>	1,51	1,58	-1,05	---
<i>Ctdnep1</i>	1,51	1,7	-1,13	Positive regulation of canonical Wnt signaling pathway / protein dephosphorylation
<i>Cd68</i>	1,51	1,9	-1,26	Cellular response to organic substance
<i>Drg1</i>	1,51	1,62	-1,07	Ferrous iron transport
<i>Ak2</i>	1,5	1,65	-1,1	ADP biosynthetic process / phosphorylation / AMP metabolic process
<i>Tceanc2</i>	1,5	2,23	-1,49	Transcription, DNA-templated
<i>Huwe1</i>	1,5	1,61	-1,07	Protein ubiquitination / DNA repair / cellular response to DNA damage stimulus
<i>Xpo1</i>	1,5	2,23	-1,49	Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter / protein export from nucleus
<i>March6</i>	1,5	1,64	-1,09	Protein K48-linked ubiquitination
<i>Pla2g7</i>	1,5	1,58	-1,05	Regulation of monocyte chemotaxis /inflammatory response/calcium-independent phospholipase activity
<i>Tm9sf3</i>	1,5	1,87	-1,25	Assembly and activity of V-ATPase

## **5. Modulación *in vitro* de miRNAs en cultivos celulares y evaluación de dicha modulación.**

### **5.1 El sistema miRIDIAN microRNA Mimic consigue transfectar la línea celular MU-PH1 con mayor eficiencia entre todos los sistemas testados.**

A pesar de ser capaces de poner a punto los cultivos primarios de células fotorreceptoras permaneciendo viables durante aproximadamente 8 días (Figura 51), no conseguimos infectar o transfectar de manera efectiva dichas células usando diferentes metodologías, véase nucleofección (Lonza, Basilea, Suiza), transfección plasmídica o incubación con vectores virales.



**Figura 51. Cultivos primarios de células fotorreceptoras.** En las diferentes imágenes se observa el estado de las células fotorreceptoras en cultivo a diferentes días post-sembrado. Se puede observar como a medida que avanzan los días las células generan más conexiones entre ellas. Para visualizar las células fotorreceptoras se utilizó el anticuerpo anti-rodopsina (1:1000).

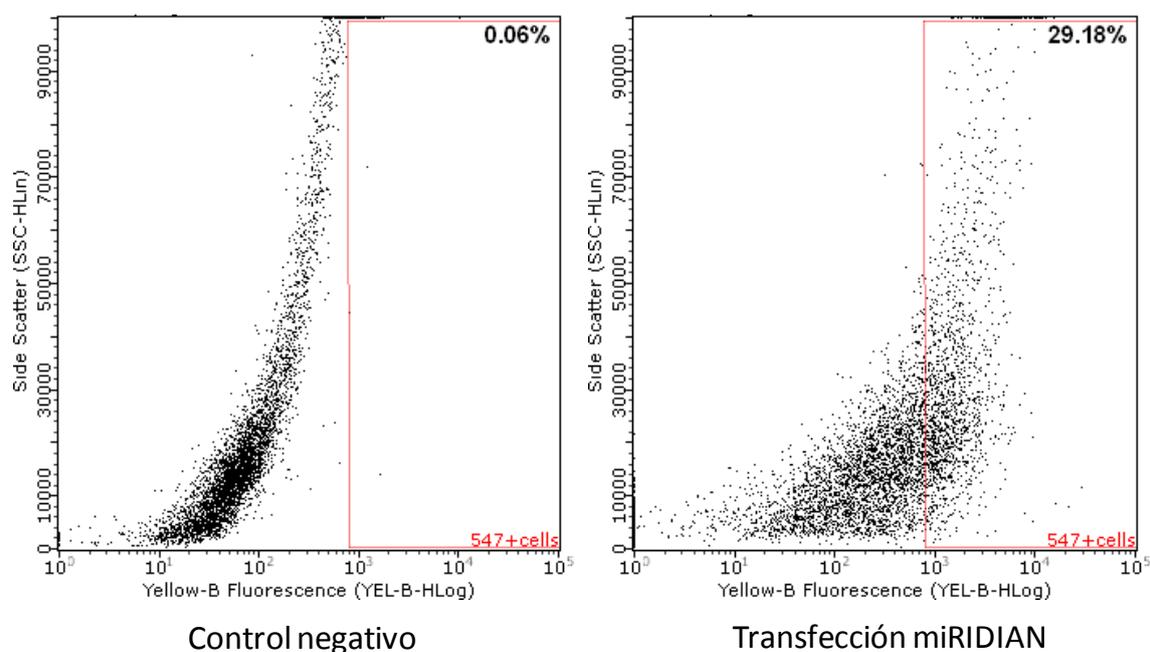
Por lo tanto optamos por utilizar una línea celular con características de fotorreceptor, la línea celular MU-PH1<sup>196</sup> como medio de estudio del efecto en la expresión mRNA provocado por la modulación *in vitro* de miRNAs.

Una vez puesto a punto el cultivo de dicha línea celular, testamos cuatro sistemas diferentes para introducir material genético en las células MU-PH1, dos sistemas de transfección y otros dos de infección. Se realizó transfección de plásmidos y de moléculas miRIDIAN microRNA Mimic mediante complejos lipídicos y se realizó infección de material genético con lentivirus (LV) y con virus adeno-asociados (AAV).

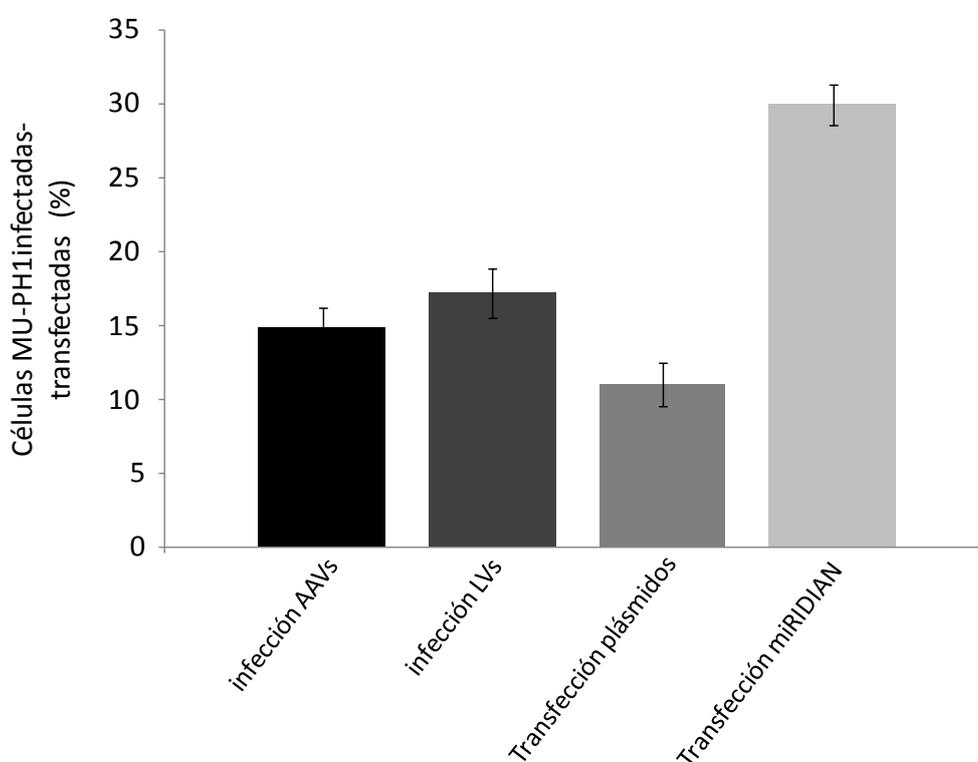
Entre todas las metodologías testadas, el sistema de transfección de moléculas miRIDIAN microRNA Mimic mediante complejos lipídicos fue con el que mejores resultados obtuvimos. Conseguimos una transfección aproximada del  $29.9 \pm 1.45$  % de las células MU-PH1 con una toxicidad mínima para las células en cultivo. Este dato de porcentaje de transfección fue determinado gracias a la tecnología de citometría de flujo, sistema que permite diferenciar las células transfectadas de las no transfectadas gracias a la fluorescencia emitida de Dy547 por las células transfectadas (Figura 52).

Los otros sistemas testados lograron valores inferiores de infección/transfección; en la transfección de plásmidos mediante complejos lipídicos logramos transfectar aproximadamente el  $11.035 \pm 1.5$  % de las células MU-H1; mediante la utilización de LV se logró la infección del  $17.21 \pm 1.65$  % de las células; y mediante la utilización de AAVs se logró la infección del  $14.83 \pm 1.34$  % de las células (Figura 53). En estos casos, el cálculo se realizó mediante visualización y conteo en microscopio de fluorescencia. Además, detectamos mayores niveles de toxicidad celular en las células MU-PH1 cuando éstas eran infectadas con LV y AAVs en comparación a las transfecciones con complejos lipídicos (Figura 54).

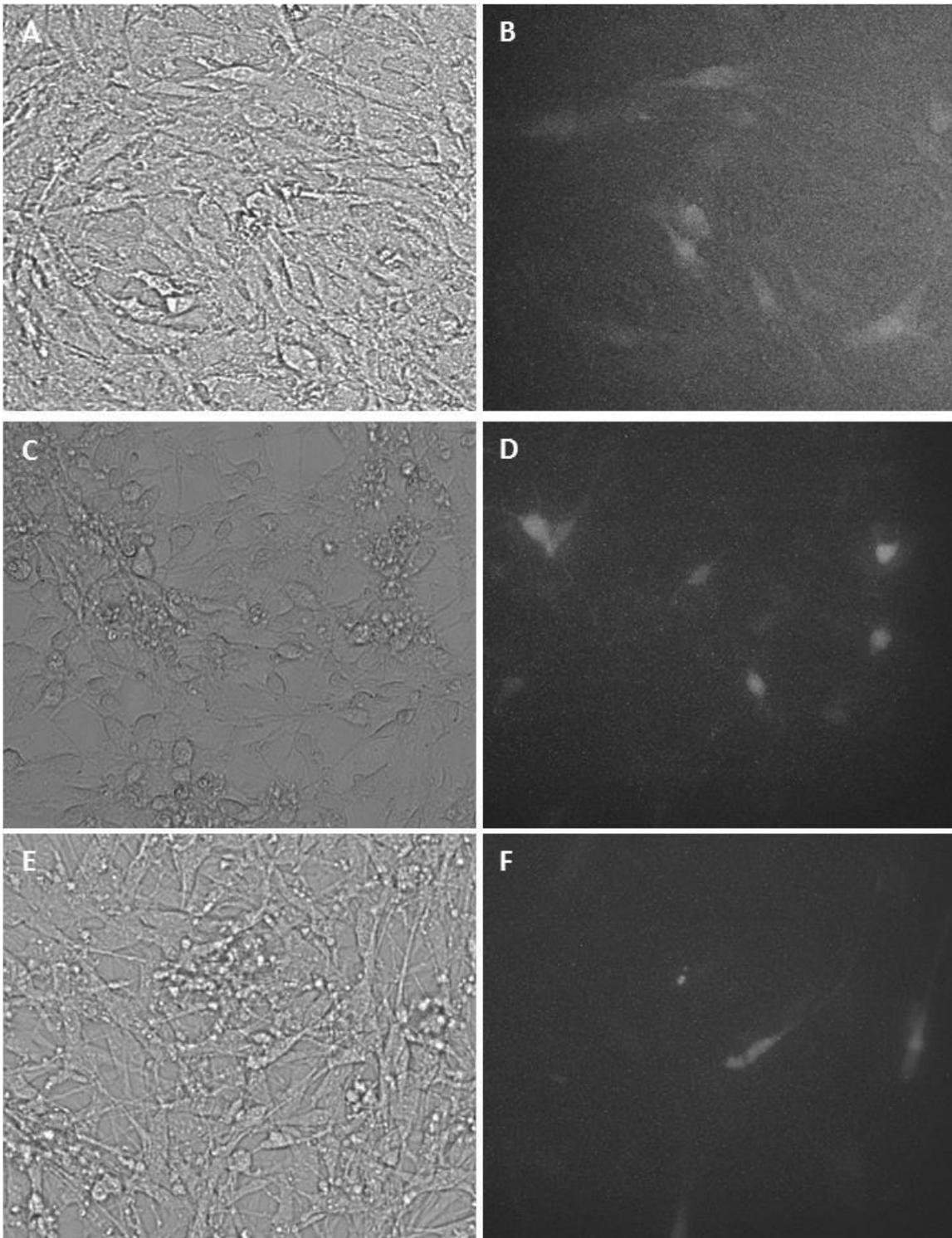
Posteriormente, realizamos una prueba para determinar la sobre-expresión que lográbamos generar en las células MU-PH1 utilizando el miRIDIAN microRNA mmu-miR-6937-5p mimic. Cuantificamos mediante qPCR que obteníamos un aumento de  $246.4 \pm 3.66$  veces la expresión del miR-6937-5p en las células MU-PH1 en comparación con las células tratadas con el miRNA mimic negative control.



**Figura 52. Histogramas de los estudios de citometría de flujo.** Los histogramas de una dimensión representan el número de células (eje ordenadas) frente a la intensidad de fluorescencia Dy547 (eje abcisas). Este sistema nos permite diferenciar las células transfectadas (Dy547 positivas) de las no transfectadas (Dy547 negativas).



**Figura 53. Capacidad de infección/transfección de células MU-PH1 de diferentes sistemas.** Los datos se representan como promedio del porcentaje de infección/transfección  $\pm$  S.E.M., n = cuadruplicados por condición en 3 cultivos independientes. Análisis estadístico, Student's t-test.



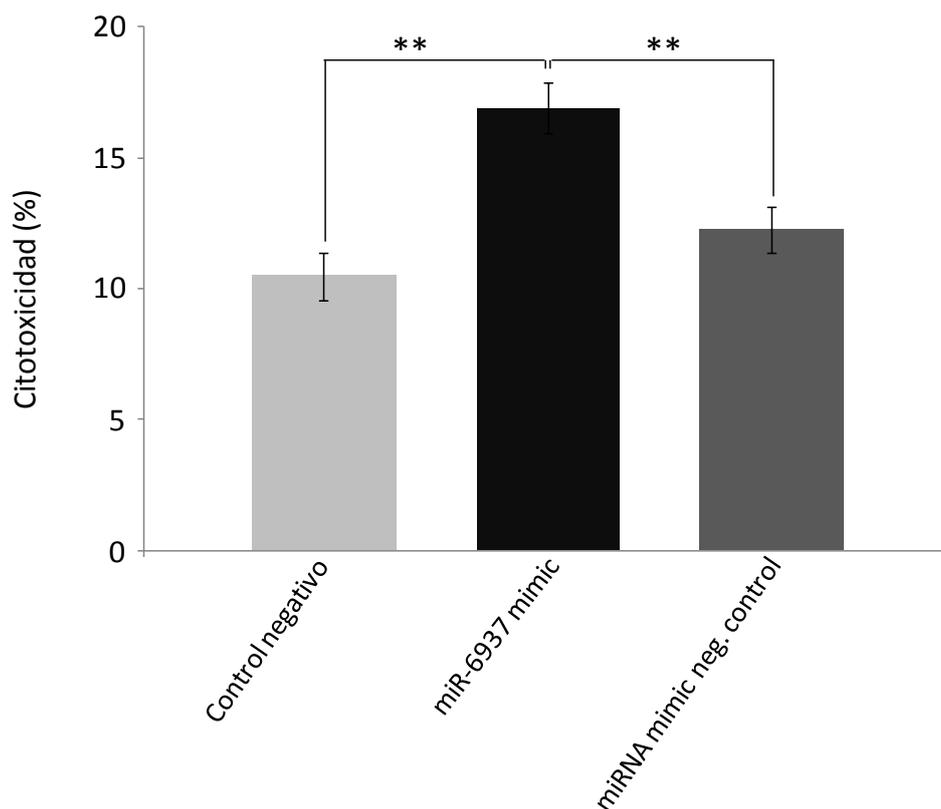
**Figura 54. Comparativa de la capacidad de infección y transfección de la línea celular MU-H1 mediante diferentes sistemas.** Transfección de plásmidos mediante complejos lipídicos (A-B); infección de material genético con LV (C-D); y con AAVs (E-F). A la izquierda se aprecia la densidad celular de los cultivos en campo claro (bright-field) y a la derecha se observan las células mCherry positivas que destacan sobre el fondo negro.

## **5.2 El aumento *in vitro* de la expresión del miR-6937-5p en la línea celular MU-PH1 aumenta significativamente la citotoxicidad celular.**

Se determinó la citotoxicidad o la muerte de las células MU-PH1, células con características de fotorreceptor, en cultivos 48 horas después de ser expuestas a diferentes tratamientos con el sistema miRIDIAN (Dharmacon). Dicho estudio se realizó con el objetivo de simular en cultivos celulares la expresión aumentada del miR-6937-5p observada en las retinas de los ratones rd10, y determinar así la posible contribución de la sobre-expresión de este miRNA en la muerte de los fotorreceptores en este modelo animal de la RP. En la Figura 55 se muestran los resultados obtenidos.

En resumen, en la figura 55 se observa como los cultivos en los que se aumentó la expresión del miR-6937-5p existe mayor muerte celular o citotoxicidad de las células MU-PH1 en comparación con los cultivos en los que se ha introducido el miRNA mimic negative control y también respecto a los cultivos control negativo (sin tratamiento). En ambas comparaciones entre tratamientos las diferencias son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), mientras que si se comparan los resultados de citotoxicidad de los cultivos tratados con miRNA mimic negative control y los controles negativos (sin tratamiento) no existen diferencias significativas entre los cultivos.

Por otra parte, cuantificamos mediante qPCR el aumento de expresión del miR-6937-5p en las células MU-PH1 provocado por la transfección de las moléculas miRIDIAN microRNA mmu-miR-6937-5p mimic. Detectamos un aumento de 174 veces la expresión del miR-6937-5p en las células MU-PH1 en comparación con las células tratadas con el miRNA mimic negative control.



**Figura 55. Citotoxicidad de los cultivos tratados con miR-6937-5p mimic, con miRNA mimic negative control y los controles negativos (sin tratamiento).** Se observa cómo hay significativamente más citotoxicidad en los cultivos con aumento de la expresión del miR-6937-5p en comparación tanto con el control negativo de los mimic como con el control negativo (sin tratamiento), mientras que no se observan diferencias significativas entre los dos tipos de controles. Los datos se representan como promedio del porcentaje de muerte celular o citotoxicidad  $\pm$  S.E.M.,  $n = 6$  por condición en 2 cultivos independientes (\*\*  $p < 0.005$ , Student's t-test).

*DISCUSIÓN*



## **DISCUSIÓN**

En la actualidad, se ha puesto de manifiesto que la regulación de multitud de procesos biológicos y patológicos no depende solamente de mecanismos de control transcripcional, sino que engloba además mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN o las modificaciones postraduccionales de histonas, pero también elementos no convencionales de regulación de la expresión génica, como ciertos RNAs no codificantes, como los LncRNAs, los RNA circulares y los microRNAs (miRNAs).

Está bien establecido el papel crítico que juegan los miRNAs en casi todos los aspectos de la biología, incluyendo procesos fisiológicos y patológicos. Hay cada vez más evidencia de la participación de una desregulación en la expresión de miRNAs en un amplio espectro de enfermedades, lo que apoya su contribución a los mecanismos patológicos de las mismas<sup>57,121,122,144,147-149,151,165,197</sup>. En lo que al sistema visual se refiere, es conocido que los miRNAs están implicados en la fisiología normal, en el desarrollo y en la supervivencia de la retina<sup>155,156</sup>, así como en un número creciente de enfermedades retinianas distintas en las que se ha observado una expresión aberrante de ciertos miRNAs<sup>161-164</sup>. Así mismo, se ha observado que los miRNAs son clave en mecanismos moleculares comunes a diferentes tipos de RP como la apoptosis, la inflamación y la regulación del sistema inmune<sup>45,115,198</sup>. Por lo tanto, nosotros trabajamos bajo la hipótesis de que las alteraciones en la expresión de un grupo de miRNAs podrían contribuir a los mecanismos moleculares implicados en la fisiopatología de la RP y que la modulación génica mediada por los miRNAs podría explicar, al menos en parte, las diferencias fenotípicas de miembros de una misma familia afectada por la retinosis pigmentaria (RP), que a pesar de compartir la misma mutación siguen una progresión diferente de la enfermedad. Además se ha descrito un patrón común de expresión diferencial de miRNAs en cuatro modelos murinos de RP, a pesar de que diferentes genes (*Rho* y *Rds*) y patrones de herencia estaban involucrados<sup>168,169</sup>. Por tanto otro de nuestros intereses se ha centrado en buscar un patrón común de expresión diferencial en otro modelo murino de la enfermedad, el ratón rd10, con mutaciones en el gen *pde6b*. Esto nos permitiría la posibilidad de plantearnos un novedoso abordaje terapéutico basado en la modulación de uno o un grupo de microRNAs y que fuera aplicable a distintos tipos de RP con independencia del gen implicado.

La RP es una de las principales causas de ceguera a nivel mundial y la forma más común de degeneración hereditaria de la retina<sup>13-16</sup>. A pesar de que se están investigando diferentes estrategias, actualmente no hay opciones terapéuticas satisfactorias disponibles para esta enfermedad genética. Uno de los enfoques terapéuticos más desarrollados y estudiados es la terapia de restitución génica, pero tiene limitaciones importantes como que es necesario aplicarla en estadios iniciales de la enfermedad, cuando la mayoría de los fotorreceptores son viables o que es específica para cada tipo de mutación, que se hace particularmente evidente en enfermedades tan complejas como la RP con un gran número de genes y mutaciones involucradas en su desarrollo. Por lo tanto, mientras se desarrollan tratamientos específicos para cada paciente, sería deseable disponer de alternativas terapéuticas con un enfoque generalizado que puedan preservar la visión durante el mayor tiempo posible, independientemente de las mutaciones causales. Creemos que la modulación de la expresión de los miRNAs se incluiría dentro de este grupo de tratamientos dirigidos no a corregir el defecto genético, sino a mejorar las consecuencias del mismo, permitiendo prolongar la viabilidad de los fotorreceptores, abriendo el espectro de patologías oculares susceptibles de terapia.

El desarrollo de esta tesis se ha planteado alrededor de dos objetivos principales; por una parte el estudio de la expresión de miRNAs como potencial diana terapéutica en la retinosis pigmentaria, y por otra parte el análisis del efecto de la modulación *in vivo* de un grupo de miRNAs en un modelo animal de la enfermedad. Los resultados obtenidos sugieren que la modulación del miR-6937-5p podría considerarse una opción terapéutica interesante ya que logra ralentizar significativamente el deterioro visual y la degeneración de los fotorreceptores en el raton rd10. Esto supone un aumento de la ventana terapéutica que puede ser de gran utilidad en estrategias como la terapia génica o la terapia celular.

- ***19 miRNA se expresan de manera aberrante en ratones rd10, los cuales podrían estar implicados en la degeneración de la retina de este modelo animal de RP.***

En este trabajo, hemos contribuido a ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la retinosis pigmentaria. Identificamos un total de 19 miRNAs que podrían estar desempeñando un papel fundamental en la

fisiopatología y/o en la progresión de la enfermedad. La ontología génica y el análisis de enriquecimiento de las vías biológicas mostraron que algunos de los genes diana predichos para estos miRNAs, los cuales también mostraron expresión diferencial entre ratones rd10 y WT, están asociados a vías biológicas con potencial implicación en la degeneración o en la supervivencia de la retina.

Para proporcionar pruebas experimentales que pudiesen apoyar una posible asociación entre la desregulación en la expresión de miRNAs y la degeneración de la retina, realizamos un estudio comparativo del perfil de expresión global de miRNAs de las retinas del ratón modelo de RP, el ratón rd10 y el ratón C57BL/6J (WT) como control. Utilizamos para ello la tecnología de los microarrays en muestras de retinas en etapas tempranas de la degeneración retiniana. Con el fin de obtener una mejor comprensión de la posible relación entre la alteración de miRNAs y la regulación de la expresión génica con implicaciones en la degeneración de la retina, también realizamos un estudio del transcriptoma completo en las mismas muestras utilizadas para el análisis de expresión de miRNAs.

Consideramos una opción probable que los miRNAs sobre o infra expresados dos y tres días previos a la aparición de apoptosis podría estar asociados con los mecanismos de muerte celular de los fotorreceptores (PR). Siguiendo esta lógica, consideramos que aquellos miRNAs desregulados en etapas posteriores al inicio de la apoptosis podrían desempeñar papeles relevantes en mecanismos compensatorios en un intento de contrarrestar la muerte de los PR. Por tratarse de un estadio tan temprano del proceso de muerte, un día después de las primeras manifestaciones citológicas de apoptosis, consideramos poco probable que la expresión diferencial fuera consecuencia directa de la muerte de los fotorreceptores. Sin embargo no podemos descartar esta posibilidad. Por lo tanto, uno de los aspectos metodológicos clave de nuestro estudio fue determinar el momento exacto de inicio de la degeneración de los fotorreceptores en nuestro modelo de ratón rd10, con el fin de establecer los puntos temporales pertinentes para el análisis de perfiles de expresión de miRNA y mRNA.

De acuerdo con estudios previos, los procesos apoptóticos en los PR en el ratón rd10 se inician aproximadamente entre la segunda y tercera semana postnatal<sup>51,61-63</sup>. El inicio de la muerte de PR depende de las condiciones de luz, con ligeras diferencias reportadas entre diferentes laboratorios, dependiendo de la intensidad y el tiempo de luz a la que el

animal está expuesto<sup>199</sup>. Por lo tanto, para establecer con precisión el inicio de la muerte celular de los fotorreceptores en nuestra cepa de animales y en las condiciones de nuestro animalario, realizamos nuestro propio estudio de dinámica de la muerte celular. Se obtuvieron muestras retinianas cada 12 horas entre el día P13 y P22 y se analizaron utilizando el ensayo TUNEL. Se determinó que la apoptosis comienza en la retina central entre P15.5 y P16 (Figura 30), y que dicha muerte progresa hacia la periferia (Figura 31), de acuerdo con lo descrito previamente<sup>61-63</sup>.

Basándonos en nuestros resultados de TUNEL, seleccionamos muestras de retina en tres puntos temporales para los estudios de expresión de miRNA y mRNA: antes del inicio de la apoptosis en los días posnatal 13 y 15 (P13 y P15) y justo después de la aparición de la apoptosis, a P17. Se usaron dos sistemas de screening diferentes, uno basado en qPCR y el otro basado en hibridación. Identificamos un total de 169 miRNAs al menos 1.5 veces sobre o infra-regulados en comparación con las muestras control (valor  $p < 0,05$ ), de los cuales 25 miRNAs candidatos fueron seleccionados para validación por qPCR.

Cabe destacar que la proporción de miRNAs validado fue mayor entre los sobre-expresados, con un 90% de miRNAs validados, frente al 33% de validación de miRNAs infra-expresados. Esto podría estar indicando un sesgo en el proceso de hibridación hacia resultados de falsos positivos en los casos de miRNA detectados regulados a la baja. Se ha propuesto que los microarrays pueden sufrir hibridación cruzada que pueden conducir a reacciones de hibridación entre transcritos y sondas no diana que hace difícil distinguir entre el miRNA maduro e inmaduro e incluso entre distintos miRNAs de secuencia similar<sup>200,201</sup>. Esto podría conducir a un aumento de los valores de la señal de expresión para algunos miRNAs, y también podría explicar por qué el miR-7002-5p, el cual mostró la más alta sobre-expresión entre todos los miRNAs analizados, no pudo ser validado por qRT-PCR.

En cuanto a los estudios del transcriptoma completo mediante los arrays MTA de Affymetrix, estos estudios desvelaron 2115 mRNAs con *fold-change*  $\pm 1.5$  y valor  $p < 0.05$ . Los 2115 mRNAs fueron utilizados para sometidos a estudios de ontología genética y de rutas biológicas. Cabe destacar que la lista de los mRNAs sobre-expresados está enriquecida en genes relacionados con vías de muerte celular como los genes *Lcn2*, *Mt1*, *Ifi204* o *Xaf1* (F.C. 24.44, 10.13, 7.74 y 3.12, respectivamente) o en

genes con implicación en el sistema inmune o inflamatorio como *Serpina3n*, *Ifitm3* o *Osmr* (F.C. 113, 19.87 y 12.85, respectivamente), entre otros. Entre los mRNAs con expresión disminuida, observamos genes relacionados con rutas tan diversas como neurogénesis, organización sináptica o regulación de la diferenciación de las células T, entre otras.

Los genes *Serpina3n* y *Osmr*, además de estar vinculados a rutas biológicas relacionadas con la degeneración retiniana, se ha observado previamente como su expresión se ve aumentada en retinas dañadas por exposición a luz y en desprendimiento de retina<sup>202</sup>, por lo que este aumento en su expresión parece ser común en situaciones de daño en la retina independientemente de su naturaleza/etiología. En este sentido, Sarthy y colaboradores observaron que las células de Müller aumentan la expresión de *Serpina3n* en respuesta a la degeneración de las células fotorreceptoras<sup>203</sup>. Por otra parte, el gen *Lcn2* ha sido previamente asociado a degeneración macular asociada a la edad por su implicación en los procesos de respuesta inflamatoria crónica<sup>204</sup> y se ha observado aumento en su expresión después de inyección intravítrea en retinas de ratones<sup>205</sup>. Ambas observaciones apuntan a una expresión aumentada común en diferentes procesos inflamatorios de la retina. En cuanto al gen *Xaf1*, se ha asociado previamente a procesos apoptótico en la retina de ratones inyectados con beta amiloide 1-40 (A $\beta$  1-40), un componente que estimula las vías inflamatorias en RPE<sup>206</sup>. Este gen activa directamente la apoptosis dependiente de caspasas junto con *TNF- $\alpha$* <sup>207</sup>. A pesar de que uno de nuestros objetivos era el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas basadas en miRNAs, estos resultados podrían suponer una vía de investigación en un futuro como posibles dianas terapéuticas para la degeneración retiniana en la RP.

Con el fin de establecer una relación entre los miRNAs expresados diferencialmente (DE) y el proceso degenerativo retiniano, construimos redes de interacción miRNA-mRNA con el software CytoScape. Para ello utilizamos los datos de los miRNAs D.E. y sus mRNA diana predichos por miRWalk 2.0. Posteriormente filtramos estas redes de interacción incorporando los datos de nuestros arrays GeneChip 1.0 MTA (Affymetrix). Esta metodología nos permitió identificar mRNAs con expresión inversa con sus miRNA diana, los cuales podrían estar desempeñando un papel importante en la

degeneración de la retina (Figura 37). Se detectaron un total de 554 mRNAs inversamente expresados. A continuación estos genes se analizaron utilizando las bases de datos DAVID y WikiPathways de acceso libre, para adquirir conocimientos sobre su relevancia biológica y su posible participación en el proceso de degeneración de la retina.

Una de las rutas biológicas en las que nos centramos fue la respuesta inflamatoria; debido a que estudios previos han evidenciado que el proceso inflamatorio crónico sostenido puede contribuir a la etiología de la RP mediante la provocación final de la apoptosis de las células fotorreceptoras en ratones rd10 y en otros modelos animales de degeneración retiniana<sup>45,198,206,208</sup>. Además, estos estudios respaldan la idea de que los miRNAs aumentan rápidamente su expresión en respuesta a las señales inflamatorias y pueden regular la magnitud y la duración de la respuesta inflamatoria o silenciarla<sup>56</sup>. Ejemplo de algunos de los genes relacionados con la respuesta inflamatoria o inmune son: *Sema7a*, *Pan2*, *Pla2r1*, *Thbs1* o *Trim36*. Teniendo en cuenta que la desregulación de la homeostasis del calcio desempeña un papel clave en la degeneración de la retina en los ratones rd10, los genes asociados a las vías implicadas en la regulación, señalización y/o exocitosis de este catión también fueron seleccionados para su validación, como por ejemplo los genes *Doc2b* o *Pde6g*. También se seleccionaron los genes implicados en procesos fisiológicos o en la función normal de las células de la retina, como el transporte intraciliar (*Lca5*), la señal de fototransducción (*Rgr*) o el metabolismo del retinol (*Ttr*).

Curiosamente, entre los genes expresados inversamente, había genes previamente vinculados a trastornos de la retina. Por ejemplo los genes *Klhl23* y *Nr2e3*, que son los genes diana del miR-6240, y los cuales están relacionados con la distrofia cono-bastón<sup>209</sup> o con RP<sup>210</sup> respectivamente, y el gen *Rrg*, asociado con atrofia coriorretiniana y diana del miR-3473b<sup>211</sup>.

La desregulación de la expresión observada en genes implicados en rutas de inhibición de la apoptosis, regulación de la inflamación o del sistema inmune entre otras, podría dar explicación a los procesos degenerativos que sufren las retinas de los ratones rd10. Sobre todo los miRNAs del grupo-A con expresión diferencial previo al inicio de los procesos apoptóticos.

Como cabría esperar, la mayoría de los genes diana mostraron una modesta expresión diferencial en comparación con la expresión detectada en su miRNA asociado. Es decir, a pesar de que algunos miRNAs muestran valores de *fold-change* superiores a 5 o incluso 10, sus genes diana predichos mostraron cambios significativos pero algo más modestos, aproximadamente de 1.5 a 2, con la excepción de los genes *Serpina3n* o *Osmr*, los cuales mostraron unos valores de *fold-change* de 113, 7 y 7, respectivamente (Tabla 8). Esta diferencia en la magnitud de los niveles de expresión de miRNAs y sus genes diana podría ser una consecuencia de la compleja red de regulación. Relativamente pocos miRNAs pueden regular hasta el 50-60% de los genes, por lo tanto la divergencia de la acción de los miRNA es muy alta y un único miRNA tiene un efecto limitado y modesto en la regulación de la expresión de sus mRNA diana. Además, también debe considerarse que algunos de los miRNAs candidatos podrían estar inhibiendo la traducción de proteínas en lugar de degradar el mRNA. En tales casos, los niveles de mRNA no se verían afectados.

Teniendo en cuenta todas estas observaciones, para los estudios de expresión inversa, se estableció el valor de *fold-change* de 1.3 como punto de corte para los mRNAs (en comparación con 1.5 para los miRNAs) con el fin de reducir al mínimo el número de genes diana descartados y enriquecer así los estudios de interacción miRNA-mRNA. Esto tiene especial relevancia ya que, a pesar de que algunos genes mostraron diferencias significativas relativamente pequeñas en su expresión, éstos podrían ser de potencial interés en el contexto de los mecanismos moleculares subyacentes a RP y que con criterios de selección más restrictivos esta información relevante no sería detectada.

Cabe destacar que la mayoría de los genes con expresión inversa con respecto a los miRNAs del grupo-A (desregulado a P15) mostraron una expresión diferencial significativa a P17, pero no a P15. Estos datos podrían estar indicando un retraso relacionado con el tiempo que los miRNAs requieren para ejercer su efecto regulador en sus mRNA diana. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que ha descrito una interacción retardada entre los miRNAs expresados diferencialmente y sus mRNA diana predichos. Esta observación fue posible gracias al análisis del transcriptoma de las muestras de retina a P15 y a P17, lo que nos permitió identificar las relaciones de expresión inversa entre miRNAs D.E. y sus mRNAs diana en el mismo punto temporal y dos días después. En este sentido, consideramos que un tiempo de retraso de 2 días permite que un determinado miRNA ejerza su efecto regulador sobre sus mRNA diana.

Si hubiéramos estudiado los perfiles de expresión de miRNAs y mRNAs en los mismos puntos de tiempo, la identificación de esta interacción no hubiera sido posible.

Existen trabajos previos que demuestran la participación de los miRNAs en el desarrollo de la retina, en la función y en la supervivencia de los fotorreceptores<sup>155,156</sup> así como la participación de diferentes miRNAs en la patogénesis de diversas enfermedades de la retina incluyendo miR-9, miR-34a, 125b y miR-155 en la degeneración macular<sup>161,197</sup>, miR-146a y miR-195 en la retinopatía diabética<sup>163,164</sup> y miR-125b y miR-17 en retinoblastoma<sup>165,166</sup>. Curiosamente, algunos de los miRNAs diferencialmente expresados que hemos detectado justo después del inicio de la apoptosis, es decir, los miRNAs del grupo-B, son algunos de estos miRNAs previamente relacionados con enfermedades de la retina, como los miR-146a, miR-155, miR-29b y miR-17 (Tabla 5). De manera interesante, estos miRNAs han sido previamente relacionados con procesos tanto apoptóticos como inflamatorios (ver Tabla 8), dos procesos clave en los procesos degenerativos de la retina.

Recientemente se ha observado que el miR-146a-5p desempeña un papel importante en neuroinflamación y neurodegeneración mediante la supresión de la secreción de citoquinas proinflamatorias<sup>57,161,162,212-214</sup>, y en la apoptosis mediante la regulación de los genes *Bcl2l1* y *Bcl2l13*, conocidos por formar parte del proceso apoptótico<sup>215,216</sup>. En el caso del miR-155, este miRNA se ha asociado a la promoción de la inflamación en la fibrosis quística y la artritis reumatoide<sup>124,149,217</sup>, y a la regulación de la apoptosis mediante la regulación del gen *Bid*<sup>218</sup>. Por su parte, el miR-17 es un miembro del clúster miR-17-92, el cual está relacionado con diversas enfermedades inflamatorias mediante la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos inmunitarios relacionado con las células T<sup>219-220</sup>.

En lo que a retinosis pigmentaria respecta, Loscher y colaboradores detectaron una sobre-expresión del miR-1a, miR-133a y miR-142a en cuatro modelos diferentes de ratón de RP vinculados a los genes rodopsina y rds/periferina implicados en formas autosómicas dominante y recesiva de la enfermedad, respectivamente<sup>168,169</sup>. Nuestros resultados en ratones rd10 son consistentes con sus hallazgos, lo que refuerza nuestra hipótesis de que existen similitudes en el patrón de desregulación en la expresión de un grupo de miRNAs en diferentes tipos de RP, independientemente de la

naturaleza de su causa genética, lo que podría abrir el camino a estrategias terapéuticas comunes aplicables a diferentes tipos de RP.

Sin embargo, el papel que la regulación positiva de miR-1, solo o como parte del clúster miR-1/133a, pudiera estar jugando en el proceso apoptótico no está exento de controversia. Existen datos que sugieren efectos tanto anti como pro-apoptóticos sobre los miocardiocitos en condiciones isquémicas, mediante la regulación de los genes pro-apoptóticos *Casp9* y *Bcl2*<sup>221</sup> y los genes pro-supervivencia *Pkce*, *Hsp60* y *Igfl*<sup>222,223</sup>.

En cualquier caso, la expresión diferencial de miR-1a, miR-133a y miR-142 en nuestro estudio, así como en el trabajo de Loscher y colaboradores, se observa después de la aparición de la apoptosis. Esto podría estar reflejando una activación de mecanismos compensatorios en un intento de prevenir la muerte celular de los fotorreceptores en la retina distrófica. En apoyo a esto, Chung y colaboradores observaron como la ablación selectiva de células de Müller resultó en muerte de fotorreceptores, y una expresión alterada de miR-1a, miR-133a y miR-142<sup>57</sup>. Por lo tanto, el aumento observado en nuestros estudios en la expresión de miR-142a y en el cluster miR-1a/133a podría ser una consecuencia directa del proceso de muerte celular, y una característica común en las enfermedades que cursan con inflamación y apoptosis. Cabe señalar además, que entre los genes expresados de manera inversa a miR-142a, encontramos genes implicados en apoptosis (*Trp53bp2* y *Rraga*)<sup>224</sup>, y en respuestas inflamatorias (*Thbs1* y *Trim36*)<sup>225-226</sup>. Por lo tanto, el hecho de que la expresión de estos genes disminuya en las primeras etapas de la degeneración de la retina, puede estar indicando un intento de contrarrestar el proceso de muerte celular mediante el aumento de la expresión de miR-142a.

La expresión de tres miRNAs del grupo-B: miR-155-5p, miR-142a-5p y miR-146a-5p, se analizaron en un marco de tiempo más largo, incluyendo mediciones a P19 y P22. Se seleccionaron estos miRNAs por la magnitud de su expresión diferencial y/o por la posible relevancia de sus genes diana predichos en la enfermedad. Los resultados obtenidos reflejaron que la expresión de este grupo de miRNAs continuó aumentando a P19, alcanzando una meseta a P22, con valores de expresión similares a los observados a P19 para los miRs 155-5p y 146a-5p, y una marcada caída en los valores de F.C. desde 12 a 3 para el miR -142a-5p a P22 (Figura 35 y Tabla 5). Este patrón en los

niveles de expresión a P22 podría estar indicando un agotamiento de los mecanismos compensatorios debido a la pérdida irreversible de fotorreceptores.

Entre los restantes miRNAs del grupo-B, miR-7036b-3p, miR-7221-3p y miR-762, sólo este último miRNA ha sido previamente vinculado con alguna enfermedad, concretamente con la calcificación de las células del músculo liso vascular<sup>227</sup> y con el cáncer de mama<sup>228</sup>. En lo que a nuestros estudios se refiere, estos miRNAs muestran relaciones de expresión inversa con genes cuya infra-expresión podría estar involucrado en la fisiopatología de la degeneración de la retina (Tabla 8). Entre ellas destaca la relación inversa entre el miR-762 y el gen *Pde6g*. Como ya se ha comentado con anterioridad, la proteína Pde6g es un actor clave en la cascada de fototransducción. Por lo tanto, un aumento de los niveles de miR-762 podría estar contribuyendo a exacerbar la muerte de las células bastones en este ratón con mutaciones en la subunidad Pde6b.

Todas estas observaciones anteriormente señaladas como la desregulación posterior al comienzo de la apoptosis y la relación inversa en expresión con mRNAs asociados a rutas clave en los procesos degenerativos de la retina, podrían estar indicando una participación de los miRNAs del grupo-B en mecanismos compensatorios contra la muerte de las células fotorreceptoras o en una desregulación derivada de la muerte de los mismos fotorreceptores, y consideramos menos probable que contribuyan a la aparición de la enfermedad.

Por el contrario, los miRNAs del grupo-A mostraron expresión diferencial a P15, antes del inicio de la apoptosis. Este grupo de miRNAs podrían estar desempeñando papeles importantes en la etiología de la distrofia retiniana. Curiosamente, no hemos podido encontrar en la literatura ningún trabajo que relacione ninguno de los miRNAs incluidos en este grupo-A con ninguna enfermedad, incluyendo las de la retina, lo cual probablemente esté relacionado con lo novedoso de la mayoría de miRNAs incluidos en este grupo, de reciente descubrimiento, según se puede inferir por su nomenclatura con numeración elevada.

El grupo-A está compuesto por siete miRNAs: miR-6937-5p, miR-6240, miR-3473b, miR-6970-5p, miR-7035-5p, miR-7081-5p y miR-7115-5p. Notablemente, la sobreexpresión de todos estos miRNAs sigue aumentando a P17. Por ejemplo, el miR-

6937-5p mostró un aumento de su expresión de 2 veces a P15 en comparación con las muestras control, y un aumento de 10 veces a P17. La expresión del miR-6240-5p fue más de 22 veces mayor en las retinas rd10 comparado con las WT, siendo este el miRNA que mostró mayor expresión diferencial.

Siguiendo los mismos criterios de selección que los aplicados al grupo-B, se seleccionaron cuatro miRNAs, miR-6240, miR-6937-5p, miR-3473b y miR-7035-5p, para analizar sus niveles de expresión en un período de tiempo más extenso, hasta P22. Los niveles de expresión de estos miRNAs continuaban elevados a P19 con respecto a los controles, pero a P22 disminuyó su expresión a niveles comparables a los de las retinas WT (Figura 35 y Tabla 5). Este patrón de expresión podría estar indicando un nivel máximo de muerte celular de fotorreceptores, como se discutió previamente para los miRNAs del grupo-B.

Dado que la mayoría de los miRNAs que incluimos en el grupo-A son de reciente descubrimiento, existe poca información sobre su posible participación en diferentes rutas biológicas. Por lo tanto, nos basamos en los estudios de sus genes diana predichos como medio para establecer un posible vínculo entre su expresión diferencial y la muerte prematura de los fotorreceptores. Utilizando este enfoque, identificamos varios genes diferencialmente expresados involucrados en rutas clave en la supervivencia y/o muerte de los fotorreceptores. Entre ellos destacan genes como *Nxn12*, *Cngb1*, *Pde6g*, y *Rgr*, relacionados con la fototransducción, percepción visual o fisiología normal de la retina<sup>229,230,231-233</sup> y que son mRNA diana predichos del miR-6240, miR-7035-5p y miR-3473b respectivamente; el gen *Doc2b* asociado a la regulación del calcio intracelular<sup>234</sup> que es diana del miR-6937-5p; los genes *Peli3*, *Cryaa* y *Voppl* relacionados con procesos apoptótico<sup>235,236</sup> y que son diana del miR-6937-5p, miR-7115-5p, miR7035-5p y miR-3473b respectivamente; los genes *Sema7a* y *Traf7d1* asociados a inflamación<sup>237</sup> o el sistema inmunológico<sup>238</sup> y que son diana del miR-7035-5p y del miR-3473b, respectivamente; y genes previamente relacionados con la RP u otra enfermedades de la retina como *Nr2e3*, *Rs1*, *Lca5*, *Pde6g*<sup>231,21,239</sup> (Tabla 8).

Consideramos que todos los hallazgos anteriormente mencionados sobre los miRNAs del grupo-A, apoyan la idea de su probable implicación en la etiología de la distrofia retiniana. Entre estos hallazgos se incluyen: el papel relevante que sus genes diana pueden estar desempeñando en la salud o enfermedad de la retina; que estos miRNAs

sufren expresión diferencial antes del inicio de la apoptosis; y que el aumento sostenido de la expresión se mantiene al menos hasta P19.

Una de las conclusiones de los resultados obtenidos en el presente estudio es la confirmación del alto grado de complejidad involucrado en la regulación de la expresión génica. Por un lado, los miRNAs expresados diferencialmente regulan la expresión de múltiples genes implicados en vías comunes, tales como la apoptosis, la inflamación y el splicing del mRNA. Por otro lado hemos observado que diferentes miRNAs regulan la expresión de un mismo gen diana, como son los ejemplos de los genes *Pde6g* (diana del miR-7035-5p, miR-3473b y miR-762) y *Peli3* (diana del miR-6937-5p y miR-7115-5p), entre otros. Esto podría estar indicando una confluencia de efectos para generar complejas redes reguladoras de expresión génica que podrían estar operando en consonancia para inducir estados de enfermedad o todo lo contrario, para activar respuestas compensatorias para prevenir la muerte de las células retinianas.

En los últimos años se han logrado grandes avances en la elucidación del mecanismo de regulación del mRNA mediada por miRNA. Aunque inicialmente la visión tradicional determinaba que los miRNAs actuaban principalmente en la traducción a proteínas sin provocar degradación de los mRNA, a día de hoy se ha demostrado que se producen tanto la degradación del mRNA como la represión de la traducción. Sin embargo, el alcance y la frecuencia de estos dos mecanismos aún no se ha determinado<sup>240,241</sup>. En este sentido, una de las limitaciones de nuestros estudios radica en que están centrados únicamente en la observación de los niveles de expresión de los mRNA, por lo que parte importante de los efectos ocasionados por la expresión diferencial de los miRNA a nivel de inhibición de la traducción en los ratones rd10 no se ha determinado en el presente trabajo. De esta manera, nuestros próximos estudios deberían centrarse en el análisis de la expresión proteica para comprender mejor los efectos de la desregulación de los miRNAs.

Otra de las limitaciones de nuestros estudios es la presencia de resultados falsos positivos y falsos negativos en los estudios de predicción de los mRNA diana. Como comentamos anteriormente, el genoma humano codifica más de 2.000 miRNAs humanos, que potencialmente pueden regular aproximadamente el 60% de los genes<sup>138</sup>. Dado que no es posible realizar experimentos biológicos para dilucidar un número tan

grande de interacciones miRNA-mRNA, se han desarrollado diferentes algoritmos de predicción computacional, los cuales son ampliamente utilizados en la práctica experimental. Estas herramientas computacionales se basan no solo en la complementariedad de secuencias, sino en la termodinámica, potenciales de energía, accesibilidad a los lugares diana y la conservación; escaneando esencialmente todo el transcriptoma para predecir un conjunto de mRNAs diana para cada miRNA<sup>242</sup>. Sin embargo, al ser de naturaleza predictiva, inherentemente contienen un alto grado de incertidumbre. Además todas estas herramientas tiene la limitación de no considerar que la relación entre el miRNA y los genes diana es dinámica en diferentes condiciones, es decir, el mismo miRNA podría tener diferentes conjuntos de genes dianas y así, funciones diferentes cuando se expresan en diferentes tipos de células. Por lo tanto, estos métodos computacionales producen muchos falsos positivos, incluso si la información del mRNA diana es precisa<sup>243</sup>. Con el objetivo de controlar los falsos positivos, típicamente estas herramientas computacionales establecen un valor de corte estricto, pero en este caso, estos métodos provocan el descarte de muchas relaciones mRNA-miRNA verdaderos, es decir, falsos negativos.

Esto supone que la expresión inversa de un mRNA diana predicho con su miRNA no sea prueba de la existencia de una regulación miRNA-mRNA. Por lo tanto, esta posible interacción necesita ser validada en estudios posteriores, como por ejemplo estudios de luciferasa o ensayos de EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*).

Finalmente, gracias a los avances realizados por otros autores que han utilizado con éxito la tecnología de interferencia de RNA para la modulación *in vitro* e *in vivo* de la expresión de los miRNAs<sup>160,244</sup>, se puede especular que la modulación de los miRNAs diferencialmente expresados en este estudio podría potencialmente constituir la base de un nuevo enfoque para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas a frenar la progresión de la RP en los ratones rd10.

- ***La modulación in vivo del miR-6937-5p logra ralentizar significativamente el deterioro visual y la degeneración de los fotorreceptores en el ratón rd10.***

Otro de los objetivos principales de la tesis doctoral consistía en realizar modulación *in vivo* de miRNAs en ratones rd10 y en la evaluación funcional e histológica de dicha modulación. Los registros electroretinográficos (ERGs) y los estudios histológicos

*post-mortem* indican que la inhibición *in vivo* del miR-6937-5p ralentiza significativamente el deterioro visual y la degeneración de los fotorreceptores en el raton rd10.

El primer paso fue la selección de los miRNA candidatos para ser modulados. Para ello, todos los datos obtenidos en los estudios de expresión de miRNAs y de las rutas biológicas relacionadas con los genes inversamente expresados, fueron considerados y valorados. Entre los miRNAs con alteración en su expresión, consideramos el miRNA-6240, el miRNA-6937-5p y el miR-142a-5p como los mejores candidatos a ser modulados. Los criterios a la hora de realizar esta selección inicial se centraron en la posible vinculación en los procesos degenerativos de la retina de sus mRNA diana con relación inversa en su expresión, así como en los valores de *fold-change* elevados y mantenidos en el tiempo en el caso de los dos primeros miRNAs y en su vinculación en estudios previos a procesos degenerativos de la retina en el caso del miR-142a-5p.

Adquirimos los plásmidos miArrest™ miRNA Inhibitors y miExpress™ Precursor miRNA Expression de la casa comercial GeneCopoeia. A partir de estos plásmidos se generaron virus adeno-asociados (AAVs) con secuencias moduladoras de miRNAs. Escogimos este vector para la transferencia de material genético debido a diferentes características que hacen de éste un vehículo adecuado para nuestro estudio; su falta de patogenicidad, su capacidad de infectar muchos tipos de células a un ritmo eficiente y a que permiten una expresión transgénica estable a largo plazo<sup>92</sup>. A su vez, apenas genera respuesta inmune, aunque en algunos casos se puede producir una inflamación leve en los sitios de inyección debido a una respuesta inmune humoral y celular innata en respuesta a los AAV<sup>245</sup>.

Los AAVs fueron generados en colaboración con el laboratorio de terapia génica del CIMA (Pamplona, Navarra) dirigido por la Dra. Gloria González Aseguiolaza. Se escogió la cápside viral serotipo KAnc80 para generar nuestros AAVs moduladores de miRNAs. Este serotipo es un antecesor de los serotipos de cápside de AAV ampliamente estudiados 1, 2, 8 y 9 el cual ha demostrado ser un potente vector de terapia génica *in vivo* con capacidad para dirigirse e infectar eficazmente hígado, músculo y retina<sup>246</sup>. Esta cápside se ha generado artificialmente utilizando métodos de reconstrucción de secuencia ancestral (ASR) para predecir la secuencia de aminoácidos

de los monómeros de la cápside de AAV ancestrales usando el métodos de máxima verosimilitud (ML)<sup>247</sup>.

Las células diana de este estudio de modulación fueron las células fotorreceptoras. Además de ser las células que sufren degeneración, en ellas detectamos mayor expresión de los miRNAs a modular en comparación con el resto celular de la retina (Figura 36). La técnica escogida para la administración de los AAVs fue la sub-retiniana (SR). Esta técnica nos permite la administración directa de la solución en el espacio entre la retina y el RPE (Figura 25), lugar en donde se encuentran las células fotorreceptoras, acortando así el tiempo necesario para la infección de las células diana del estudio<sup>248</sup>. Se ha observado en estudios previos como la inyección de AAVs mediante inyecciones SR lograba infectar de manera eficaz células fotorreceptoras exhibiendo expresión del transgén a partir del día 3 post-inyección (pi 3), con aumentos progresivos de expresión a los días pi 5 y pi 7<sup>249</sup>. Con otras técnicas de administración como la intra-vítrea (IV) se necesitan hasta 3-4 semanas pi para empezar a observar expresión del transgén<sup>250-252</sup>, haciéndolo ineficaz para el tratamiento de enfermedades degenerativas rápidas. Esta rápida expresión del transgén con las inyecciones SR es de vital importancia en nuestro caso, ya que utilizamos un modelo animal de RP el cual, a pesar de tener una progresión de la enfermedad más lenta en comparación con otros modelos, para el día P30 la práctica totalidad de los bastones han muerto. No obstante, esta técnica tiene ciertas desventajas en comparación con la IV, incluyendo su complejidad técnica, una elevada tasa de fracaso, una menor reproducibilidad, además de producir lesión e inflamación post-inyección ya que atraviesa todo el grosor de la retina<sup>43,253</sup>. En la Tabla 11 se resumen las ventajas y desventajas de ambas técnicas para la infección de las células fotorreceptores de la retina y/o RPE, importantes a la hora de una buena elección de la técnica a utilizar en cada proyecto de investigación.

	<b>Sub-retinal (SR)</b>	<b>Intravítrea (IV)</b>
<b>Ventajas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mayor eficiencia de transducción</li> <li>- Inicio más rápido de expresión</li> <li>- Directamente en las células diana</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Técnica más sencilla y reproducible</li> <li>- Ausencia de lesión post-inyección en retina</li> <li>- Difusión homogénea del vector</li> </ul>
<b>Desventajas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Técnica más complicada</li> <li>- Lesión post-inyección de la retina</li> <li>- Difusión menos homogénea del vector</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inicio de la expresión más tardía</li> <li>- Mayor probabilidad de expresión inespecífica</li> </ul>

**Tabla 11.** Resumen de las ventajas y desventajas de las técnicas de inyección sub-retinianas (SR) e intra-vítreas (IV) a la hora de infectar las células fotorreceptoras de la retina y/o RPE.

Antes de realizar las inyecciones SR de AAVs-moduladores de miRNAs en los ratones rd10, verificamos que los ssAAV-KAnc80 generados tienen la capacidad para infectar de manera eficaz y selectiva las células fotorreceptoras de la retina. Los cortes histológicos y los *whole-mounts* realizados a partir de los ojos de ratones WT a los que se les realizó inyección SR, revelaron que áreas extensas de las retinas expresaban fluorescencia, mCherry en el caso de los inhibidores y eGFP en el de los precursores, y que dicha fluorescencia estaba restringida a la capa nuclear externa de la retina (Figura 41 y Figura 42). No obstante, observamos diferencias en la capacidad de infección entre los ssAAV-KAnc80-inhibidores y precursores de miRNA. Mientras que los AAVs inhibidores de miRNA logran infectar de media un 50-60% del área total de la retina, los AAVs precursores de miRNA solamente llegan a infectar aproximadamente el 20-30%. Esta diferencia en la capacidad de infección creemos no ha sido debido a diferencias a la hora de ejecutar las inyecciones, ya que aunque una de las desventajas de las inyecciones SR sea la teórica baja reproducibilidad, consideramos que cuatro muestras por cada ssAAV-KAnc80 diferente debería ser suficientes para minimizar ese sesgo. Creemos más plausible que puede ser debida a diferencias en el diseño de los plásmidos inhibidores y precursores de miRNAs: tamaño, número y localización de promotores o tipo de vector, entre otros (Tabla 2 y Figura 19), que condicionen la capacidad infectiva de cada grupo de AAVs. Por ello, es necesario tener en consideración estas observaciones a la hora de interpretar más adelante los resultados funcionales de la modulación *in vivo* de los ratones rd10 tratados con solución precursora del miR-142a.

A continuación, los ssAAV-KAnc80 moduladores de miRNAs fueron administrados mediante inyecciones SR en los ojos de los ratones rd10 a P10, 6 días antes al comienzo de la muerte de las células fotorreceptoras. Se utilizó en todos los casos el ojo contralateral de cada ratón para la inyección de la solución ssAAV-KAnc80-*scramble* (control). De esta manera, el posible sesgo derivado de las diferencias interindividuales se vería reducido. La capacidad visual de los ratones fue medida mediante registros electroretinográficos (ERGs), siendo ésta la técnica de referencia para su determinación *in vivo* en animales de experimentación<sup>43,254,255</sup>. Es una herramienta clínica no invasiva, muy útil para controlar la gravedad y la progresión de la degeneración retiniana tanto en humanos como en animales de experimentación como ratas y ratones<sup>256</sup>. Los análisis

electrorretinográficos (ERG) se realizaron a P17 y P22, tiempo que consideramos suficiente para que las células fotorreceptoras fueran infectadas por los ssAAV-KAnc80 y expresados los transgenes.

Los resultados obtenidos indican que la inhibición del miR-6937-5p ralentiza el deterioro visual de los ratones rd10 reflejada por la diferencia significativa en la onda b-mixta en condiciones escotópicas (Figura 44). Este resultado se repitió en los ERGs tanto a P17 como a P22. Por el contrario, los demás parámetros registrados en los ERGs no mostraron diferencias significativas entre los dos tratamientos. Una explicación a estos resultados es que el efecto beneficioso provocado por la inhibición de este miRNA se centra en la preservación de las sinapsis funcionales entre las células fotorreceptoras y las células postsinápticas, en este caso las bipolares, aumentando así la respuesta *b mixed*. Esta hipótesis podría confirmarse mediante estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos específicos para proteínas presentes en las conexiones sinápticas, como las mGlu6, Bassoon y PSD95<sup>43,257,258</sup>. Es interesante el hecho de que no se detectaran diferencias significativas en la respuesta *b scotopic*, a pesar de que sí parece tener una tendencia hacia una respuesta mayor a P17 ( $p=0.14$ ). La diferencia observada en el efecto de la modulación del miR-6937-5p sobre las ondas *b scotopic* y *b mixed* podría ser debido a la diferencia en la intensidad lumínica ejercida y en consecuencia del número de bastones que responden a la misma. El número limitado de bastones que responden en el registro de la onda *b scotopic* podría no ser suficiente para detectar diferencias significativas, mientras que en la *b mixed* la estimulación de un mayor número de células permitiría detectar el efecto del tratamiento.

En cuanto a los ojos tratados con moduladores de los miR-142a-5p y miR-6240 en comparación con los ojos *scramble*, no detectamos diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados (Figura 45 y Figura 46). No obstante, podemos observar como a P17 en la onda b-mixta, hay diferencias, aunque no llegan a ser significativas, entre los *scramble* y los tratamientos tanto con miR-142a-5p como con miR-6240 (valor-p 0.199 y 0.187, respectivamente), pero que a P22 esa diferencia no se mantiene. Este resultado podría estar indicando que los tratamientos con los moduladores de miRNAs logran mejorar parcialmente la capacidad visual de los ojos durante un periodo limitado de tiempo y que ese efecto beneficioso no tiene continuidad en el tiempo. Por el contrario, como ya he comentado anteriormente, esto no sucede con los ojos tratados con el inhibidor del miR-6937-5p. La diferencia además de ser estadísticamente

significativa, la detectamos tanto a P17 como a P22, lo cual indicaría que el efecto beneficioso que ejerce la modulación del miR-6937-5p comienza en las primeras etapas del deterioro retiniano y que se mantiene en el tiempo incluso en el pico de muerte celular, ente P20 y P25. Este resultado tiene gran relevancia en nuestro caso ya que nuestra estrategia terapéutica está dirigida a una enfermedad en la cual el defecto genético subyacente se mantiene en el tiempo y que por lo tanto requiere que el efecto de la terapia sea duradero y seguro evitando así su aplicación de manera continuada y repetida.

Cabe destacar que observamos elevada variabilidad intragrupal en los diferentes parámetros de los ERGs y en los tres diferentes tratamientos. Esto pudo suponer que en casos en los que la comparación entre tratamientos y *scramble* mostraban cierta diferencia, fácilmente observables en las gráficas (Figura 44, Figura 45 y Figura 46), éstas no fueran estadísticamente significativas. Dicha variabilidad en las respuestas, tanto en los ojos tratados con moduladores de miRNAs como en los *scramble*, puede ser debido a diferencias en la eficacia o el área de infección lograda en las retinas, o por diferencias en el daño producido en las retinas debido a las inyecciones sub-retinianas. Al realizar inyecciones SR, además de producirse cierta inflamación<sup>43,253</sup>, se genera un desprendimiento de retina transitorio que se resuelve por sí sólo, pero que se ha descrito puede afectar los resultados de los registros electroretinográficos<sup>257</sup>. Aun así, teniendo en cuenta que realizamos comparaciones con 15 muestras por cada grupo, consideramos que aunque exista esta variabilidad, la potencia estadística alcanzada es suficiente para dar por válida la significancia obtenida en los valores de la onda b-mixta en los ratones con inhibición del miR-6937-5p.

Los resultados positivos en los registros de los ERG de los tratamientos con el inhibidor del miR-6937-5p, fueron acompañados posteriormente por resultados también significativos en los estudios histológicos *post-mortem*. Se observó una mayor preservación en el número de fotorreceptores. Medimos el grosor y el número de filas de células fotorreceptoras en el ONL, y ambas medidas mostraron una mejora significativa en los ojos tratados con los inhibidores del miR-6937-5p en comparación con los ojos *scramble* o control (Tabla 9, Figura 47 y Figura 48). El tratamiento logra enlentecer el ritmo de degeneración de las células fotorreceptoras en un 28,91% si lo medimos en relación el número de filas de células fotorreceptoras y en un 36,42% en relación al grosor del ONL. Estos resultados indicarían la capacidad de preservación

que el tratamiento con inhibidores del miR-6937-5p tiene sobre los fotorreceptores. Esta observación apoya los resultados de una mejora de la capacidad visual de los ratones detectada mediante los ERGs.

Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición del miR-6937-5p podría considerarse una opción terapéutica de interés para la retinosis pigmentaria ya que logra ralentizar significativamente el deterioro visual y la degeneración de los fotorreceptores en un modelo animal de la enfermedad. Así mismo, la modulación de este miRNA podría ser aplicado en combinación con otras estrategias terapéuticas como la terapia génica, celular o con moléculas anti-apoptóticas, ya que este tratamiento lograría aumentar la ventana terapéutica para que dichos tratamientos tuvieran más tiempo para ejercer su efecto, mejorando así su efectividad.

Por el contrario, al igual que en los ERGs, no observamos en los ojos tratados con moduladores del miR-6240 y miR-142a-5p diferencias significativas en el grosor y en el número de filas de fotorreceptores en el ONL en comparación con sus respectivos ojos *scramble* (Figura 49).

Estos estudios histológicos sirvieron también para ratificar una infección selectiva de los fotorreceptores en los ojos tratados con ss-AAV-KAnc80, ya que solamente se detectó fluorescencia, emitida por las proteínas mCherry o eGFP, en la ONL (Figura 50). Este hecho apoya los resultados obtenidos en los ERGs.

Debemos tener en cuenta que los resultados negativos obtenidos con el tratamiento con ssAAV-KAnc80-precursor-miR-142a-5p tanto en los ERGs como en los estudios histológicos tal vez sean debidos a la baja tasa de infección de las células fotorreceptoras cuando son tratadas con este vector viral. Por lo tanto, no podemos descartar que mayores eficacias pudieran producir mejoras significativas en la capacidad visual y en la preservación de las células fotorreceptoras de la retina tras aumentar la expresión de este miRNA. Además estudios recientes han observado como el eGFP puede ser citotóxico<sup>259</sup>. En consecuencia, si el tratamiento con moduladores del miR-142a tuviera la capacidad de producir un efecto beneficioso para enlentecer el desarrollo de la enfermedad, tal vez la citotoxicidad del eGFP provocaría que tal efecto no fuera detectado. Para verificar estas hipótesis, deberían realizarse nuevos estudios con AAVs que tengan otro gen reportero diferente al eGFP y que muestren mayor

capacidad de infección que los ssAAV-KAnc80-precursor-miR-142a-5p utilizados en la presente tesis.

De manera similar, consideramos que tampoco podemos descartar al miR-6240 como posible diana terapéutica para la RP. El principal factor limitante en los estudios de inhibición genética es la falta de efecto fenotípico. La redundancia en la función de los miRNAs junto con mecanismos de compensación para suplir el efecto del miRNA en el tejido diana podría dificultar la elucidación de las consecuencias funcionales del miRNA inhibido.

En este sentido, aunque la inhibición de la expresión de estos dos miRNAs por sí sola no haya sido capaz de ralentizar el progreso de la enfermedad, terapias combinadas en las que además de este miRNA se module la expresión de otro/s miRNA candidatos, tal vez sí sean capaces de lograr una mejora significativa en la capacidad visual de los ratones. Estas modulaciones conjuntas puede que consigan que los miRNAs actúen conjuntamente en diferentes aspectos biológicos de la muerte celular y que esa sinergia consiga frenar o por lo menos enlentecer de manera más contundente el desarrollo de la enfermedad. Es interesante que Xiang y colaboradores observaron como la inhibición de un solo miRNA del *cluster* miR183/96/182 no era capaz por si solo de generar daño en la retina, pero la inhibición conjunta de dos de los miRNAs componentes de este *cluster* fue capaz de generar degeneración en la retina de los ratones<sup>160</sup>.

Una de las principales ventajas de las terapias basadas en la modulación de secuencias genéticas de pequeño tamaño como los miRNAs frente a la terapia de restitución génica, consiste en que los vectores virales como los AAVs tienen la capacidad para poder albergar plásmidos con secuencias moduladoras de múltiples miRNAs, y por lo tanto modular de manera simultánea la expresión de uno o más miRNAs. Ya se han realizado estudios en los que se conseguía modular con éxito la expresión de más de un miRNA en paralelo<sup>160,244</sup>, lo cual abre el camino hacia terapias combinatorias de modulación de miRNAs. En este sentido, otros miRNAs diferencialmente expresados en nuestros estudios y que fueron en un primer momento descartados para ser modulados en este proyecto de tesis doctoral, podrían ser buenos candidatos para ser modulados individualmente o junto con otros miRNAs, entre ellos los miR-142a-5p y miR-6240. Entre estos miRNAs “rescatables”, destacan los miR-146a-5p y miR-3473b, por la posible implicación en los procesos degenerativos de la retina de sus mRNA diana, así

como en los valores de *fold-change* elevados y mantenidos en el tiempo y por su vinculación a procesos degenerativos en estudios previos en el caso del miR-146a-5p.

Revelado el efecto beneficioso de la inhibición del miR-6937-5p en la supervivencia de los fotorreceptores y en la capacidad visual de los ratones rd10, quisimos identificar los genes y vías biológicas posiblemente involucradas en este efecto, e indirectamente validar los resultados previos de expresión inversa de los mRNA diana del miR-6937-5p predichos *in silico*. Para ello realizamos nuevas inyecciones sub-retinianas a ratones rd10 a P10 y obtuvimos las retinas a P22. El transcriptoma completo fue analizado mediante los arrays Clariom™ S de Affymetrix. Además de retinas de ratones tratados con AAVs inhibidores del miR-6937-5p y con AAVs inhibidor *scramble*, obtuvimos muestras de retinas a las que no se les aplicó ningún tratamiento ni se les realizó inyección SR alguna. Esta estrategia nos permitió identificar aquellos mRNA alterados exclusivamente por el efecto de la modulación del miRNA, descartando aquellos mRNAs con alteración diferencial debido a los efectos de la inyección SR o a la respuesta inmune provocada por la infección con AAVs. Identificamos un total de 101 mRNAs diferencialmente expresados (Tabla 10). Entre éstos destacan genes sobre-expresados con posible implicación en la mejora funcional de los fotorreceptores, como genes relacionados con procesos anti-apoptóticos –*Bcl2ald*, *Mapk1*, *Itch*, *Arell*<sup>260–263</sup>, reguladores del sistema inmune – *Angptl1*, *Trim21*<sup>264–266</sup>-, de procesos inflamatorios – *Jak3*<sup>267</sup> - y relacionados con procesos fisiológicos de la retina – *Cryba1*, *Gucy2f*, *Crygc*<sup>204,268,269</sup> -. Otros mRNA D.E. destacados fueron los relacionados con la homeostasis o regulación del calcio - *Atp2c1*, *Cpne8*, *Cldn5*, *Ramp3* -, con la regulación de la transcripción - *Atxn2l*, *Tle2*, *Rps6ka5* -, o con el transporte intracelular - *Klc1*, *Slc6a9*, *Cog2* - entre otros.

No obstante, en la lista de 101 mRNAs D.E. nos encontramos también con mRNAs con expresión aumentada que según las bases de datos deberían tener efectos negativos en la supervivencia celular, como el gen *Jmy*, que actúa como pro-apoptótico siendo cofactor del p53/TP53 nuclear y aumentando la transcripción y la apoptosis dependientes de p53/TP53<sup>270</sup>. Otro ejemplo sería el gene *Tm2d1* el cual se ha visto puede participar en la apoptosis inducida por beta-amiloide a través de su interacción con beta-APP42<sup>271</sup>.

Sorprendentemente, solamente 3 de esta lista de 101 mRNAs D.E., los genes *Angptl1*, *Bcl2a1d* y *Exosc6*, son mRNA dianas predichas para el miR-6937-5p. Esto podría indicarnos o bien que los algoritmos computacionales generan muchos falsos negativos, o bien que existen mecanismos moleculares compensatorios que revierten en cierta manera la regulación ejercida por el miR-6937-5p sobre algunos mRNAs y que por lo tanto no se detectan alteraciones significativas en su expresión.

De todos modos, los tres genes hipotéticamente regulados por el miR-6937-5p están asociados a rutas biológicas relevantes en la degeneración retiniana y que por lo tanto pueden estar jugando un papel esencial en los mecanismos por los que la regulación de la expresión del miRNA genera una mejora en la capacidad visual de los ratones rd10.

El gen *Angptl1* está asociado a la ruta de señalización *Akt* la cual promueve la supervivencia y el crecimiento celular en respuesta a estímulos extracelulares<sup>264</sup>. Además, se ha descrito actúa en la regulación negativa de la secreción de citocinas involucrada en la respuesta inmune mediante la inhibición de la activación inducida por lipopolisacáridos de las células macrófagas<sup>265</sup>. No obstante, este gen también se ha asociado a la promoción de la apoptosis mediante la inhibición de la vía anti-apoptótica STAT3/Bcl-2<sup>272</sup>. Por lo tanto, no podemos afirmar que la sobre-expresión del gen *Angptl1* conlleve un beneficio para la supervivencia celular en las retina de los ratones.

Los genes *Bcl2a1d* y *Exosc6* están asociados a la regulación negativa de los procesos apoptóticos. El gen *Bcl2a1d* codifica un miembro de la familia de las proteínas BCL-2, las cuales actúan como reguladores antiapoptóticos y proapoptóticos celulares. En el caso de las proteínas de la subfamilia A1, se ha descrito que retardan la apoptosis mediante la privación de IL-3<sup>260,273</sup>. El gen *Exosc6* codifica para una proteína que constituye una de las subunidades de los exosomas, que median la degradación del mRNA. Según la base de datos WikiPathways este gen está asociado a la regulación negativa del proceso apoptótico de las neuronas. Aun así serían necesarios experimentos adicionales, como ensayo de Luciferasa, para verificar la directa interacción entre miR-6937-5p y estos tres mRNAs.

Por otra parte, la sobre-expresión observada en los restantes 98 mRNAs (no dianas predichas para el miR-6937-5p) podría explicarse mediante la existencia de mecanismos de regulación génica indirecta, es decir, la inhibición en la expresión del miR-6937-5p

ocasionaría una alteración sutil de la expresión de genes intermediarios lo que provocaría el posterior aumento significativo de la expresión de mRNA secundarios.

Realizamos seguimiento de los mRNAs que en los estudios anteriores (redes de interacción miRNA-mRNA en muestras de ratones rd10) revelaron relación inversa de expresión con el miR-6937-5p, los genes *Doc2b*, *Lca5* y *Peli3* (Tabla 8). Cabe destacar que ninguno de estos genes mostró diferencias significativas entre las retinas tratadas con inhibidores del miR-6937-5p y aquellas tratadas con secuencias *scramble*.

Para poder explicar la falta de conciliación entre los datos de estos 3 genes obtenidos en los estudios previos y en los de expresión tras la inyección del inhibidor del miR-6937-5p, la opción más obvia es que estos 3 mRNA no sean dianas para el miR-6937-5p. Es decir que es posible que los distintos *softwares* predictores de la interacción miR-mRNA, estén ofreciendo falsos positivos.

Otra opción sería que en los estudios anteriores del transcriptoma completo de los ratones rd10, además del miR-6937-5p estos ratones tienen alteración en la expresión de otros miRNAs que podrían haber provocado la desregulación de estos mRNAs mediante interacción directa o indirecta. Tal vez la modulación de la expresión del miR-6937-5p no sea suficiente para producir una alteración significativa en la expresión de estos mRNAs, requiriéndose la participación de diferentes miRNAs para conseguirlo.

En resumen, en los estudios del transcriptoma de los ratones tratados con moduladores del miR-6937-5p hemos encontrado diferentes mRNA y rutas biológicas que en conjunto podrían estar relacionadas con el rescate de la función visual y con la ralentización de la degeneración de los fotorreceptores en los ratones rd10. Sin embargo se requieren más experimentos para determinar por qué vías se establece la conexión específica entre esos dos eventos.

- ***La sobre-expresión del miR-6937-5p in vitro aumenta significativamente la citotoxicidad de las células MU-PH1***

Aumentamos la expresión del miR-6937-5p *in vitro* en la línea celular MU-PH1 mediante el sistema miRIDIAN microRNA mimics con el objetivo de simular la sobre-

expresión detectada de este miRNA en los ratones rd10 y analizar así los efectos producidos por esta modulación en la viabilidad celular.

Probamos diferentes metodologías para inducir sobre-expresión del miR-6937-5p en la línea celular MU-PH1. Esta línea celular es derivada del cultivo de células de Müller de retinas de ratones adultos, que expresa de forma estable marcadores de fotorreceptor, así como de célula glial y de células madre<sup>196</sup>, lo que confiere a esta línea celular un gran interés como modelo de células fotorreceptoras y como base para el desarrollo de estrategias de regeneración de la retina.

Entre todas las metodologías testadas, dos de infección – lentivirus y virus adeno-asociados – y otras dos de transfección – de plásmidos y de molécula miRIDIAN mediante agente de transfección –, con la que mayor expresión del transgén se obtuvo fue con la transfección mediante el sistema miRIDIAN de Dharmacon (Figura 52, Figura 53 y Figura 54).

Por lo tanto, nos servimos de este sistema para aumentar la expresión del miR-6937-5p. Dicha sobre-expresión, de cerca de 250 veces según estudios previos con qPCR, provocó un aumento significativo de la citotoxicidad en las células MU-PH1 en comparación con muestras control (Figura 55). De esta manera, verificamos que la expresión aumentada de este miRNA tiene un efecto perjudicial en las células con características de fotorreceptores, pudiendo así testar la hipótesis de la implicación de la sobreexpresión del miR-6937 en la muerte de las células fotorreceptoras de las retina en los ratones rd10.

En su conjunto, esta tesis doctoral contribuye a ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares subyacentes al establecimiento y desarrollo de la retinitis pigmentosa aportando nuevas dianas terapéuticas para su tratamiento. Además, hemos logrado ralentizar el proceso de pérdida de fotorreceptores en un modelo murino de la enfermedad mediante la inhibición del miR-6937-5p. Estos resultados podrían sentar las bases para el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la expresión de los microRNAs en el futuro.

*CONCLUSIONES*



## **CONCLUSIONES**

1. La muerte de las células fotorreceptoras de las retinas de los ratones rd10, modelo murino de la retinosis pigmentaria, comienza el día postnatal 16 (P16) en la zona central de la retina y avanza hacia la periferia.
2. Hemos identificado 19 miRNAs diferencialmente expresados y 39 mRNA diana expresados de forma inversa que pueden estar desempeñando un papel clave durante la degeneración retiniana o estar participando en mecanismos compensatorios.
3. El nivel de expresión de un grupo de 7 miRNAs diferencialmente expresados se ve aumentado al menos hasta el día P22, 6 días después del comienzo de la apoptosis, mostrando un nivel máximo de expresión en el día P19. A su vez, el nivel de expresión de este grupo de miRNAs es mayor en células fotorreceptoras que en el resto celular de la retina.
4. Los ssAAV-KAnc80 con plásmidos moduladores de miRNAs han sido capaces de infectar de manera selectiva las células fotorreceptoras. No obstante hemos observado mayor capacidad de infección en los ssAAV-KAnc80 inhibidores que en los precursores de miRNA.
5. El tratamiento con solución inhibidora del miR-6937-5p ralentiza significativamente el deterioro visual de los ratones rd10. Los ratones con el tratamiento mostraron mejoras significativas en la onda *b-mixta* de los registros electroretinográficos.
6. La inhibición *in vivo* de la expresión del miR-6937-5p logra una mayor preservación en el número de fotorreceptores en comparación con los ojos control, un 28,91% si lo medimos en relación al número de filas de células fotorreceptoras y un 36,42% en relación al grosor del ONL.
7. La inhibición *in vivo* del miR-6937-5p en ratones rd10 modula la expresión de 101 genes, entre los que se encuentran genes relacionados con rutas que podrían estar jugando un papel importante en el rescate funcional detectado mediante los ERGs.
8. El tratamiento con solución inhibidora miR-6240 no mostró ningún efecto sobre los parámetros visuales ni histológicos analizados en los ratones rd10.
9. La baja eficiencia en la infección del precursor del miR-142a-5p no nos permite establecer conclusiones sobre los parámetros visuales ni histológicos analizados.

10. El sistema miRIDIAN microRNA Mimic consigue transfectar la línea celular MU-PH1 con la mayor eficiencia entre todos los sistemas testados.
11. El aumento *in vitro* de la expresión del miR-6937-5p en la línea celular MU-PH1 aumenta significativamente la citotoxicidad celular.

## **REFERENCIAS**



## **REFERENCIAS**

1. Ramón y Cajal, S. *Manual de Histología Normal y Técnica Micrográfica*. (1889).
2. Goldman, D. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 431–442 (2014).
3. Ortín-Martínez, A. *et al.* Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: Differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain. *PLoS One* **9**, 1–12 (2014).
4. Yau, K.-W. & Hardie, R. C. Phototransduction Motifs and Variations. *Cell* **139**, 246–264 (2009).
5. Sung, C. H. & Chuang, J. Z. The cell biology of vision. *J. Cell Biol.* **190**, 953–963 (2010).
6. Bringmann, A. *et al.* Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **25**, 397–424 (2006).
7. Strauss, O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol. Rev.* **85**, 845–881 (2005).
8. Ebrey, T. & Koutalos, Y. Vertebrate photoreceptors. *Prog Retin Eye Res* **20**, 49–94 (2001).
9. Tomoki Isayama<sup>1</sup>, Anita L. Zimmerman<sup>2</sup>, C. L. M. The Molecular Design of Visual Transduction. *Biophysics (Oxf)*. 1–17 (2006).
10. Gaillard, F. & Sauv e, Y. Cell-based therapy for retina degeneration: The promise of a cure. *Vision Res.* **47**, 2815–2824 (2007).
11. Daiger, S. P. Identifying retinal disease genes: how far have we come, how far do we have to go? *Novartis Found. Symp.* **255**, 17-27-36, 177–8 (2004).
12. Rundquist, J. Low Vision Rehabilitation of Retinitis Pigmentosa. *Low Vis. Rehabil. Retin. Pigment. - Pract. Reports* **98**, 718–724 (2004).
13. Hamel, C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J. Rare Dis.* **1**, 1–12 (2006).
14. Chang, S., Vaccarella, L., Olatunji, S., Cebulla, C. & Christoforidis, J. Diagnostic Challenges in Retinitis Pigmentosa: Genotypic Multiplicity and Phenotypic Variability. *Curr. Genomics* **12**, 267–275 (2011).
15. Petrs-Silva, H. & Linden, R. Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. *Clin. Ophthalmol.* **8**, 127–136 (2013).
16. Anasagasti, A. *et al.* Genetic high throughput screening in Retinitis Pigmentosa based on high resolution melting (HRM) analysis. *Exp. Eye Res.* **116**, (2013).
17. Rivas, M. & Vecino, E. Animal models and different therapies for treatment of retinitis pigmentosa. *Histol Histopathol* **24**, 1295–322 (2009).
18. Hartong, D. T. *et al.* Seminar Retinitis pigmentosa. *Seminar* 1795–1809 (2006).
19. Parmeggiani, F. *et al.* Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. *Curr. Genomics* **12**, 238–249 (2011).
20. Fern andez, E. Retinosis Pigmentaria: Preguntas y respuestas. *Elche: C tedra Bidons* (2007).
21. Daiger, S. P., Sullivan, L. S. & Bowne, S. J. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin. Genet.* **84**, 132–141 (2013).
22. Santos, A. *et al.* Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **115**, 511–5 (1997).
23. Jones, B. W. & Marc, R. E. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp. Eye Res.* **81**, 123–137 (2005).
24. Jones, B. W. *et al.* Retinal remodeling in human retinitis pigmentosa. *Exp. Eye Res.* **150**, 149–165 (2016).
25. Soto, F. & Kerschensteiner, D. Synaptic remodeling of neuronal circuits in early retinal

- degeneration. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–6 (2015).
26. Tsubura, A., Yoshizawa, K., Kuwata, M. & Uehara, N. Animal models for retinitis pigmentosa induced by MNU; disease progression, mechanisms and therapeutic trials. *Histol Histopathol* **25**, 933–44 (2010).
  27. Williams, D. S. Usher syndrome: Animal models, retinal function of Usher proteins, and prospects for gene therapy. *Vision Res.* **48**, 433–441 (2008).
  28. Beales, P. L., Elcioglu, N., Woolf, A. S., Parker, D. & Flinter, F. A. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J. Med. Genet.* **36**, 437–46 (1999).
  29. Daiger, S. P., Bowne, S. J. & Sullivan, L. S. Genes and Mutations Causing Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5**, 17129 (2014).
  30. Ali, M. U., Rahman, M. S. U., Cao, J. & Yuan, P. X. Genetic characterization and disease mechanism of retinitis pigmentosa; current scenario. *3 Biotech* **7**, (2017).
  31. Dryja, T. *et al.* A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* **343**, 364–6 (1990).
  32. N. Sahni, J. *et al.* Therapeutic Challenges to Retinitis Pigmentosa: From Neuroprotection to Gene Therapy. *Curr. Genomics* **12**, 276–284 (2011).
  33. Koenekoop, R. K. The gene for Stargardt disease, ABCA4, is a major retinal gene: a mini-review. *Ophthalmic Genet.* **24**, 75–80 (2003).
  34. Cremers, F. P. M., van den Hurk, J. A. J. M. & den Hollander, A. I. Molecular genetics of Leber congenital amaurosis. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1169–1176 (2002).
  35. Ayuso, C. & Millan, J. M. Retinitis pigmentosa and allied conditions today: A paradigm of translational research. *Genome Med.* **2**, (2010).
  36. Forsythe, E. & Beales, P. L. Bardet-Biedl syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**, 8–13 (2013).
  37. Nash, B. M., Wright, D. C., Grigg, J. R., Bennetts, B. & Jamieson, R. V. Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. *Transl. Pediatr.* **4**, 139–63 (2015).
  38. Wright, A. F., Chakarova, C. F., Abd El-Aziz, M. M. & Bhattacharya, S. S. Photoreceptor degeneration: Genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 273–284 (2010).
  39. Ramon, E. *et al.* Differential light-induced responses in sectorial inherited retinal degeneration. *J. Biol. Chem.* **289**, 35918–35928 (2014).
  40. Sorrentino, F., Di Sanzo, M., Bonifazzi, C. & Perri, P. Distinct Forms of Photoreceptor Cell Death in Retinitis Pigmentosa. *Phonology* **31**, 525–556 (2014).
  41. Cuenca, N. *et al.* Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* **43**, 17–75 (2014).
  42. Wert, K. J., Lin, J. H. & Tsang, S. H. General pathophysiology in retinal degeneration. *Cell-Based Ther. Retin. Degener. Dis.* **53**, 33–43 (2014).
  43. Fernández-Sánchez, L. *et al.* Controlled delivery of tauroursodeoxycholic acid from biodegradable microspheres slows retinal degeneration. *PLoS One* **12**, 1–20 (2017).
  44. Ransohoff, R. M. & Cardona, A. E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* **468**, 253–262 (2010).
  45. Yoshida, N. *et al.* Laboratory evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* **120**, e5–e12 (2013).
  46. Murakami, Y. *et al.* Relationship between aqueous flare and visual function in retinitis pigmentosa. *Am. J. Ophthalmol.* **159**, 958–963 (2015).
  47. Zeng, H. Y. *et al.* Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 2992–2999 (2005).

48. Peng, B. *et al.* Suppression of Microglial Activation Is Neuroprotective in a Mouse Model of Human Retinitis Pigmentosa. *J. Neurosci.* **34**, 8139–8150 (2014).
49. Zhao, L. *et al.* Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. *EMBO Mol. Med.* **7**, 1179–1197 (2015).
50. Suckow, M., Danneman, P. & Brayton, C. The laboratory Mouse. *CRC Press* (2001).
51. Chang, B. *et al.* Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the  $\beta$ -subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene. *Vision Res.* **47**, 624–633 (2007).
52. Samardzija, M. *et al.* Activation of survival pathways in the degenerating retina of rd10 mice. *Exp. Eye Res.* **99**, 17–26 (2012).
53. Won, J. *et al.* Mouse Model Resources for Vision Research. *J. Ophthalmol.* **2011**, 1–12 (2011).
54. Chang, G., Hao, Y. & Wong, F. Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* **11**, 595–605 (1993).
55. Portera-Cailliau, C., Sung, C. H., Nathans, J. & Adler, R. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 974–8 (1994).
56. Saxena, K., Rutar, M. V., Provis, J. M. & Natoli, R. C. Identification of miRNAs in a model of retinal degenerations. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 1820–1829 (2015).
57. Chung, S. H. *et al.* Profiling of Micro RNAs Involved in Retinal Degeneration Caused by Selective Müller Cell Ablation. *PLoS One* **10**, 1–18 (2015).
58. Keeler, C. E. The inheritance of a retinal abnormality in white mice. *Pnas* **10**, 329–333 (1924).
59. Han, J. *et al.* Review: the history and role of naturally occurring mouse models with Pde6b mutations. *Mol. Vis.* **19**, 2579–89 (2013).
60. Hicks, D. & Sabel, J. The implications of rod-dependent cone survival for basic and clinical research. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 3071–3074 (1999).
61. Gargini, C., Terzibasi, E., Mazzoni, F. & Strettoi, E. Retinal Organization in the Retinal Degeneration 10 (rd10) Mutant Mouse: A Morphological and ERG Study. *J. Comp. Neurol.* **500**, 222–238 (2007).
62. Barhoum, R. *et al.* Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse. *Neuroscience* **155**, 698–713 (2008).
63. Jae, S. A. *et al.* Electrophysiological and Histologic Evaluation of the Time Course of Retinal Degeneration in the rd10 Mouse Model of Retinitis Pigmentosa. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **17**, 229 (2013).
64. Phillips, M. J., Otteson, D. C. & Sherry, D. M. Progression of neuronal and synaptic remodeling in the rd 10 mouse model of retinitis pigmentosa. *J. Comp. Neurol.* **518**, 2071–2089 (2010).
65. Jacobson, S. G. *et al.* Evidence for retinal remodelling in retinitis pigmentosa caused by PDE6B mutation. *Br. J. Ophthalmol.* **91**, 699–701 (2007).
66. McLaughlin, M., Sandberg, M., Berson, E. & Dryja, T. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* **4**, 130–4 (1993).
67. Barone, I., Novelli, E. & Strettoi, E. Long-term preservation of cone photoreceptors and visual acuity in rd10 mutant mice exposed to continuous environmental enrichment. *Mol. Vis.* **20**, 1545–56 (2014).
68. Platón-Corchado, M. *et al.* p75NTR antagonists attenuate photoreceptor cell loss in murine models of retinitis pigmentosa. *Cell Death Dis.* **8**, e2922 (2017).
69. Xu, X. J. *et al.* Melatonin delays photoreceptor degeneration in a mouse model of autosomal recessive retinitis pigmentosa. *J. Pineal Res.* **63**, 1–12 (2017).
70. Uren, P. J., Lee, J. T., Doroudchi, M. M., Smith, A. D. & Horsager, A. A profile of transcriptomic changes in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *Mol. Vis.* **20**, 1612–28 (2014).
71. Murakami, Y. *et al.* Receptor interacting protein kinase mediates necrotic cone but not rod cell

- death in a mouse model of inherited degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 14598–14603 (2012).
72. Sekhar, S., Jalligampala, A., Zrenner, E. & Rathbun, D. L. Correspondence between visual and electrical input filters of ON and OFF mouse retinal ganglion cells. *J. Neural Eng.* **14**, 46017 (2017).
73. Lipinski, D. M. *et al.* CNTF Gene Therapy Confers Lifelong Neuroprotection in a Mouse Model of Human Retinitis Pigmentosa. *Mol. Ther.* **23**, 1308–1319 (2015).
74. Mookherjee, S. *et al.* Long-term rescue of cone photoreceptor degeneration in retinitis pigmentosa 2 (RP2)-knockout mice by gene replacement therapy. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 6446–6458 (2015).
75. Deng, W. L. *et al.* Gene Correction Reverses Ciliopathy and Photoreceptor Loss in iPSC-Derived Retinal Organoids from Retinitis Pigmentosa Patients. *Stem Cell Reports* **10**, (2018).
76. Birch, D. G., Bennett, L. D., Duncan, J. L., Weleber, R. G. & Pennesi, M. E. Long-term Follow-up of Patients With Retinitis Pigmentosa Receiving Intraocular Ciliary Neurotrophic Factor Implants. *Am. J. Ophthalmol.* **170**, 10–14 (2016).
77. Baranov, P. *et al.* A Novel Neuroprotective Small Molecule for Glial Cell Derived Neurotrophic Factor Induction and Photoreceptor Rescue. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **33**, 412–422 (2017).
78. Li, Y. & Tsai, Y.-T. Long-term Safety and Efficacy of Human-Induced Pluripotent Stem Cell (iPS) Grafts in a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa. *Mol. Med.* **18**, 1 (2012).
79. Liu, Y. *et al.* Long-term safety of human retinal progenitor cell transplantation in retinitis pigmentosa patients. *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 209 (2017).
80. Mandai, M. *et al.* Erratum: iPSC-Derived Retina Transplants Improve Vision in rd1 End-Stage Retinal-Degeneration Mice (Stem Cell Reports (2017) 8(1) (69–83) (S2213671116302983) (10.1016/j.stemcr.2016.12.008)). *Stem Cell Reports* **8**, 1112–1113 (2017).
81. Latella, M. C. *et al.* In vivo Editing of the Human Mutant Rhodopsin Gene by Electroporation of Plasmid-based CRISPR/Cas9 in the Mouse Retina. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **5**, e389 (2016).
82. Burnight, E. R. *et al.* Using CRISPR-Cas9 to Generate Gene-Corrected Autologous iPSCs for the Treatment of Inherited Retinal Degeneration. *Mol. Ther.* **25**, 1999–2013 (2017).
83. Luo, Y. H. L. & da Cruz, L. The Argus® II Retinal Prosthesis System. *Prog. Retin. Eye Res.* **50**, 89–107 (2016).
84. da Cruz, L. *et al.* Five-Year Safety and Performance Results from the Argus II Retinal Prosthesis System Clinical Trial. *Ophthalmology* **123**, 2248–2254 (2016).
85. Barber, A. C. *et al.* Repair of the degenerate retina by photoreceptor transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 354–359 (2013).
86. Beltran, W. A. *et al.* Successful arrest of photoreceptor and vision loss expands the therapeutic window of retinal gene therapy to later stages of disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E5844–E5853 (2015).
87. Maguire, A. M. *et al.* Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber’s Congenital Amaurosis. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2240–2248 (2008).
88. Jacobson, S. G. *et al.* Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: Safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch. Ophthalmol.* **130**, 9–24 (2012).
89. MacLaren, R. E., Bennett, J. & Schwartz, S. D. Gene Therapy and Stem Cell Transplantation in Retinal Disease: The New Frontier. *Ophthalmology* **123**, S98–S106 (2016).
90. Moore, N. A., Morral, N., Ciulla, T. A. & Bracha, P. Gene therapy for inherited retinal and optic nerve degenerations. *Expert Opin. Biol. Ther.* **18**, 37–49 (2018).
91. Beltran, W. A. *et al.* Optimization of Retinal Gene Therapy for X-Linked Retinitis Pigmentosa Due to RPGR Mutations. *Mol. Ther.* **25**, 1866–1880 (2017).
92. Daya, S. & Berns, K. I. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin. Microbiol. Rev.*

- 21**, 583–593 (2008).
93. Mingozi, F. & High, K. a. Immune responses to AAV vectors : overcoming barriers to successful gene. *Blood* **122**, 23–36 (2013).
  94. Wen, R., Tao, W., Li, Y. & Sieving, P. A. CNTF and retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **31**, 136–151 (2012).
  95. Talcott, K. E. *et al.* Longitudinal Study of Cone Photoreceptors during Retinal Degeneration and in Response to Ciliary Neurotrophic Factor Treatment. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **52**, 2219 (2011).
  96. Byrne, L. C. *et al.* Viral-mediated RdCVF and RdCVFL expression protects cone and rod photoreceptors in retinal degeneration. *J. Clin. Invest.* **125**, 105–116 (2015).
  97. Fernández-Sánchez, L. *et al.* Proinsulin Slows Retinal Degeneration and Vision Loss in the P23H Rat Model of Retinitis Pigmentosa. *Hum. Gene Ther.* **23**, 1290–1300 (2012).
  98. Kolomeyer, A. M. & Zarbin, M. A. Trophic factors in the pathogenesis and therapy for retinal degenerative diseases. *Surv. Ophthalmol.* **59**, 134–165 (2014).
  99. Patrick, H. D., Eric, L. S. & Zhang, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering Patrick. *Cell* **157**, 1262–1278 (2014).
  100. Swiech, L. *et al.* In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* **33**, 102–106 (2015).
  101. Mali, P. *et al.* RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9 Prashant. *Science (80-. )*. **339**, 823–826 (2013).
  102. Arno, G. *et al.* Mutations in REEP6 Cause Autosomal-Recessive Retinitis Pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.* **99**, 1305–1315 (2016).
  103. Lamba, D. A. *et al.* Generation, Purification and Transplantation of Photoreceptors Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One* **5**, e8763 (2010).
  104. Ji, H. P. *et al.* MicroRNA-28 potentially regulates the photoreceptor lineage commitment of Müller glia-derived progenitors. *Sci. Rep.* **7**, 1–9 (2017).
  105. Rong, Z., Fu, X., Wang, M. & Xu, Y. A scalable approach to prevent teratoma formation of human embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 32338–32345 (2012).
  106. Pearson, R. A. *et al.* Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature* **485**, 99–103 (2012).
  107. Bassuk, A. G., Zheng, A., Li, Y., Tsang, S. H. & Mahajan, V. B. Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Sci. Rep.* **6**, 1–6 (2016).
  108. Ou, Z. *et al.* The Combination of CRISPR/Cas9 and iPSC Technologies in the Gene Therapy of Human  $\beta$ -thalassemia in Mice. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
  109. Dorn, J. D. *et al.* The Detection of Motion by Blind Subjects With the Epiretinal 60-Electrode (Argus II) Retinal Prosthesis. *JAMA Ophthalmol.* **131**, 183 (2013).
  110. Berson, E. L. *et al.* Clinical trial of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **122**, 1297–305 (2004).
  111. Berson, E. L., Rosner, B., Sandberg, M. A., Weigel-difranco, C. & Moser, A. Further Evaluation of Docosahexaenoic Acid in Patients With Retinitis Pigmentosa Receiving Vitamin A Treatment. *Arch. Ophthalmol.* **122**, 1306–14 (2004).
  112. Guadagni, V., Novelli, E., Piano, I., Gargini, C. & Strettoi, E. Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: A laboratory perspective. *Prog. Retin. Eye Res.* **48**, 62–81 (2015).
  113. Dias, M. F. *et al.* Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives. *Prog. Retin. Eye Res.* **63**, 107–131 (2018).
  114. Singh, R. P. *et al.* The role of miRNA in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **12**, 1160–1165 (2013).
  115. Hou, S. *et al.* MiR-23a, miR-146a and miR-301a confer predisposition to Vogt-Koyanagi-Harada

- syndrome but not to Behcet's disease. *Sci. Rep.* **6**, 2–10 (2016).
116. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
  117. Pasquinelli, A. E. MicroRNAs and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 271–282 (2012).
  118. Bentwich, I. *et al.* Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.* **37**, 766–770 (2005).
  119. Wang, S., Xu, Y. & Lu, Z. Genome-wide miRNA seeds prediction in archaea. *Archaea* **2014**, (2014).
  120. Olson, E. N. MicroRNAs as therapeutic targets and biomarkers of cardiovascular disease. *Sci Transl Med* **6**, 239ps3 (2014).
  121. Xu, P., Zhu, Y., Sun, B. & Xiao, Z. Colorectal cancer characterization and therapeutic target prediction based on microRNA expression profile. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
  122. Ghanbari, M. *et al.* Genetic Variants in MicroRNAs and Their Binding Sites Are Associated with the Risk of Parkinson Disease. *Hum. Mutat.* **37**, 292–300 (2016).
  123. de Faria, O. *et al.* MicroRNA dysregulation in multiple sclerosis. *Front. Genet.* **3**, 1–6 (2013).
  124. Kumar, P. *et al.* MIR-16 rescues F508del-CFTR function in native cystic fibrosis epithelial cells. *Gene Ther.* **22**, 908–916 (2015).
  125. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. the *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**: 843–85, 843–854 (1993).
  126. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855–862 (1993).
  127. Reinhart, B. J. *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901–906 (2000).
  128. Ruvkun, G. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86–89 (2000).
  129. Ruvkun, G. Molecular biology: Glimpses of a tiny RNA world. *Science (80-. )*. **294**, 797–799 (2001).
  130. Brennecke, J., Hipfner, D. R., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* **113**, 25–36 (2003).
  131. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nat.* **431**, 350–355 (2004).
  132. Pileczki, V., Cojocneanu-Petric, R., Maralani, M., Berindan Neagoe, I. & Sandulescu, R. MicroRNAs as regulators of apoptosis mechanisms in cancer. *Clujul Med.* **89**, 50 (2016).
  133. Raisch, J., Darfeuille-Michaud, A. & Nguyen, H. T. T. Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer. *World J. Gastroenterol.* **19**, 2985–2996 (2013).
  134. Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 351–379 (2010).
  135. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15–20 (2005).
  136. Ellwanger, D. C., Büttner, F. A., Mewes, H. W. & Stümpflen, V. The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics* **27**, 1346–1350 (2011).
  137. He, L. & Hannon, G. J. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 522–531 (2004).
  138. Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92–105 (2009).
  139. Van Rooij, E. The art of MicroRNA research. *Circ. Res.* **108**, 219–234 (2011).

140. Djuranovic, S., Nahvi, A. & Green, R. A Parsimonious Model for Gene Regulation by miRNAs. *Science (80-. )*. **331**, 550–553 (2011).
141. McDonald, M. K. & Ajit, S. K. *MicroRNA biology and pain. Progress in Molecular Biology and Translational Science* **131**, (Elsevier Inc., 2015).
142. Kjaer-Frifeldt, S. *et al.* The prognostic importance of miR-21 in stage II colon cancer: A population-based study. *Br. J. Cancer* **107**, 1169–1174 (2012).
143. Loginov, V. I., Rykov, S. V, Fridman, M. V & Braga, E. A. Methylation of miRNA genes and oncogenesis. *Biochem.* **80**, 145–162 (2015).
144. Wang, X.-J. *et al.* Differential expression of microRNAs in aortic tissue and plasma in patients with acute aortic dissection. *J. Geriatr. Cardiol.* **12**, 655–661 (2015).
145. Garofalo, M. & Croce, C. M. microRNAs: Master Regulators as Potential Therapeutics in Cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **51**, 25–43 (2011).
146. Fayyad-Kazan, H. *et al.* Circulating miR-150 and miR-342 in plasma are novel potential biomarkers for acute myeloid leukemia. *J. Transl. Med.* **11**, 1–10 (2013).
147. Bertoli, G., Cava, C. & Castiglioni, I. MicroRNAs as biomarkers for diagnosis, Prognosis and theranostics in prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
148. Cui, Z., Zheng, X. & Kong, D. Decreased miR-198 expression and its prognostic significance in human gastric cancer. *World J. Surg. Oncol.* **14**, 4–8 (2016).
149. Bhattacharyya, S. *et al.* Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyperexpression of interleukin-8. *J. Biol. Chem.* **286**, 11604–11615 (2011).
150. Alsharafi, W. A., Xiao, B., Abuhamed, M. M., Bi, F.-F. & Luo, Z.-H. Correlation Between IL-10 and microRNA-187 Expression in Epileptic Rat Hippocampus and Patients with Temporal Lobe Epilepsy. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 1–9 (2015).
151. Van Rooij, E., Marshall, W. S. & Olson, E. N. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: The sense in antisense. *Circ. Res.* **103**, 919–928 (2008).
152. Lin, S. & Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 321–333 (2015).
153. Naidu, S. & Garofalo, M. microRNAs: An Emerging Paradigm in Lung Cancer Chemoresistance. *Front. Med.* **2**, 1–8 (2015).
154. Riquelme, I., Letelier, P., Riffo-Campos, A. L., Brebi, P. & Roa, J. C. Emerging role of mirnas in the drug resistance of gastric cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
155. Sundermeier, T. R. *et al.* DICER1 is essential for survival of postmitotic rod photoreceptor cells in mice. *FASEB J.* **28**, 3780–3791 (2014).
156. Damiani, D. *et al.* Dicer Inactivation Leads to Progressive Functional and Structural Degeneration of the Mouse Retina. *J. Neurosci.* **28**, 4878–4887 (2008).
157. Quintero, H., Gómez-Montalvo, A. I. & Lamas, M. MicroRNA changes through Müller glia dedifferentiation and early/late rod photoreceptor differentiation. *Neuroscience* **316**, 109–121 (2016).
158. Choi, S. W. *et al.* Inhibition by miR-410 facilitates direct retinal pigment epithelium differentiation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet. Sci.* **18**, 59–65 (2017).
159. Lumayag, S. *et al.* Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, E507–E516 (2013).
160. Xiang, L. *et al.* miR-183/96 plays a pivotal regulatory role in mouse photoreceptor maturation and maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 6376–6381 (2017).
161. Lukiw, W. J., Surjyadipta, B., Dua, P. & Alexandrov, P. N. Common micro RNAs ( miRNAs ) target complement factor H ( CFH ) regulation in Alzheimer ’ s disease ( AD ) and in age- related macular degeneration ( AMD ). **3**, 105–116 (2012).
162. Kutty, R. K. *et al.* Differential regulation of microRNA-146a and microRNA-146b-5p in human

- retinal pigment epithelial cells by interleukin-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interferon- $\gamma$ . *Mol. Vis.* **19**, 737–50 (2013).
163. Mortuza, R., Feng, B. & Chakrabarti, S. MiR-195 regulates SIRT1-mediated changes in diabetic retinopathy. *Diabetologia* **57**, 1037–1046 (2014).
  164. Kaidonis, G. *et al.* A single-nucleotide polymorphism in the MicroRNA-146a gene is associated with diabetic nephropathy and sight-threatening diabetic retinopathy in Caucasian patients. *Acta Diabetol.* **53**, 643–650 (2016).
  165. Bai, S. *et al.* MicroRNA-125b promotes tumor growth and suppresses apoptosis by targeting DRAM2 in retinoblastoma. *Eye* **30**, 1630–1638 (2016).
  166. Conkrite, K. *et al.* Mir-17~92 cooperates with RB pathway mutations to promote retinoblastoma. *Genes Dev.* **25**, 1734–1745 (2011).
  167. Genini, S., Guziewicz, K. E., Beltran, W. A. & Aguirre, G. D. Altered miRNA expression in canine retinas during normal development and in models of retinal degeneration. *BMC Genomics* **15**, 1–17 (2014).
  168. Loscher, C. J. *et al.* Altered retinal microRNA expression profile in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Genome Biol.* **8**, (2007).
  169. Loscher, C. J. *et al.* A common microRNA signature in mouse models of retinal degeneration. *Exp. Eye Res.* **87**, 529–534 (2008).
  170. Cook, M. S. & Blelloch, R. *Small RNAs in Germline Development. Current Topics in Developmental Biology* **102**, (Elsevier Inc., 2013).
  171. Lennox, K. A., Owczarzy, R., Thomas, D. M., Walder, J. A. & Behlke, M. A. Improved performance of anti-miRNA oligonucleotides using a novel non-nucleotide modifier. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2**, 1–19 (2013).
  172. Lanford, R. E. *et al.* Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Science (80-. )*. **327**, 198–201 (2010).
  173. Tay, F. C., Lim, J. K., Zhu, H., Hin, L. C. & Wang, S. Using artificial microRNA sponges to achieve microRNA loss-of-function in cancer cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **81**, 117–127 (2015).
  174. Sharma, S., Rajendran, V., Kulshreshtha, R. & Ghosh, P. C. Enhanced efficacy of anti-miR-191 delivery through stearylamine liposome formulation for the treatment of breast cancer cells. *Int. J. Pharm.* **530**, 387–400 (2017).
  175. Janssen, H. L. A. *et al.* Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1685–1694 (2013).
  176. Miyazaki, Y., Du, X., Muramatsu, S. I. & Gomez, C. M. An mirna-mediated therapy for SCA6 blocks IRES-driven translation of the CACNA1A second cistron. *Sci. Transl. Med.* **8**, (2016).
  177. Reid, C. A., Boye, S. L., Hauswirth, W. W. & Lipinski, D. M. MiRNA-mediated post-transcriptional silencing of transgenes leads to increased adeno-associated viral vector yield and targeting specificity. *Gene Ther.* **24**, 462–469 (2017).
  178. Sen, D. & Jayandharan, G. R. MicroRNA-15b modulates molecular mediators of blood induced arthropathy in hemophilia mice. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 1–13 (2016).
  179. Rupaimoole, R. & Slack, F. J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **16**, 203–221 (2017).
  180. Ye, Y. *et al.* Downregulation of microRNA-145 may contribute to liver fibrosis in biliary atresia by targeting ADD3. *PLoS One* **12**, 1–16 (2017).
  181. Conley, S. M. & Naash, M. I. Nanoparticles for retinal gene therapy. *Prog. Retin. Eye Res.* **29**, 376–397 (2010).
  182. Farjo, R., Skaggs, J., Quiambao, A. B., Cooper, M. J. & Naash, M. I. Efficient non-viral ocular gene transfer with compacted DNA nanoparticles. *PLoS One* **1**, 1–8 (2006).
  183. Karow, M. & Calos, M. The therapeutic potential of  $\Phi$ C31 integrase as a gene therapy system. *Expert Opin Biol Ther* **10**, 1287–96 (2011).

184. Kachi, S. *et al.* Nonviral ocular gene transfer. *Gene Ther.* **12**, 843–851 (2005).
185. Langhofer, M., Hopkinson, S. B. & Jones, J. C. The matrix secreted by 804G cells contains laminin-related components that participate in hemidesmosome assembly in vitro. *J. Cell Sci.* **105** (Pt 3), 753–764 (1993).
186. Dweep, H. & Gretz, N. MiRWalk2.0: A comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* **12**, 697 (2015).
187. Enright, A. J. *et al.* MicroRNA targets in Drosophila. *Genome Biol.* **5**, R1 (2003).
188. John, B. *et al.* Human microRNA targets. *PLoS Biol.* **2**, (2004).
189. Miranda, K. C. *et al.* A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes. *Cell* **126**, 1203–1217 (2006).
190. Smoot, M. E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P. L. & Ideker, T. Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* **27**, 431–432 (2011).
191. Bindea, G. *et al.* ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* **25**, 1091–1093 (2009).
192. Valasek, M. A. The power of real-time PCR. *AJP Adv. Physiol. Educ.* **29**, 151–159 (2005).
193. Cockrell, A. S. & Kafri, T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol. Biotechnol.* **36**, 184–204 (2007).
194. Zufferey, R. *et al.* Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* **72**, 9873–80 (1998).
195. Mao, H. *et al.* AAV Delivery of Wild-Type Rhodopsin Preserves Retinal Function in a Mouse Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Hum. Gene Ther.* **22**, 567–575 (2011).
196. Gómez-Vicente, V. *et al.* Characterization of a new murine retinal cell line (mu-ph1) with glial, progenitor and photoreceptor characteristics. *Exp. Eye Res.* **110**, 125–135 (2013).
197. Bhattacharjee, S., Zhao, Y., Dua, P., Rogaev, E. I. & Lukiw, W. J. MicroRNA-34a-mediated down-regulation of the microglial-enriched triggering receptor and phagocytosis-sensor TREM2 in age-related macular degeneration. *PLoS One* **11**, 1–21 (2016).
198. Noailles, A. *et al.* Persistent inflammatory state after photoreceptor loss in an animal model of retinal degeneration. *Sci. Rep.* **6**, 1–16 (2016).
199. Cronin, T., Lyubarsky, A. & Bennett, J. Dark-Rearing the rd10 Mouse: Implications for Therapy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 129–136 (2012).
200. Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M. & Irizarry, R. A. Affy - Analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* **20**, 307–315 (2004).
201. Kapur, K., Jiang, H., Xing, Y. & Wong, W. H. Cross-hybridization modeling on Affymetrix exon arrays. *Bioinformatics* **24**, 2887–2893 (2008).
202. Rattner, A., Toulabi, L., Williams, J., Yu, H. & Nathans, J. The Genomic Response of the Retinal Pigment Epithelium to Light Damage and Retinal Detachment. *J. Neurosci.* **28**, 9880–9889 (2008).
203. Sarthy, V. P., Sawkar, H. & Dudley, V. J. Endothelin2 Induces Expression of Genes Associated with Reactive Gliosis in Retinal Müller Cells. *Curr. Eye Res.* **40**, 1181–1184 (2015).
204. Valapala, M. *et al.* Increased Lipocalin-2 in the retinal pigment epithelium of Cryba1 cKO mice is associated with a chronic inflammatory response. *Aging Cell* **13**, 1091–1094 (2014).
205. Smit-Mcbride, Z. *et al.* Comparison of In Vivo Gene Expression Profiling of RPE/Choroid following Intravitreal Injection of Dexamethasone and Triamcinolone Acetonide. *J. Ophthalmol.* **2016**, (2016).
206. Liu, R. T. *et al.* Inflammatory mediators induced by amyloid-beta in the retina and RPE In Vivo: Implications for inflammasome activation in age-related macular degeneration. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 2225–2237 (2013).
207. Straszewski-Chavez, S. L. *et al.* XAF1 mediates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and

- X-linked inhibitor of apoptosis cleavage by acting through the mitochondrial pathway. *J. Biol. Chem.* **282**, 13059–13072 (2007).
208. Smith, J. A., Das, A., Ray, S. K. & Banik, N. L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Bull.* **87**, 10–20 (2012).
209. Manes, G. *et al.* A novel locus (CORD12) for autosomal dominant cone-rod dystrophy on chromosome 2q24.2-2q33.1. *BMC Med. Genet.* **12**, (2011).
210. Escher, P. *et al.* Mutations in NR2E3 can cause dominant or recessive retinal degenerations in the same family. *Hum. Mutat.* **30**, 342–351 (2009).
211. Bernal, S. *et al.* Study of the involvement of the RGR, CRPB1, and CRB1 genes in the pathogenesis of autosomal recessive retinitis pigmentosa. *J Med Genet* **40**, e89 (2003).
212. Chen, S., Feng, B., Thomas, A. A. & Chakrabarti, S. MiR-146a regulates glucose induced upregulation of inflammatory cytokines extracellular matrix proteins in the retina and kidney in diabetes. *PLoS One* **12**, 1–17 (2017).
213. Kovacs, B., Lumayag, S., Cowan, C. & Xu, S. microRNAs in Early Diabetic Retinopathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **52**, 4402 (2011).
214. Ksiazek-Winiarek, D. J., Kacperska, M. J. & Glabinski, A. MicroRNAs as Novel Regulators of Neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* **2013**, 1–11 (2013).
215. Liu, R. *et al.* FOXP3 Controls an miR-146/NF- $\kappa$ B Negative Feedback Loop That Inhibits Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **75**, 1703–1713 (2015).
216. Park, H., Huang, X., Lu, C., Cairo, M. S. & Zhou, X. MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins. *J. Biol. Chem.* **290**, 2831–2841 (2015).
217. Elmesmari, A. *et al.* MicroRNA-155 regulates monocyte chemokine and chemokine receptor expression in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatol. (United Kingdom)* **55**, 2056–2065 (2016).
218. Zadeh, M. M., Motamed, N., Ranji, N., Majidi, M. & Falahi, F. Silibinin-Induced Apoptosis and Downregulation of MicroRNA-21 and MicroRNA-155 in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *J. Breast Cancer* **19**, 45 (2016).
219. Lindberg, R. L. P., Hoffmann, F., Mehling, M., Kuhle, J. & Kappos, L. Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur. J. Immunol.* **40**, 888–898 (2010).
220. Alvey, C. M. *et al.* SIRPA-Inhibited, Marrow-Derived Macrophages Engorge, Accumulate, and Differentiate in Antibody-Targeted Regression of Solid Tumors. *Curr. Biol.* **27**, 2065–2077.e6 (2017).
221. He, B. *et al.* Role of miR-1 and miR-133a in myocardial ischemic postconditioning. *J. Biomed. Sci.* **18**, 22 (2011).
222. Pan, Z. *et al.* miR-1 Exacerbates Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury in Mouse Models. *PLoS One* **7**, 1–9 (2012).
223. Yu, X. Y. *et al.* Glucose induces apoptosis of cardiomyocytes via microRNA-1 and IGF-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 548–552 (2008).
224. Li, Y., Kang, J. & Horwitz, M. S. Interaction of an adenovirus 14.7-kilodalton protein inhibitor of tumor necrosis factor alpha cytolysis with a new member of the GTPase superfamily of signal transducers. *J. Virol.* **71**, 1576–82 (1997).
225. McLaughlin, J. N. *et al.* Thrombin modulates the expression of a set of genes including thrombospondin-1 in human microvascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 22172–22180 (2005).
226. Ozato, K., Shin, D., Chang, T. & Morse, H. TRIM Family Proteins and Their Emerging Roles in Innate Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 849–860 (2012).
227. Katano, H., Nishikawa, Y., Yamada, H., Yamada, K. & Mase, M. Differential Expression of microRNAs in Severely Calcified Carotid Plaques. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **27**, 108–117 (2018).

228. Li, Y. *et al.* microRNA-762 promotes breast cancer cell proliferation and invasion by targeting IRF7 expression. *Cell Prolif.* **48**, 643–649 (2015).
229. Elachouri, G. *et al.* Thioredoxin rod-derived cone viability factor protects against photooxidative retinal damage. *Free Radic. Biol. Med.* **81**, 22–29 (2015).
230. Jaillard, C. *et al.* Nxn12 splicing results in dual functions in neuronal cell survival and maintenance of cell integrity. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2298–2311 (2012).
231. Dvir, L. *et al.* Autosomal-recessive early-onset retinitis pigmentosa caused by a mutation in PDE6G, the gene encoding the gamma subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 258–264 (2010).
232. Ksantini, M. *et al.* Screening genes of the visual cycle RGR, RBP1 and RBP3 identifies rare sequence variations. *Ophthalmic Genet.* **31**, 200–204 (2010).
233. Trifunović, D. *et al.* A high-resolution RNA expression atlas of retinitis pigmentosa genes in human and mouse retinas. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 2330–2336 (2008).
234. Giladi, M. *et al.* The C2B domain is the primary Ca<sup>2+</sup> sensor in DOC2B: A structural and functional analysis. *J. Mol. Biol.* **425**, 4629–4641 (2013).
235. Yang, S. *et al.* Pellino3 targets RIP1 and regulates the pro-apoptotic effects of TNF- $\alpha$ . *Nat. Commun.* **4**, 1–19 (2013).
236. Baras, A. S., Solomon, A., Davidson, R. & Moskaluk, C. A. Loss of VOPP1 overexpression in squamous carcinoma cells induces apoptosis through oxidative cellular injury. *Lab. Invest.* **91**, 1170–1180 (2011).
237. Gutiérrez-Franco, A. *et al.* Semaphorin 7A as a Potential Therapeutic Target for Multiple Sclerosis. *Mol. Neurobiol.* **54**, 4820–4831 (2017).
238. Sanada, T. *et al.* FLN29 deficiency reveals its negative regulatory role in the toll-like receptor (TLR) and retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like helicase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **283**, 33858–33864 (2008).
239. Corton, M. *et al.* Involvement of LCA5 in leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa in the Spanish population. *Ophthalmology* **121**, 399–407 (2014).
240. Djuranovic, S., Nahvi, A. & Green, R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science (80-. )*. **336**, 237–240 (2012).
241. Catalanotto, C., Cogoni, C. & Zardo, G. MicroRNA in control of gene expression: An overview of nuclear functions. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
242. Ovando-Vázquez, C., Lepe-Soltero, D. & Abreu-Goodger, C. Improving microRNA target prediction with gene expression profiles. *BMC Genomics* **17**, 1–13 (2016).
243. Oh, M. *et al.* Literature-based condition-specific miRNAmRNA target prediction. *PLoS One* **12**, 1–15 (2017).
244. Lu, Y. *et al.* A single anti-microRNA antisense oligodeoxynucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–10 (2009).
245. Mingozi, F. & Büning, H. Adeno-Associated Viral Vectors at the Frontier between Tolerance and Immunity. *Front. Immunol.* **6**, 341–355 (2015).
246. Zinn, E. *et al.* In silico reconstruction of the viral evolutionary lineage yields a potent gene therapy vector. *Cell Rep.* **12**, 1056–1068 (2015).
247. Finnigan, G. C., Hanson-Smith, V., Stevens, T. H. & Thornton, J. W. Evolution of increased complexity in a molecular machine. *Nature* **481**, 360–364 (2012).
248. Mühlfriedel, R., Michalakis, S., Garrido, M. G., Biel, M. & Seeliger, M. W. Optimized Technique for Subretinal Injections in Mice. in *Retinal Degeneration: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* **935**, 343–349 (2013).
249. Ku, C. A. *et al.* Gene therapy using self-complementary Y733F capsid mutant AAV2/8 restores vision in a model of early onset Leber congenital amaurosis. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 4569–4581

- (2011).
250. Petrs-Silva, H. *et al.* Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Mol. Ther.* **19**, 293–301 (2011).
  251. Kay, C. N. *et al.* Targeting Photoreceptors via Intravitreal Delivery Using Novel, Capsid-Mutated AAV Vectors. *PLoS One* **8**, (2013).
  252. Watanabe, S. *et al.* Tropisms of AAV for Subretinal Delivery to the Neonatal Mouse Retina and Its Application for In Vivo Rescue of Developmental Photoreceptor Disorders. *PLoS One* **8**, (2013).
  253. Becker, S., Wang, H., Stoddard, G. J. & Hartnett, M. E. Effect of subretinal injection on retinal structure and function in a rat oxygen-induced retinopathy model. *Mol. Vis.* **23**, 832–843 (2017).
  254. Tanimoto, N. *et al.* Electroretinographic assessment of rod- and cone-mediated bipolar cell pathways using flicker stimuli in mice. *Sci. Rep.* **5**, 1–7 (2015).
  255. Arroba, A. I. *et al.* Modulation of microglia polarization dynamics during diabetic retinopathy in db/db mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1862**, 1663–1674 (2016).
  256. Krishna, V. R., Alexander, K. R. & Peachey, N. S. Temporal Properties of the Mouse Cone Electroretinogram. *J. Neurophysiol.* **87**, 42–48 (2002).
  257. Barliya, T., Ofri, R., Sandalon, S., Weinberger, D. & Livnat, T. Changes in Retinal Function and Cellular Remodeling Following Experimental Retinal Detachment in a Rabbit Model. *J. Ophthalmol.* **2017**, (2017).
  258. Song, L., Yu, A., Murray, K. & Cortopassi, G. Bipolar cell reduction precedes retinal ganglion neuron loss in a complex 1 knockout mouse model. *Brain Res.* **1657**, 232–244 (2017).
  259. Ansari, A. M. *et al.* Cellular GFP Toxicity and Immunogenicity: Potential Confounders in in Vivo Cell Tracking Experiments. *Stem Cell Rev. Reports* **12**, 553–559 (2016).
  260. Chen, L. *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol. Cell* **17**, 393–403 (2005).
  261. Wada, T. & Penninger, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* **23**, 2838–2849 (2004).
  262. Zhang, P. *et al.* The ubiquitin ligase itch regulates apoptosis by targeting thioredoxin-interacting protein for ubiquitin-dependent degradation. *J. Biol. Chem.* **285**, 8869–8879 (2010).
  263. Kim, J. Bin *et al.* Identification of a novel anti-apoptotic E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates antagonists of inhibitor of apoptosis proteins SMAC, HtrA2, and ARTS. *J. Biol. Chem.* **288**, 12014–12021 (2013).
  264. Chen, H. A. *et al.* Angiopoietin-like protein 1 antagonizes MET receptor activity to repress sorafenib resistance and cancer stemness in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **64**, 1637–1651 (2016).
  265. Gu, H. *et al.* Angiopoietin-1/Tie2 signaling pathway inhibits lipopolysaccharide-induced activation of RAW264.7 macrophage cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 178–182 (2010).
  266. Gómez-Martín, D. *et al.* Ro52/TRIM21-deficient expression and function in different subsets of peripheral blood mononuclear cells is associated with a proinflammatory cytokine response in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Clin. Exp. Immunol.* **188**, 154–162 (2017).
  267. Yamaoka K Zhou YJ, Paul WE, O’shea JJ., M. B. Jak3 negatively regulates dendritic cell cytokine production and survival. *Blood* **106**, 3227–3234 (2005).
  268. Zhao, Y. & Fent, K. Progesterins alter photo-transduction cascade and circadian rhythm network in eyes of zebrafish (*Danio rerio*). *Sci. Rep.* **6**, 2–11 (2016).
  269. Templeton, J. P. *et al.* A crystallin gene network in the mouse retina. *Exp. Eye Res.* **116**, 129–140 (2013).
  270. Adighibe, O. *et al.* JMY protein, a regulator of P53 and cytoplasmic actin filaments, is expressed in normal and neoplastic tissues. *Virchows Arch.* **465**, 715–722 (2014).

271. Kajkowski, E. M. *et al.*  $\beta$ -Amyloid Peptide-induced Apoptosis Regulated by a Novel Protein Containing a G Protein Activation Module. *J. Biol. Chem.* **276**, 18748–18756 (2001).
272. Yan, Q. *et al.* ANGPTL1 interacts with integrin  $\alpha 1\beta 1$  to suppress HCC angiogenesis and metastasis by inhibiting JAK2/STAT3 signaling. *Cancer Res.* **77**, 5831–5845 (2017).
273. Ha, S., Lee, S., Chung, M. & Choi, Y. Mouse ING1 homologue, a protein interacting with A1, enhances cell death and is inhibited by A1 in mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **62**, 1275–1278 (2002).

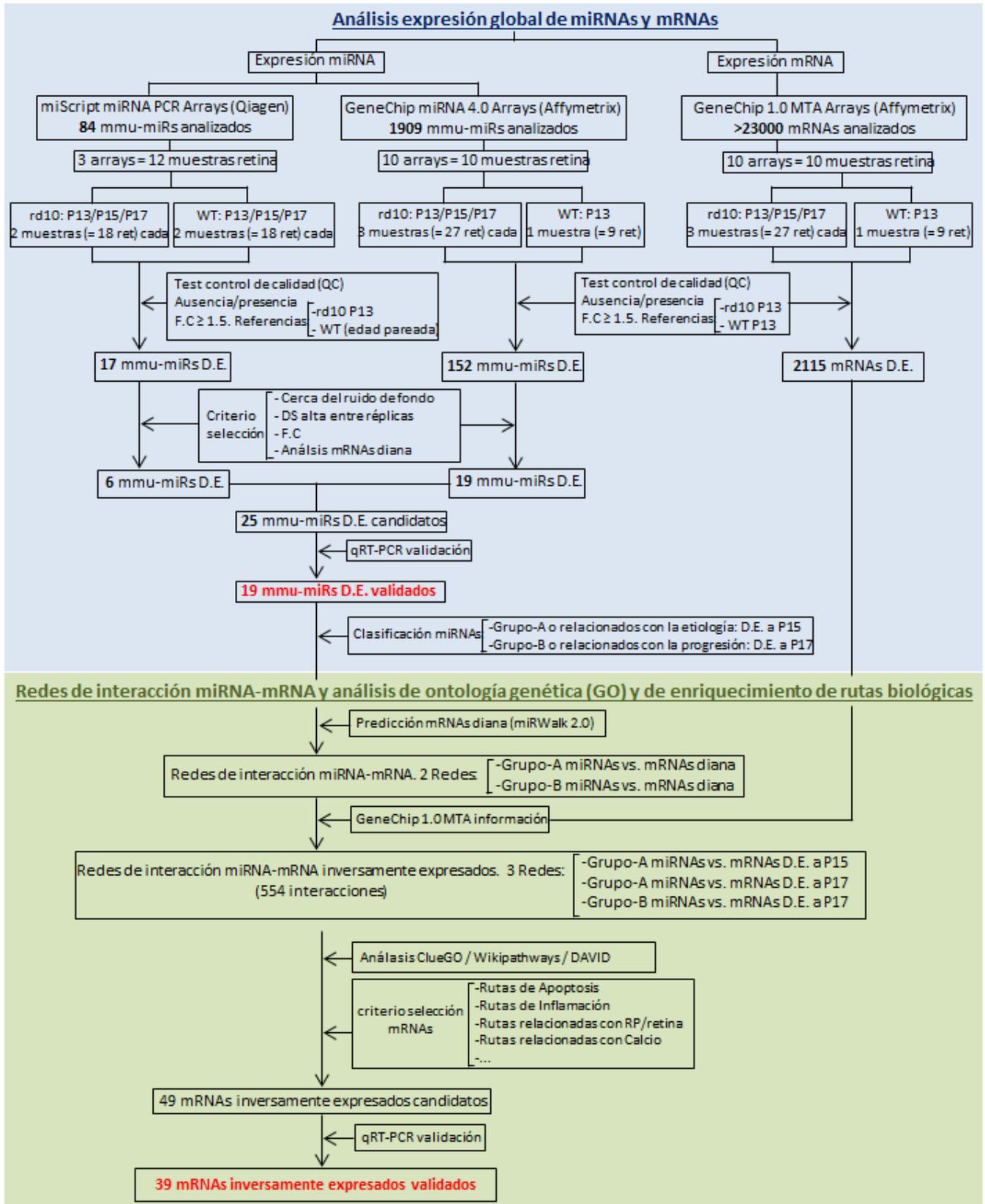


*ANEXOS*



## ANEXOS

**Anexo 1. Flujo de trabajo para el descubrimiento de miRNAs y mRNAs posiblemente implicados en la etiopatogenia de la degeneración retiniana de los ratones rd10.**



**Anexo 2. Listado de los mRNAs analizados por qPCR y de las secuencias de los cebadores diseñados para amplificarlos.**

<b>mRNA ID</b>	<b>Primer Forward</b>	<b>Primer Reverse</b>	<b>Longitud amplicón</b>
Arhgap18	AGACAACCTTCGTTTTTCGGTCAGTCT	ACCAACTCAGCTCCCTCTGTGTAGT	78
Cngb1	CTGGAGAGGCATGCAGAAGGT	GGATCTGTGCTCCACCCTGAT	104
Crx	TCCAGGGTCCAGGTCTGGTT	CTGTTGCTGTTTCTGCTGCTGT	75
Cryaa	GCCCTTCCTGTCTTCCACCAT	CCACATATGGGTCATGAGCTCAGA	97
Cth	GCTTCGTTTCCTGCAGAATTCATA	CATCCGGACCTGCAGTGTCTT	94
Cxcr4	GCCATGGAACCGATCAGTGTGAGTATA	ACGTTTTTCATCCCGGAAGCA	110
Doc2b	GGACCACAATGGACTGGCTGAT	TTGTTCTGAGCTTATTTGCCTTGCT	80
Dpys15	GAAGCTGGTACAGAGAGAGAAGACCTTAA	GGTGGACAACAATGGCGACAT	86
Duxbl2	CTCTCGAGTCTCAAATTATGACTTGGTTT	TCTAGGTTTATCCTGCTCCTGCTCTT	113
E2f3	CCAAGCCCACTTCCAAAGACTT	GGATTTGGTCCTCAGTCTGCTGTA	126
Eif2s3y	CAGGTGGTCTTATTGGAGTTGGA	TCTAACTCTGTGAATATCTCAGGTAATGCT	118
Fabp7	CACAATGCACATTCAAGAACACAGA	ATCCAACCGAACCACAGACTTACA	104
Klhl23	GACCGTAGTTTCGCCTTCTTCTCT	TGTCCTTTTAGAGCCATGCTTCTCT	99
Lca5	AAGTGCATCACCCAACCGTTA	ATCTTTCCGAAGTGGCTCTCTGT	113
Map2k6	TGTCTGTTATCCATCGAGACGTCAA	AGAGTCGACCAGGTAGCCACTGAT	104
Mllt11	TGAGGCATCCCTTCCGTCTT	GGTCCCTCATGATCCCCTGTTA	66
Mtch1	CTGCTGATCCAGGTGGGTCAT	AGGTGAAGAAGCTCGGCAGGTA	94
Mtfp1	CAAATGGACCACCACCACACTT	AGGAAGTCCACTGACCTGTTCGAT	78
Nnat	GTGCTGCTGCAGGTGTTTCTT	GGCTGTGTCCCTGGAGGATT	77
Nr2e3	CAGGTGATGCTAAGCCAGCAT	GAGCAATTTCCCAAACCTCACA	69
Nxn12	GACCCCTACCGGCATGAACT	TGACAGCTCCGTTCTGCTTGA	85
Osmr	CCAGACACAAAGTACAAGGCTTTTGT	AGAGCCTGTGAGGGAGCAGTCT	116
Otud7b	CCATGACCCTGGACATGGAT	ACTCACATCCCAGTTCTTTCCTTCT	107
Pak3	TGCTAAGGAGCTTTTGCAGCAT	CGGCTACTGTTCTTAATTGCTTCT	105
Pan2	GCTATCATCTCCAGTCAGGTCAAT	CACATCAAACGTCATTAGCAAAGGT	114

Pde6g	AGCGGCAAACAAGGCAGTT	TGCAAGGGTTTGGGGATGA	64
Peli3	CCAGGTGTCTGGAGGGAGATT	GGATTCGTTTTCCACCAGCTT	99
Pla2r1	CCACCACAAGCCGATACGAA	TCACAGAACACCTTCATAGAGGTAGGAT	76
Prdm1	CTGAAGAAACAGAATGGCAAGATCAA	TGCACTCTCAGGTGGACCTTCA	95
Psd2	GAGTTCAGCAGGCTGGTTGCT	GGCCTTCAGGAAGGTTCTGAGT	93
Ptn	CAGACCATGAAAGACTCAGAGATGTAAGAT	ACTGGTACTTGCCTCAGCTCCAA	77
Rdh12	ACAGCTCCATCCATCAGGAAGTT	TCTGGCTGTCTCCTTGCCAAT	120
Rdh8	GGACAAGTGGATGTGCTAGTGAACA	TGCATGGTGGCTAGGCTGAGT	80
Rgr	TGACTATGAGCCTGTGGGGACAT	TGAAGAGAAAACCTGATGAAGTTTCTGTCA	77
Rraga	CATCTGGGATGAGACGCTCTACA	CTGGGCAAATTCCTTAGGTTCA	100
Rs1	GATCTTGCTGTGACCAAGGACAA	GACAATCCCAATGTGGCTTCA	98
Sema7a	CCATCCGGAAGCAGGAATACA	TTGATGAACTGTGGGTTCTGCAT	109
Serpina3n	CTGGAGGATGTCCTTTCAAAGCT	GCCTTGTGGACCACCTGAGA	113
Sgk1	GACTACATTAATGGTGGAGAGCTGTTCTA	GCTATTTAGCTGCGTAGAATCGA	92
Tdrd7	ACCGTCTGTGTTGGTGGTTGA	AGCTGAGTAGTCTTTGCCTACATACCTGATA	75
Thbs1	AGCAACCGCATTCCAGAGTCT	CTTCGTGCACCTCCAATGAGTT	74
Trafd1	CTAGGCTGTGTGACAACCTGCAAGA	CACACACCAATGTTCCCTTTGACAGT	88
Trim36	ACCACTAATTTAGACCCCAAGGTTCT	GCAAACCTGGCCTTCTGCATAGTT	93
Trp53bp2	CAAAATGATGCCGATGTTCCCTG	AACCTTCTGTGAAGTGCTGCTCACTGT	64
Tspan6	TGGATTTGTTTTAGACATGAGATTAAGA	GTCTCCTGTGGAGTTGTACTCCTTCA	85
Ttr	CACAGATGAGAAGTTTGTAGAAGGAGTGT	TCGTTGGCTGTGAAAACCACAT	120
Vopp1	TGTGGCTCCAGGTGCTGTGT	CCATCATCAGCAGGAACCAAA	73
Xaf1	GTGCACCAGCAGACCAAGGA	GTGGGACTCATGGACATCCAGAT	99
Zdhhc16	TGCTGCCATTGAGACGTACCA	TGCACAGGAACCAGAGGTAGACA	98
Zfp322a	CACCATGAAGATCAAGATCATTGCT	TCATCGTACTCCTGCTTGCTGAT	123